

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química



**Caracterización fotofísica de compuestos con
actividad antitumoral**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Pavel Bartovský

Dirigida por:

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. Rosa E. Tormos Faus

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química



**Caracterización fotofísica de compuestos con
actividad antitumoral**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Pavel Bartovský

Dirigida por:

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. Rosa E. Tormos Faus

Valencia, Julio de 2011

D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Catedrático de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, y Dña. ROSA ESPERANZA TORMOS FAUS, Catedrática de Escuela de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Caracterización fotofísica de compuestos con actividad antitumoral**”, ha sido desarrollada por PAVEL BARTOVSKÝ, bajo su dirección, en el Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. Miguel A. Miranda Alonso

Dña. Rosa E. Tormos Faus

El talento consiste en como vive uno la vida.

Ernest Hemingway

A mi padre

Protože seš celej já!

Agradecimientos

Ha pasado mucho tiempo desde aquel caluroso día de septiembre cuando llegué a Valencia lleno de curiosidad y con ganas de emprender una larga aventura, sin darme cuenta de lo mucho que iba a marcar mi vida. Me alegra poder constatar que en ningún momento me arrepentí por la decisión tomada. Ha sido una época maravillosa que jamás olvidaré, sobre todo gracias a la gente que he conocido y que me ha hecho sentir en casa desde el primer día. Quiero agradecer a todas esas personas el apoyo y la amistad que me brindaron.

Entre ellas debo destacar a mis directores, Miguel Ángel y Rosa. Gracias por confiar en mí a lo largo de todos estos años. Esta tesis no hubiese nacido sin vuestro apoyo y paciencia.

A todos mis compañeros del departamento (los Miranda, los Ramones y los Herme), ITQ e ICMol por los buenos momentos compartidos y a muchos de ellos por desempeñar un papel importante en mi vida. En primer lugar, les agradezco a Inma, Nacho y Carlos su atención y apoyo recibidos en los primeros meses y, ante todo, el “buen rollo” que hacía que me despertara con ganas de llegar al trabajo cada mañana.

A Rafa y Paula por tantas horas de buena compañía y por el viaje al norte. Las bodegas de Haro, la famosa Calle Laurel de Logroño y La Concha en San Sebastián resultaron aún más agradables en vuestra presencia.

No solo se vive en el laboratorio y la vida social es más importante aún cuando uno viene “de fuera”. He tenido la suerte de haber conocido buena gente de toda España en los congresos y en mis numerosos viajes. Algunos se convirtieron en amigos, como Emilio y Antonio (*“Antonio Sánchez Coronilla pa’ servirle a usted”*). Ambos hacéis que me sea imposible pasar por Sevilla sin detenerme. Gracias por vuestro positivismo, buen humor y a Antonito por enseñarme que la noción de tiempo es relativa.

A todos mis amigos por las incontables tardes y noches descubriendo la gastronomía local, conociendo las calles de Valencia y Barcelona y por las “reuniones científicas” en el Max Max. A Toni por llenarnos de ánimo tras las largas jornadas y por el chiste de “checolotoro”.

A Félix por su valiosísima amistad, compañía, apoyo y por el esfuerzo sobrehumano a la hora de degustar cangrejos, clóchinas, cabrales y otra clase de alimentos que tan poca confianza le inspiraban. A Hanoi, mi compay cubano, por todas las aventuras, bromas, charlas y sobre todo por su inolvidable interpretación de “Mi señora”. A Santi por no abandonarme desde aquel primer encuentro en el laboratorio de prácticas lleno de trastos y por ser uno de los mejores amigos que se pueden desear.

A Dolors y Cal-lito por ser, cada uno a su modo natural, tan buenas personas en el sentido más puro de la palabra. He mantenido horas y horas de charlas de lo más interesantes con vosotros y ambos me habéis beneficiado con vuestra bondad, tranquilidad, complicidad, optimismo y humor particular.

A Carlos y su familia por recibirme siempre con brazos abiertos, por los días tan agradables en El Puerto (especialmente en El Gonzalo) y por hacerme posible descubrir la Bahía de Cádiz.

Por último (y sobre todo), gracias a mi Merche por haberme acompañado, apoyado y aguantado en estos últimos meses de la escritura, sin duda una tarea muy dura. Gracias por formar la parte más importante de mi vida, por hacerme sonreír cuando no tenía ganas y por no dejar que me aleje del objetivo. Con tu ayuda todo ha sido más fácil.

A todos vosotros ¡MUCHAS GRACIAS!

Abreviaturas y símbolos

A	Absorbancia
AAG	α -glicoproteína ácida
ABZ	Albendazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMBI	2-Aminobencimidazol
AS	Albúmina sérica
ASB	Albúmina sérica bovina
ASH	Albúmina sérica humana
BNM	Benomilo
BP	Benzofenona
BT	2-Benzoiltiofeno
BZ	Bencimidazol
BZ-2-CONH₂	Bencimidazol-2-carboxamida
BZ-2-COOEt	Bencimidazol-2-carboxilato de etilo
CBP	4-Carboxibenzofenona
CBZ	Carbendazim
CIS	Cruce intersistemas
CS	<i>cis</i> -Estilbeno

COL	Colchicina
DMBP	4,4'-Dimetoxibenzofenona
DO	Densidad óptica
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
E_{ox}	Potencial de oxidación
E_{red}	Potencial de reducción
E_S	Energía de singlete
E_T	Energía de triplete
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
FBZ	Fenbendazol
FDL	Fotólisis de destello láser
HOMO	Orbital molecular ocupado con mayor energía
k_{CIS}	Constante de velocidad de cruce intersistemas
k_D	Constante de desactivación
k_{ET}	Constante de velocidad de transferencia de energía
k_F	Constante de desactivación de fluorescencia
k_{max}	Constante de velocidad óptima del sistema
LCs	Lumicolchicinas
LOMO	Orbital molecular ocupado con menor energía
MBP	4-Metoxibenzofenona
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MC	Complejo molecular
MO	Orbital molecular
NBO	<i>Natural Bond Orbital</i>

NCZ	Nocodazol (Oncodazol)
PBS	Disolución tampón de fosfato
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
S	Singlete
Sens	Sensibilizador
T	Triplete
TBZ	Tiabendazol
TUB	Tubulina
u. a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta visible
XANT	Xantona
α-CD	α-Ciclodextrina
α-LC	α- Lumicolchicina
α-TUB	α-Tubulina
β-CD	β-Ciclodextrina
β-LC	β- Lumicolchicina
β-TUB	β-Tubulina
γ-LC	γ- Lumicolchicina
ΔG	Variación de energía libre
ε_T	Coefficiente de absorción molar de triplete
Φ_{CIS}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
Φ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_T	Rendimiento cuántico de triplete
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación

λ_{reg}	Longitud de onda de registro
τ_{F}	Tiempo de vida de fluorescencia
τ_{T}	Tiempo de vida de triplete

Índice

Índice

<i>Capítulo 1. Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1. Quimioterapia del cáncer.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2. Agentes antineoplásicos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.3. Bencimidazoles.....</i>	<i>6</i>
<i>1.4. Colchicina.....</i>	<i>12</i>
<i>1.5. Propiedades fotoquímicas y fotofísicas.....</i>	<i>15</i>
1.5.1. Propiedades fotoquímicas de los bencimidazoles.	
Antecedentes bibliográficos.....	15
1.5.1.1. Propiedades fotoquímicas del bencimidazol.....	15
1.5.1.2. Propiedades fotoquímicas del mebendazol, albendazol y fenbendazol.....	15
1.5.1.3. Propiedades fotoquímicas del carbendazim.....	18
1.5.1.4. Propiedades fotoquímicas del tiabendazol.....	19
1.5.2. Propiedades fotofísicas de los bencimidazoles.	
Antecedentes bibliográficos.....	20

1.5.2.1. <i>Propiedades fotofísicas del mebendazol.....</i>	21
1.5.2.2. <i>Propiedades fotofísicas del albendazol.....</i>	22
1.5.2.3. <i>Propiedades fotofísicas del carbendazim.....</i>	22
1.5.2.4. <i>Propiedades fotofísicas del tiabendazol.....</i>	23
1.5.3. <i>Propiedades fotoquímicas y fotofísicas de la colchicina.</i>	
Antecedentes bibliográficos.....	24
1.5.3.1. <i>Propiedades fotoquímicas de la colchicina.....</i>	24
1.5.3.2. <i>Propiedades fotofísicas de la colchicina.....</i>	26
1.6. <i>Metodologías y técnicas usadas en el estudio de las interacciones fármaco-proteína.....</i>	27
1.7. <i>Fotólisis de destello láser.....</i>	29
1.8. <i>Estados excitados como sondas para los estudios de interacción entre fármacos y proteínas.....</i>	31
1.8.1. Estado excitado singlete. Fluorimetría.....	31
1.8.2. Estado excitado triplete. Fotólisis de destello láser.....	32
Capítulo 2. <i>Objetivos y metodología.....</i>	36
2.1. <i>Objetivo general.....</i>	37
2.2. <i>Objetivos concretos.....</i>	39
Capítulo 3. <i>Caracterización de estados excitados y especies radicalarias derivados de 2-aminobencimidazol</i>	41
3.1. <i>Introducción.....</i>	43
3.2. <i>Resultados y discusión.....</i>	47

3.2.1 Absorción UV de AMBI.....	47
3.2.2 Fluorescencia de AMBI.....	48
3.2.3 Medidas de fotólisis de destello láser.....	51
3.2.4 Cálculos teóricos de DFT.....	
3.3. Conclusiones.....	61
3.4. Parte experimental.....	63
3.4.1. Materiales y disolventes.....	63
3.4.2. Espectros de absorción.....	63
3.4.3. Medidas de fluorescencia.....	63
3.4.4. Fotólisis de destello láser.....	64
3.4.5. Métodos computacionales.....	65
<i>Capítulo 4. Mecanismo de abstracción de hidrógeno del 2-aminobencimidazol por tripletes $n\pi^*$ o $\pi\pi^*$ de cetonas aromáticas.....</i>	<i>67</i>
4.1. Introducción.....	69
4.2. Resultados y discusión.....	72
4.2.1 Estudios de fotólisis de destello láser.....	72
4.2.2 Cálculos teóricos de DFT.....	82
4.3. Conclusiones.....	89
4.4. Parte experimental.....	90
4.4.1. Materiales y disolventes.....	90
4.4.2. Espectros de absorción.....	90
4.4.3. Fotólisis de destello láser.....	91

4.4.4. Métodos computacionales.....	91
<i>Capítulo 5. Caracterización experimental y teórica (DFT) del estado excitado triplete del tiabendazol.....</i>	<i>95</i>
5.1. Introducción.....	97
5.2. Resultados y discusión.....	100
5.2.1 Absorción UV/Vis y fluorescencia.....	100
5.2.2 Espectroscopia de absorción transitoria.....	110
5.2.3 Cálculos teóricos de DFT.....	110
5.2.3.1 Optimización de geometría del TBZ.....	110
5.2.3.2 Estudios de la excitación singlete y triplete del TBZ.....	113
5.3. Conclusiones.....	116
5.4. Parte experimental.....	118
5.4.1. Materiales y disolventes.....	118
5.4.2. Espectros de absorción UV/Vis.....	118
5.4.3. Fotólisis de destello láser.....	118
5.4.4. Métodos computacionales.....	119
<i>Capítulo 6. Interacciones colchicina-proteína reveladas mediante espectroscopia de absorción transitoria tras fotoisomerización in situ a lumicolchicinas.....</i>	<i>123</i>
6.1. Introducción.....	125
6.2. Resultados y discusión.....	129

6.3. Conclusiones.....	136
6.4. Parte experimental.....	137
6.4.1. Materiales y disolventes.....	137
6.4.2. Procedimiento experimental para la preparación de las LCs.....	137
6.4.3. Procedimiento experimental para la foto-isomerización de la COL.....	137
6.4.4. Fotólisis de destello láser.....	138
6.4.5. Determinación del rendimiento cuántico de cruce intersistemas para β - y γ -LC.....	139
<i>Conclusiones.....</i>	<i>141</i>
<i>Resúmenes.....</i>	<i>147</i>
<i>Resumen en castellano.....</i>	<i>149</i>
<i>Resúm en valenciá.....</i>	<i>153</i>
<i>Summary.....</i>	<i>157</i>
<i>Anexos.....</i>	<i>161</i>
<i>Anexo I. Cinética de la fotoisomerización de COL y LCs.....</i>	<i>163</i>
<i>Anexo II. Contribuciones a congresos.....</i>	<i>175</i>
<i>Anexo III. Publicaciones.....</i>	<i>177</i>

Capítulo 1

Introducción

1.1. Quimioterapia del cáncer

La quimioterapia del cáncer consiste en la aplicación de compuestos químicos que actúan por diferentes mecanismos contra el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas. El fin de la quimioterapia es curar y/o aliviar los síntomas relacionados con el tumor y prolongar la vida del paciente. El uso de la quimioterapia está relacionado con el descubrimiento de los agentes alquilantes (en particular de las mostazas nitrogenadas) en el año 1940.¹ Después de 70 años, la quimioterapia sigue siendo la estrategia clínica más utilizada contra numerosos tipos del cáncer y puede aplicarse sola o en combinación con cirugía y radioterapia.²

Se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar nuevos antineoplásicos para el tratamiento de los tipos de cáncer más comunes. Sin embargo, con los sistemas recientes de evaluación de la posible actividad antitumoral se ha identificado solo una cantidad limitada de agentes activos clínicamente, muchas veces con una eficacia limitada y con marcada toxicidad.

¹ J. W. Lown *Pharmacol. Ther.* **1993**, *60*, 185.

² P. Nygren *Acta Oncol.* **2001**, *40*, 166.

A pesar de sus desventajas, la quimioterapia tiene un papel significativo en el tratamiento clínico del cáncer, reduciendo la mortalidad y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

El número de compuestos estudiados por su posible actividad antitumoral que fallan en la fase clínica supera, con creces, a la cantidad de los considerados eficaces. Los dos factores comúnmente implicados en el fallo clínico son la resistencia y la intolerancia a los fármacos suministrados. De ahí deriva la importancia del desarrollo de nuevos antineoplásicos y de métodos de estudio y evaluación de la posible actividad antitumoral de los compuestos químicos.

1.2. Agentes antineoplásicos

Los agentes antineoplásicos (anticancerígenos, antitumorales, citostáticos) son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas. En el tratamiento del cáncer se han usado sustancias de origen natural, sintético o semisintético que se clasifican básicamente en dos tipos:

A) Agentes *cicloespecíficos*, sustancias que actúan contra la célula tumoral en un determinado ciclo de la división celular.

B) Agentes *cicloinespecíficos*, afectan a la célula durante todo su ciclo de desarrollo.

Muchos de los antineoplásicos son profármacos, es decir, se administran como medicamento menos tóxico o con mejores características farmacodinámicas, que una vez en el organismo se convierten en otro fármaco más eficaz, seguro y selectivo frente a su diana terapéutica.

Según el mecanismo de acción se dividen en dos grupos. En el primer grupo se encuentran los ***citostáticos que actúan sobre el ADN***. A este grupo pertenecen los ***agentes alquilantes*** (mostazas nitrogenadas, nitrosoureas), los ***platinos*** (complejos de metales pesados que actúan de forma semejante a la de los agentes alquilantes, todos inyectables), los ***antimetabolitos*** (análogos del ácido fólico, de la pirimidina y de la purina), los ***antibióticos antitumorales***, los ***inhibidores de las topoisomerasas*** (las topoisomerasas son enzimas que controlan las estructuras del ADN en la replicación) y las ***enzimas***.

En el segundo grupo encontramos los ***citostáticos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al ADN***. Son sustancias que actúan sobre la tubulina y/o los microtúbulos de distintas maneras.

En general, los compuestos químicos que actúan sobre los microtúbulos (***MTBs***) ejercen su efecto de inhibición de la proliferación celular bloqueando la mitosis, por ello se les conoce como fármacos ***antimitóticos***.

Su acción sobre la estabilidad y dinámica de los microtúbulos difiere de unos a otros. En general, a concentraciones altas inhiben la polimerización de los microtúbulos desestabilizándolos y reduciendo la masa molecular del polímero o, al contrario, promueven la polimerización estabilizando los microtúbulos y aumentando la masa molecular del polímero.³ Los antimitóticos se dividen tradicionalmente en dos grupos en base a sus efectos sobre los microtúbulos, los ***desestabilizantes*** (los alcaloides de la vinca y la colchicina) y los ***estabilizantes*** como por ejemplo los taxanos (paclitaxel, docetaxel).

³ (a) M. A. Jordan, L. Wilson *Methods Cell. Biol.* **1999**, *61*, 267. (b) P. M. Checchi, J. H. Nettles, J. Zhou, J. P. Snyder, H. C. Josuu *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 361.

La actividad anticancerígena de los citostáticos que afectan a la mitosis no solo es debida a su efecto sobre la estabilidad y masa molecular de los microtúbulos. Se ha demostrado que a concentraciones bajas tanto agentes estabilizantes como desestabilizantes alteran la dinámica de los microtúbulos sin afectar a la masa molecular del polímero, conservando su capacidad de bloquear la mitosis e inducir la apoptosis.⁴

1.3. **Bencimidazoles**

El **bencimidazol** (véase figura 1.3.1) forma parte de la estructura de numerosos fármacos comúnmente utilizados tanto para uso veterinario como humano. Los bencimidazoles (**BZs**) son un grupo de compuestos heterocíclicos que muestran un amplio espectro de actividad antihelmíntica. Se usan como agentes antinematodos y antiprotozoos. Muchos de ellos se usan, además, como fungicidas en el tratamiento post cosecha de frutas y verduras.

En los estudios realizados sobre el mecanismo de acción de los BZs como antihelmínticos, se ha visto que son capaces de unirse a la β -tubulina interfiriendo en la polimerización de la tubulina, desestabilizando así a los microtúbulos en las células intestinales de los parásitos, bloqueando la absorción de glucosa y otros nutrientes (disminución de la producción de ATP) que producen como resultado inmovilización y muerte eventual del parásito.

⁴ (a) M. A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, L. Wilson *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9552. (b) A. M. Yvon, P. Wadsworth, M. A. Jordan *Mol. Biol. Cell.* **1999**, *10*, 947. (c) W. B. Derry, L. Wilson, M. A. Jordan *Biochemistry* **1995**, *34*, 2203. (d) M. A. Jordan, K. Wendell, S. Gardiner, W. B. Derry, H. Copp, L. Wilson *Cancer Res.* **1996**, *56*, 816. (e) M. A. Jordan *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **2002**, *2*, 1.

Su capacidad de irrumpir en el proceso de mitosis tras su unión a la β -TUB, ha generado expectativas en cuanto a la posibilidad de su utilización como antitumorales.

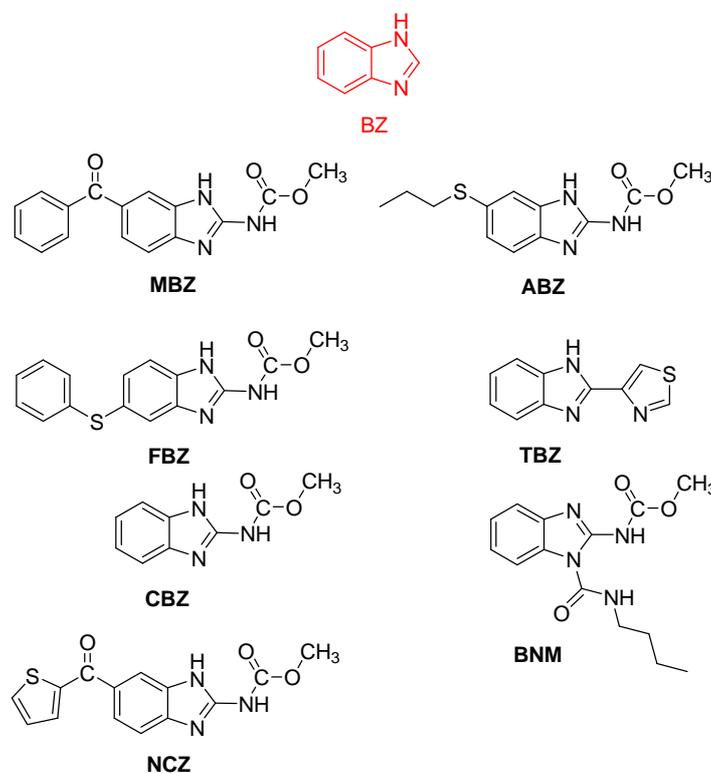


Figura 1.3.1. Estructuras químicas de derivados bioactivos del bencimidazol.

Entre los bencimidazoles destacamos los más comúnmente utilizados:

Mebendazol (MBZ) se ha usado contra una gran variedad de parásitos, entre otros los enterobius, nematodos de la familia *Oxyuridae* conocidos vulgarmente como oxiuros. También para combatir los nematodos, cestodos,

contra los parásitos *Ancylostoma duodenale* y *Trichuris trichiura* (también conocido como tricocéfalo).

Albendazol (ABZ) es un metilcarbamato del bencimidazol, con actividad antihelmíntica de amplio espectro, usado extensivamente en medicina humana y veterinaria en el tratamiento de enfermedades parasitarias como la nematodosis, hidatidosis, teniasis y otras.⁵ EL ABZ es también activo contra varios protozoos⁶ y bacterias Gram positivas⁷ y en el tratamiento de las infecciones microsporidiales y criptosporidiales que pueden causar una diarrea letal en pacientes tratados con inmunosupresores o infectados por la VIH.⁸ En los últimos años se ha demostrado su actividad antitumoral.⁹

Fenbendazol (FBZ) se usa contra los parásitos gastrointestinales y puede ser suministrado a ovejas, caballos, conejos, perros, gatos, peces y focas.

⁵ W. C. Campbell *Parasitol. Today* **1990**, 6, 130.

⁶ S. K. Katiyar, V. R. Gordon, G. L. McLaughlin, T.D. Edlind *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, 2086.

⁷ E. I. Elnima, M. Uppal Zubair, A. A. Al-Badh *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, 19, 29.

⁸ (a) I. Zulu, A. Veitch, S. Sianongo, G. McPhail, R. Feakins, M. J. G. Farthing, P. Kelly *Alim. Pharmacol. Ther.* **2002**, 16, 595. (b) E. S. Didier, M. E. Stovall, L. C. Green, P. J. Brindley, K. Sestak, P. J. Didier *Vet. Parasitol.* **2004**, 126, 145.

⁹ (a) D. L. Morris, J. L. Jourdan, M. H. Pourgholami *Oncology* **2001**, 61, 42. (b) M. H. Pourgholami, J. Akhter, L. Wang, Y. Lu, D. L. Morris *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, 55, 425.

Recientemente ha sido descrita la actividad citostática de **MBZ**, **ABZ** y **FBZ** en el tratamiento del cáncer de próstata con metástasis.¹⁰ Los tres bencimidazoles han mostrado una toxicidad selectiva hacia las células tumorales humanas, presentando toxicidad mínima para las células normales. Los resultados sugieren la posibilidad del uso de estos fármacos en el tratamiento del cáncer de próstata en estado avanzado, dónde fallan las demás terapias.

También se ha constatado que son capaces de prolongar notablemente el periodo de vida de ratas con metástasis, sin ser excesivamente tóxicos para su organismo. Los efectos antitumorales de estos bencimidazoles son comparables e incluso mejores que los de paclitaxel. Su citotoxicidad selectiva se ha confirmado también en células resistentes a los fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tiabendazol (TBZ) se usa como antihelmíntico en animales y humanos y también se aplica como fungicida sobre frutas y verduras. Ha sido estudiado su posible uso en la terapia adyuvante del cáncer.¹¹

Nocodazol (NCZ) es otro agente antineoplásico que ejerce sus efectos interfiriendo la polimerización de los microtúbulos de manera similar a la de otros antimetabólicos como la vincristina o la colchicina. La microscopía de las células tratadas con NCZ ha demostrado que éstas inician la mitosis, pero no concluyen la metafase porque sus microtúbulos no pueden polimerizar.

¹⁰ I. Chung, C. Barrows, A. Wilson, N. Rummel, S. Badaruddin, A. Mizokami, J. Banyard, B. Zetta *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2010*, 19/04/2010, Washington D.C., Poster 1551.

¹¹ J. Lundy, E. J. Lovett, P. Conran, P. J. Goldblatt *Surgery* **1976**, *80*, 636.

La detención de estas células en la metafase conduce normalmente a la muerte celular (*apoptosis*).

Carbendazim (CBZ) (véase figura 1.3.1) es un fungicida con actividad de amplio espectro y, quizás, el de uso más extendido. La disolución de 4.7% de hidrocloreuro de carbendazim es utilizada como un tratamiento eficaz de la *grafiosis*. En Australia se usa sobre plantaciones de macadamia. Ha sido extensivamente estudiado como un posible citostático, igual que su profármaco, el benomilo.

Benomilo (BNM) (véase figura 1.3.1) se ha usado extensivamente como fungicida agrícola en el tratamiento de frutas, verduras y plantas ornamentales.¹² El BNM es inestable en medio acuoso y tras su descomposición da lugar a CBZ.¹³ Está descrita la inhibición de la mitosis por BNM tanto en células fúngicas^{10, 14} como en las de los mamíferos,¹⁵ aunque ha mostrado ser menos tóxico para las últimas. Esto puede deberse a que su afinidad hacia la tubulina de mamíferos es moderada comparado con la que presenta hacia la tubulina fúngica.¹⁶ Se ha estudiado la interacción del BNM con la tubulina cerebral de mamíferos y microtúbulos empleando una sonda fluorescente.¹⁷ Los resultados demuestran que el BNM se une a un dominio nuevo de la TUB, distinto de los dominios de la colchicina y vinblastina.

¹² L. C. Davidse *Annu. Rev. Phytopathol.* **1986**, *24*, 43.

¹³ F. Garcia-Sánchez, A. Aguilar-Gallardo *Mikrochim. Acta* **1994**, *116*, 211.

¹⁴ L. C. Davidse, W. Flach *J. Cell Biol.* **1977**, *72*, 174.

¹⁵ (a) K. Gupta, J. Bishop, A. Peck, J. Brown, L. Wilson, D. Panda *Biochemistry* **2004**, *43*, 6645. (b) K. Rathinasamy, D. Panda *FEBS J.* **2006**, *273*, 4114.

¹⁶ J. V. Kilmartin *Biochemistry* **1981**, *20*, 3629.

¹⁷ K. Gupta, J. Bishop, A. Peck, J. Brown, L. Wilson, D. Panda *Biochemistry* **2004**, *43*, 6645.

Según los mismos estudios, el BNM inhibe la polimerización de la TUB (50% a concentración 70-75 μM) y empleando la metodología de video microscopía *in vitro* se ha demostrado que también suprime la dinámica de los MTBs.¹⁵ Su potente efecto sobre los MTBs de los mamíferos y la mitosis junto con su relativamente baja toxicidad convierten a BNM en un fármaco potencialmente útil en el tratamiento del cáncer.

La capacidad antimitótica del **benomilo** y del **carbendazim** ha sido el motivo de su selección para los ensayos pre-clínicos *in vitro* e *in vivo* como posibles anticancerígenos. Los resultados de los estudios han sido favorables. Ambos fármacos han sido bien tolerados y el reestablecimiento de la proliferación celular, síntesis de proteínas y metabolismo en células normales tras el tratamiento apoyan su futuro desarrollo para el uso en quimioterapia. No se han mostrado afectados por ninguno de los principales mecanismos de la resistencia a los fármacos. Ambos compuestos son modelos de actividad citotóxica similares, salvo algunas pequeñas diferencias asociadas, probablemente, a la cadena butilcarbamoil del BNM. El BNM puede ser una alternativa a las nitrosoureasas en el tratamiento del *glioblastoma* (tumor cerebral). Ensayos *in vivo* sobre cultivos primarios de células tumorales de pacientes con tumor cerebral han demostrado que el BNM es más potente que el CBZ. Éste último ha sido estudiado en la fase 1 del proceso clínico en los tumores sólidos.¹⁸ El BNM se ha mostrado más potente en tumores hematológicos que en tumores sólidos, mientras que la actividad del CBZ ha

¹⁸ D. Hao, E. Rowinsky, J. Rizzo, L. Rosen, S. Felton, L. Smetzer, L. Kadib, L. Denis, A. Patnaik, L. Hammond, G. Schwarz, J. Stephenson, A. Garner, L. Smith, N. Gicanov, J. Brown, S. Weitman, J. Camden, D. Von Hoff, A. Tolcher *ASCO Annual Meeting 2000*; Abstract No 818.

resultado similar en ambos grupos, lo que supone un argumento a favor del uso de CBZ como anticancerígeno. Los resultados de los ensayos en la fase I del proceso clínico realizados sobre pacientes con distintos tipos de tumores sólidos han sido alentadores, incluyendo la ausencia de toxicidad que limita la dosis (*"dose-limiting toxicity"*) y la toxicidad hematológica baja en algunos tipos de tumores.⁵

Se puede concluir que tanto los resultados preclínicos *in vitro* e *in vivo* como los pocos estudios clínicos realizados hasta la fecha, indican el potencial de estos bencimidazoles para ser usados como agentes antineoplásicos tras una investigación más profunda.

1.4. Colchicina

La colchicina (**COL**) es un alcaloide tricíclico (véase figura 1.4.1) de origen natural, presente en el azafrán silvestre conocido como *Colchicum autumnale*, compuesto por un anillo trimetoxifenilo (— anillo A), un anillo de siete carbonos (— anillo B) con un grupo acetamida en posición 7 y un anillo tropolónico (— anillo C).

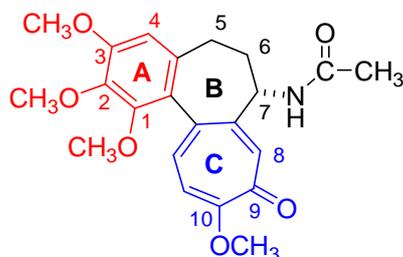


Figura 1.4.1. Estructura química de la colchicina.

Los efectos terapéuticos de la COL se conocen desde hace más de 2000 años. En el manuscrito “*De Materia Medica*” escrito por Pedanius Dioscorides (ca. 40-90 d.de C.), cirujano del ejército romano, se menciona el uso del extracto de *Colchicum autumnale* en el tratamiento de la gota. Los bulbos fueron, posteriormente, recomendados para el tratamiento de la gota por varios autores reconocidos, entre otros por el médico de origen persa ibn Sina (Avicena, ca. 980-1037) o Ambroise Pare en el siglo XVI.

El uso del *Colchicum*, el precursor de la colchicina, en el tratamiento del reumatismo ha sido descrito en el “*papiro de Ebers*”, uno de los documentos médicos más antiguos de la historia (alrededor de 1500 a de C.). La COL se ha utilizado también en el tratamiento de la fiebre mediterránea. En las últimas décadas se ha estudiado su eficacia como neurotoxina en el estudio de enfermedades como la epilepsia y el Alzheimer.¹⁹ Por último, la COL ha sido objeto de estudios relacionados con la investigación del cáncer, debido a su capacidad de interrumpir la polimerización de la tubulina y afectar a la dinámica tubulina/microtúbulos. Los estudios más recientes demuestran que la COL es capaz de prevenir el desarrollo del cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular) en pacientes con cirrosis hepática.²⁰ El mecanismo preciso de acción de la COL no es conocido.

¹⁹ (a) A. Brossi, H. J. Yeh, M. Chrzanowska, J. Wolff, E. Hammel, C. M. Lin, F. Quin, M. Sulfness, J. Silverton *Med. Res. Rev.* **1988**, *8*, 77. (b) F. D. Malkinson *Arch. Dermatol.* **1982**, *118*, 453. (c) R. Brecht, F. Haenel, G. Seitz, G. Frenzen, A. Pils, W. Massa, S. Wocadlo *Liebgs. Ann.* **1997**, 851. (d) J. L. Weiner, A. V. Buhler, V. J. Whatley, R. A. Harris, T. V. Dunwiddie *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 95. (e) M. P. Mattson *Brain Res.* **1992**, *582*, 107.

²⁰ O. Arrieta, J. L. Rodríguez Díaz, V. Rosas Camargo, D. Morales Espinosa, S. Ponce de León, D. Kershenobich, E. Leon Rodriguez *Cancer* **2006**, *107*, 1852.

A pesar de que muchos médicos y farmacéuticos han reconocido la actividad farmacéutica del extracto de *Colchicum*, fue en 1820 cuando se aisló por primera vez la colchicina por Pelletier y Caventon. La configuración absoluta fue determinada con posterioridad por Corrodi y Hardegger en 1955.

Un avance en el estudio de la actividad farmacológica de la COL fue la determinación de la conformación bioactiva.²¹

Los resultados de la investigación realizada por numerosos químicos, en particular por Arnold Brossi, llevaron a la conclusión de que el enantiómero natural es la (-)-(7S)-COL.²² El enantiómero (+)-(7R)-COL, no natural, carece de actividad sobre la TUB.

Se ha sintetizado una gran cantidad de análogos de la COL y el análisis de los resultados ha proporcionado información sobre los requisitos de la estructura molecular en relación con la capacidad de unión a la tubulina y la inhibición de la polimerización de esta.

El objetivo de la investigación sobre los análogos de la COL y otros agentes que inhiben la polimerización de la TUB es determinar el mecanismo preciso de las interacciones con la TUB a nivel molecular para facilitar el diseño de nuevos fármacos con mejores características.

²¹ (a) H. G. Capraro, A. Brossi *The Alkaloids*, Academic Press: New York **1984**, *23*, 1.

(b) O. Boye, A. Brossi *The Alkaloids*; Academic Press: New York **1992**; *41*, 125.

²² (a) A. Brossi *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2311. (b) W. C. Wildman *The Alkaloids*,

Academic Press: New York, **1968**, *11*, 407. (c) J. W. Cook, J. D. Loudon

The Alkaloids, Academic Press: New York, **1952**, *2*, 261. (d) W. C. Wildman.

The Alkaloids, Academic Press: New York, **1960**; *6*, 220.

1.5. Propiedades fotoquímicas y fotofísicas

El estudio de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los compuestos es la fase preliminar en el proceso de estudio de interacciones entre fármacos y proteínas en los estados excitados. A continuación se describen brevemente los conocimientos sobre el comportamiento fotofísico y/o fotoquímico de algunos de los agentes antineoplásicos.

1.5.1. Propiedades fotoquímicas de los bencimidazoles

Antecedentes bibliográficos

1.5.1.1. Propiedades fotoquímicas del bencimidazol

En los años 70 fue descrita la fotorreactividad del **bencimidazol (BZ)** y algunos de sus derivados, en distintos disolventes.²³ En el caso de BZ fue observada la formación de dehidro dímeros asimétricos (2,4'- y 2,5'-bisbencimidazol). Sin embargo, la irradiación de 2-alkilbencimidazoles no conduce a la formación de dímeros sino a una mezcla de acil derivados, cuyo rendimiento aumenta en disolventes ácidos. Así, el 2-metilbencimidazol da lugar a acetil derivados del 2-metilbencimidazol. El mecanismo propuesto transcurre a través de un primer paso común, abstracción de hidrógeno por la especie en estado excitado, seguido de la reacción con el sustrato en estado fundamental. El carácter de la reacción siguiente depende del sustituyente en posición 2. Si éste es hidrógeno, la reacción que tiene lugar es la oxidación a

²³ E. R. Cole, G. Crank, E. Lye *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 2675.

dehidro dímero. Sin embargo, los derivados alquílicos forman una mezcla de acil derivados y o-fenilendiamina sin formar dímeros (véase figura 1.5.1).

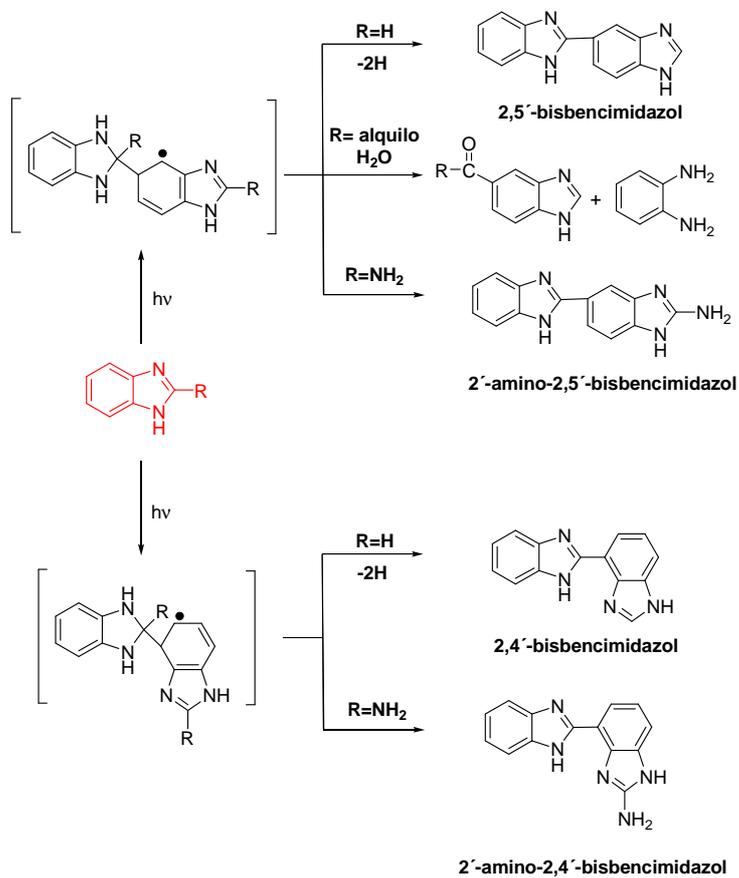


Figura 1.5.1 Fotorreactividad del benzimidazol y sus alquil y amino derivados.

El 2-aminobencimidazol muestra el mismo comportamiento que el BZ (formación de 2'-amino-2,5'-bisbencimidazol y 2'-amino-2,4'-bisbencimidazol).²⁴

Por otra parte, el 2-clorobencimidazol pierde el cloro dando lugar a la formación de un dímero (véase figura 1.5.2), mientras que la bencimidazol-2(3H)-ona es inerte a la fotólisis.²⁴

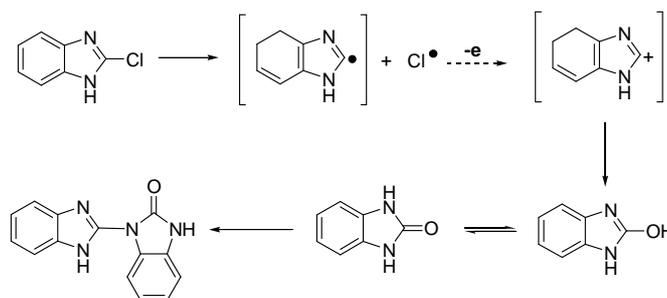


Figura 1.5.2 Fotorreactividad del 2-clorobencimidazol.

El 2-mercaptobencimidazol experimenta una ruptura del anillo de imidazol con la pérdida del azufre dando lugar a la bencimidazol-2(3H)-ona y la dicianidamina (véase figura 1.5.3).²⁴

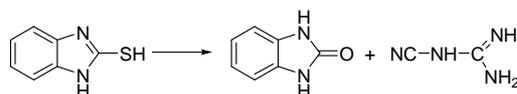


Figura 1.5.3 Fotorreactividad del 2-mercaptobencimidazol.

²⁴ G. Crank, A. Mursyldi *Aust. J. Chem.* **1982**, 35, 775.

1.5.1.2. Propiedades fotoquímicas del mebendazol, albendazol y fenbendazol

La fotoestabilidad del **mebendazol (MBZ)** sólido y en disolución ha sido el objetivo de varios estudios²⁵ empleando la luz solar y UV. Los resultados indican que el MBZ es un producto fotosensible en disolución y mediante HPLC se demostró la formación de dos fotoproductos formados tras dos reacciones consecutivas: la desmetilación del grupo ester seguida de descarboxilación (véase figura 1.5.4).

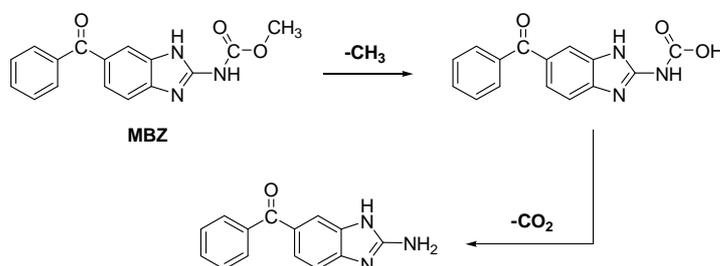


Figura 1.5.4 Fotorreactividad del mebendazol.

La fotodegradación del **albendazol (ABZ)** en medio acuoso ha confirmado su fotosensibilidad en disolución.²⁶ Consiste en la oxidación

²⁵ (a) A. K. El Faith Idris, A. H. Mohamed, S. B. Rafaat *Int. Jour. Pharm.* **1996**, *142*, 251.

(b) G. Ragno, A. Risoli, G. Ioele, M. DeLuca *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 802.

²⁶ (a) C. A. Weerasinghe, D. O. Lewis, J. M. Mahews, A. R. Jeffcoat, P. M. Troxler, R. Y. Wang *J. Agric. Food. Chem.* **1992**, *40*, 1413. (b) C. A. Weerasinghe, J. M. Mahews, R. S. Wright, R. Y. Wang *J. Agric. Food. Chem.* **1992**, *40*, 1419.

consecutiva del átomo de azufre del ABZ a sulfóxido y sulfona, formándose finalmente unos fotoproductos polares no caracterizados.

La comparación de los resultados de la fotólisis de MBZ, ABZ y FBZ bajo las mismas condiciones demostró que el fármaco más fotoestable es el FBZ, mientras que el menos estable es el ABZ.^{25b}

1.5.1.3. Propiedades fotoquímicas del carbendazim

La fotodegradación del **carbendazim (CBZ)** ha sido extensivamente estudiada²⁷ con el fin de desarrollar un proceso para su eliminación del medio ambiente. La consecuencia de su uso como fungicida a gran escala es la contaminación del agua.

El CBZ en disolución acuosa absorbe luz UV entre 200-300 nm. Para elucidar el comportamiento fotoquímico de CBZ en aguas superficiales se llevaron a cabo estudios en disoluciones acuosas a distintos pH empleando una fuente de luz UV o solar. Las cinéticas de descomposición del CBZ han sido determinadas mediante HPLC-DAD y la identificación de los fotoproductos se llevó a cabo mediante HPLC-MS. Se ha confirmado la influencia de pH sobre la fotodegradación, y se ha demostrado que su velocidad aumenta en disoluciones básicas. Se identificaron tres fotoproductos (véase figura 1.5.5): 2-aminobencimidazol, bencimidazol isocianato y monocarbometoxiguanidina (producto de la ruptura del anillo de bencimidazol).

²⁷ (a) P. Mazellier, E. Leroy, B. Legube *J. Photochem. Photobiol. A* **2002**, *15*, 221.

(b) A. Boudina, C. Emmelin, A. Baaliouamer, M. F. Grenier-Loustalot, J. M. Chovelon *Chemosphere* **2002**, *50*, 649. (c) J. P. Escalada, A. Pajares, J. Gianotti, W. A. Massad, S. Bertolotti, F. Amat-Guerri, N. A. Garcia *Chemosphere* **2006**, *65*, 237.

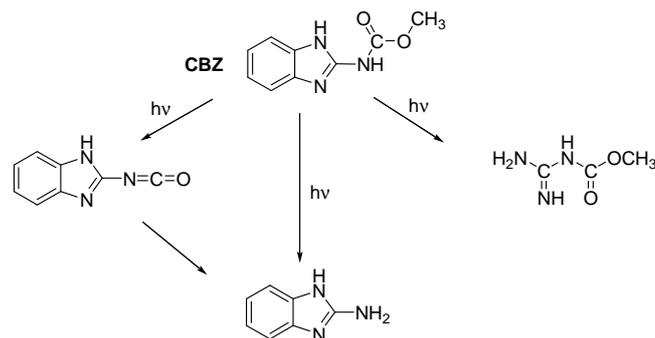


Figura 1.5.5 Fotorreactividad del carbendazim.

1.5.1.4. Propiedades fotoquímicas del tiabendazol

El posible impacto del TBZ sobre el medio ambiente ha sido el motivo de los estudios del mecanismo de su fotodegradación con el fin de identificar los fotoproductos y evaluar su toxicidad. Mediante la metodología de HPLC-MS han sido identificados algunos de los fotoproductos e intermedios tras la irradiación con un simulador de luz solar.²⁸

El análisis mediante HPLC de disoluciones acuosas del TBZ irradiadas con luz UV (< 290 nm) ha revelado la formación de varios fotoproductos, entre ellos bencimidazol, bencimidazol-2-carboxamida, bencimidazol-2-nitrilo y otros. También han sido detectados productos de la reacción con oxígeno en el

²⁸ P. Calza, S. Baudino, R. Aigotti, C. Baiocchi, E. Pelizzetti *J. Chromatogr. A* **2003**, *984*, 59.

estado excitado singlete.²⁹ Existen evidencias de la fotomutagénesis en células bacterianas y humanas tras la irradiación por luz UVA en presencia de TBZ.³⁰

1.5.2. Propiedades fotofísicas de los bencimidazoles

Antecedentes bibliográficos

1.5.2.1. Propiedades fotofísicas del mebendazol

No se han encontrado datos de la fluorescencia del **mebendazol (MBZ)**, como cabe esperar en el caso de una cetona aromática. Sin embargo, ha sido descrita la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 300$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm) del producto de la reacción de MBZ con H₂O₂ en disolución básica³¹ que permitió la detección de concentración hasta 0.1 µg/mL de MBZ en disolución. También hay evidencias de la fosforescencia de MBZ a baja temperatura³² (77K, $\lambda_{exc} = 322$ nm, $\lambda_{em} = 454$ nm).

²⁹ N. B. K. Murthy, P. N. Moza, K. Hausert, K. Raghu, A. Kettrup *Chemosphere* **1996**, *33*, 1915.

³⁰ (a) M. Watanabe-Akanuma, Y. Inaba, T. Ohta *Genes and Environment* **2006**, *28*, 103.

(b) M. Watanabe-Akanuma, T. Ohta, Y. F. Sasaki *Toxicol. Lett.* **2005**, *158*, 213.

³¹ W. Baeyens, F. Abdel Fattah, P. De Moerlosse *J. Pharm. Biomes. Anal.* **1985**, *5*, 397.

³² W. Baeyens, F. Abdel Fattah, P. De Moerlosse *Anal. Lett.* **1985**, *18*, 2105.

1.5.2.2. Propiedades fotofísicas del albendazol

Con el fin de desarrollar un procedimiento para la detección espectrofluorimétrica del **albendazol (ABZ)** ha sido descrita la fluorescencia de éste en distintos disolventes.³³ La longitud de onda de excitación y emisión ha sido 360 y 440 nm respectivamente, en cloroformo. Los resultados han sido empleados para determinar el contenido del componente activo en pastillas del ABZ y proporcionaron un método fácil y sensible para el control de calidad. Sin embargo, no hemos encontrado datos acerca de rendimiento cuántico, ni sobre el tiempo de vida del **ABZ**.

1.5.2.3. Propiedades fotofísicas del carbendazim

La fluorescencia del **carbendazim (CBZ)** ha sido estudiada en metanol y disoluciones acuosas a distintos pH.³⁴ Ambas formas del CBZ, la neutra y la protonada, son fluorescentes. Los máximos de emisión son 290 y 390 nm para la forma protonada y 305 nm para la neutra. El rendimiento cuántico de fluorescencia del CBZ, sin embargo, es muy bajo (0.004 en agua), igual que el tiempo de vida (3 ns en metanol).

³³ S. Kucukkolbasi, B. Gundaz, E. Kilic *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 104.

³⁴ L. Burel-Deschamps, P. Giamarchi, L. Stephan, Y. Lijour, A. Le Bihan *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 177.

1.5.2.4. Propiedades fotofísicas del tiabendazol

Los estudios realizados han mostrado que el **tiabendazol (TBZ)** y algunos de sus análogos pueden ser excitados, tras la absorción de energía, al estado singlete cuyo carácter depende de la estructura molecular y del entorno. En el caso del TBZ, se ha descrito que la configuración es $\pi\text{-}\pi^*$. Se ha determinado el rendimiento cuántico y el tiempo de vida. Asimismo, se ha investigado el efecto del pH, la polaridad del disolvente y la sustitución sobre la fluorescencia del TBZ³⁵ y sus derivados. Los resultados demuestran que la fluorescencia del TBZ es poco sensible tanto a la polaridad del disolvente, como al pH, mientras que la de algunos de sus derivados (5-hidroxtiabendazol, 5-aminotiabendazol) es sensible a ambos factores.

La posibilidad de determinación de trazas del TBZ y otros bencimidazoles en muestras de alimentos (frutas, verduras, leche, zumo de naranja) o de aguas superficiales es un tema que genera interés, como muestran los trabajos que usan la fluorescencia sola o en combinación con otras técnicas analíticas y separativas,³⁶ como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), microextracción etc., para la detección del TBZ.

³⁵ P. C. Tway, L. J. Cline Love *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 5227.

³⁶ (a) Q. Wu, Y. Li, Ch. Wang, Z. Liu, X. Zang, X. Zhou, Z. Wang *Anal. Chim. Acta* **2009**, *638*, 139. (b) A. Moral, M. D. Sicilia, S. Rubio *Anal. Chim. Acta* **2009**, *650*, 207. (c) J. López Flores, M. L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz *Analytical Science* **2009**, *25*, 681. (d) C. P. Suárez Araujo, P. García Báez, A. Sánchez Rodríguez, J. J. Santana Rodríguez *Anal. Bional. Chem.* **2009**, *394*, 1059.

Se han encontrado datos acerca de la fosforescencia del tiabendazol y de los derivados anteriormente mencionados. Así, se han descrito los espectros de emisión, tiempos de vida y rendimientos cuánticos.³⁵ Por el contrario, no hay datos acerca del espectro de absorción del triplete, ni de otras posibles especies transitorias.

1.5.3. Propiedades fotoquímicas y fotofísicas de la colchicina **Antecedentes bibliográficos**

1.5.3.1. Propiedades fotoquímicas de la colchicina

Los primeros estudios sobre los cambios experimentados por la COL al exponerla a la luz solar datan de 1865. Posteriormente, en 1954, Forbes describió el proceso y caracterizó la estructura de los fotoproductos β - y γ -lumicolchicina.³⁷ Tras la irradiación de disoluciones concentradas a tiempos prolongados se forma, además, la α -lumicolchicina, un dímero de la β -LC³⁷ (véase figura 1.5.6).

Los primeros estudios sobre la fotoquímica de la COL en disolución se limitaron al seguimiento de la desaparición de la COL por espectroscopia. Los resultados mostraron que el rendimiento cuántico de fotorreactividad depende de la polaridad del disolvente.³⁸ La naturaleza del estado excitado involucrado en el proceso no se conocía. En el mismo trabajo, Roigt y Leblanc, basándose en el trabajo de Dauben sobre la isomerización de tropolonas³⁹

³⁷ E. J. Forbes *J. Chem. Soc.* **1955**, 3864.

³⁸ H. Roigt, M. Leblanc *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2821.

³⁹ W. G. Dauben, K. Koch, O. L. Chapman, S. L. Smith *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1768.

propusieron que la isomerización de la COL ocurre desde el estado excitado triplete.

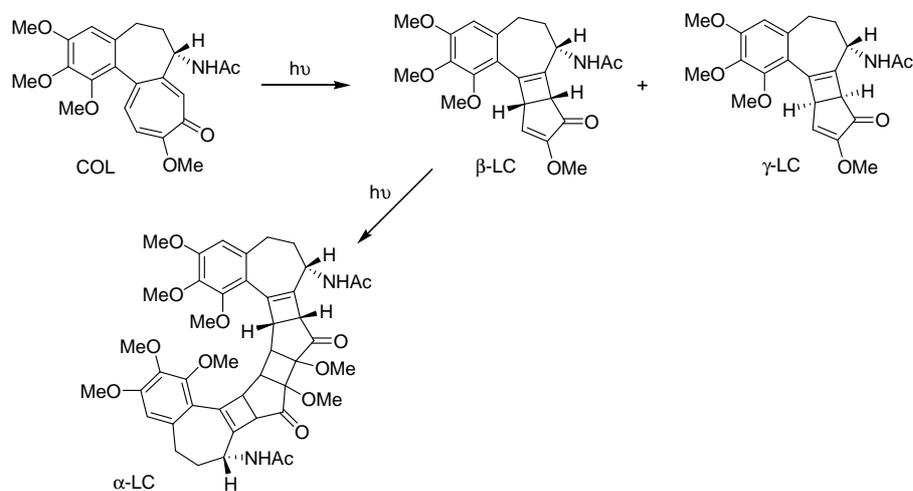


Figura 1.5.6. Fotoisomerización de la colchicina.

Esta suposición se ha mostrado errónea, ya que en un estudio posterior de Croteau y Leblanc⁴⁰ no se observó ningún efecto sobre la fotorreactividad de la COL al irradiar en presencia de desactivadores de triplete.

El trabajo de Nery⁴¹ y colaboradores, de 2001, reexaminó la fotoisomerización de la COL a LCs. Se evaluó la influencia de la polaridad del disolvente y pH sobre la fotorreactividad de la COL realizando ensayos en distintos medios. La reacción fue monitorizada midiendo los cambios en el

⁴⁰ R. Croteau, R. Leblanc *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 33.

⁴¹ A. Nery, F. Quina, P. Moreira, C. Madeiros, W. Baader, K. Shimizu, L. Catalani, E. Bechare *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 213.

espectro de absorción y empleando la metodología HPLC. En todos los casos fue observada la formación simultánea de la β - y γ -LC, siendo la β -LC el producto mayoritario. En las condiciones del estudio no se observó interconversión entre la β - y la γ -LC, mientras que tanto la velocidad, como el rendimiento de la reacción dependen de la polaridad del disolvente utilizado.

1.5.3.2. Propiedades fotofísicas de la colchicina

En 1973 se llevó a cabo el primer estudio fotofísico, por espectroscopia de absorción y emisión, sobre la COL. Se determinó un rendimiento cuántico de fosforescencia de 0.86 y se observó el efecto de la polaridad y la capacidad para formar puentes de hidrógeno de los disolventes utilizados sobre la emisión de la COL.

La COL no presenta fluorescencia en disolución, pero sí tras su inmovilización en TUB, con un rendimiento cuántico de 0.03.⁴²

En el trabajo de Nery y colaboradores se describe la formación de una especie transitoria, por fotólisis de destello láser (FDL) de la COL, con un tiempo de vida corto y que se atribuyó al estado excitado triplete. Sin embargo, no se ha vuelto a observar en trabajos posteriores, ni hemos podido reproducirlo en nuestro equipo de trabajo. Lo que parece aceptado es que la formación de las lumicolchicinas procede directamente desde el estado excitado singlete de la COL. Ésta hipótesis ha sido confirmada por resultados del estudio de la fotoisomerización de la COL y tiocolchicina mediante la

⁴² B. Bhattacharyya, J. Wolff *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 2627.

espectroscopia transitoria de femtosegundos publicado por Bussotti⁴³ y colaboradores.

1.6. Metodologías y técnicas usadas en el estudio de las interacciones fármaco-proteína

El conocimiento de las interacciones entre fármacos y proteínas, entre las que se encuentra la TUB, es imprescindible para comprender la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo. Existen varias técnicas para la realización de este tipo de estudios. Entre ellas destacan las siguientes: dicroísmo circular, ultracentrifugación, diálisis de equilibrio, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cristalografía de rayos X, fluorescencia, etc. El uso de estas técnicas ofrece ventajas, pero también algunos inconvenientes y limitaciones.⁴⁴

Algunas de las metodologías más frecuentes en el estudio de las interacciones entre fármacos y proteínas se describen brevemente.

El método de **ultracentrifugación** se usa para la determinación de la masa molecular de una proteína, la estequiometría de formación de complejos, la afinidad de un sustrato por la macromolécula, etc. La técnica se basa en la determinación de la velocidad de sedimentación de las macromoléculas sometidas a un campo centrífugo elevado. La fuerza de centrifugación tiene que ser superior a la de difusión para que se produzca un

⁴³ L. Bussotti, I. Cacelli, M. D'Auria, P. Foggi, A. Silvani, V. Villani. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9079.

⁴⁴ (a) Z. Jia, T. Ramstad, M. Zhong *J Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *405*, 413.

(b) L. H. Lucas, K. E. Price, C. K. Larive *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14258.

transporte de materia hacia el fondo de la celda. Permite fraccionar las moléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación, que es función de la masa, la densidad y la forma macromolecular. También es posible estudiar el equilibrio de sedimentación. En este caso, las muestras se someten a campos centrifugos moderados hasta que se igualan las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión. De este modo se puede realizar un análisis cuantitativo de las asociaciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares. Sin embargo, las limitaciones que implica el uso de la ultracentrifugación incluyen el seguimiento de un procedimiento experimental complejo y laborioso que requiere horas (15-24 h) para la adquisición de datos de un único experimento. Además se debe tener en cuenta un gran número de diversos factores a la hora de realizar un ensayo experimental, lo cual dificulta la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La **electroforesis capilar** se utiliza para la separación de péptidos y proteínas. Consiste en la aplicación de un campo eléctrico donde la electroforesis se realiza en un tubo capilar, produciéndose una eficaz separación basándose en la relación carga/masa de la muestra. Es una técnica de uso general, pero ofrece ciertos problemas de reproducibilidad.

Los efectos de la proteína sobre la **fluorescencia** del fármaco pueden incluir cambios de la intensidad y/o del tiempo de vida de ésta. Los cambios del rendimiento cuántico de fluorescencia se reflejan típicamente también en su tiempo de vida.

La **fotólisis de destello láser** es una técnica excelente que puede ser aplicada al estudio de interacciones entre fármacos y proteínas. Se ha demostrado recientemente la posibilidad de usar los estados excitados triplete de algunos fármacos como sondas para estudiar las interacciones con proteínas debido a que los estados excitados triplete son altamente sensibles

al microentorno dentro de la proteína. En nuestro grupo de investigación se han estudiado extensivamente las interacciones entre los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y las proteínas transportadoras (albúminas séricas, α -glicoproteína)⁴⁵ que demuestran que la fotólisis de destello láser es una técnica capaz de proporcionar datos de distintos tipos sobre el carácter de las interacciones fármaco/proteína (sitio de unión, el porcentaje de ocupación de sitios de unión, etc.).

1.7. Fotólisis de destello láser

El primer trabajo sobre la fotólisis de destello láser fue publicado en el año 1966. En él, Lindqvist utilizó el pulso de un láser de N₂ (337 nm) para detectar el estado excitado triplete de la acridina.⁴⁶

La técnica se basa en el uso de un láser pulsado para excitar una muestra y generar los diferentes estados excitados. Inmediatamente después del pulso de láser se registra el espectro de absorción de las especies generadas mediante una lámpara de UV-Vis. El sistema de detección consta de un monocromador y un fotomultiplicador que envían la señal a un osciloscopio para registrarla y mandarla a un ordenador para su posterior tratamiento.

Como resultado se obtienen datos de absorción frente a tiempo a una longitud de onda determinada. Este tipo de registro nos permite estudiar la

⁴⁵ (a) M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.

(b) V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*,

9538. (c) V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 423.

(d) I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11284.

⁴⁶ L. Lindqvist *Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C* **1966**, *263*, 852.

cinética de desactivación de los estados excitados generados y obtener información valiosa sobre dichos estados, como su tiempo de vida. Además, monitorizando la señal a muchas longitudes de onda se puede construir el espectro de absorción de las diferentes especies transitorias presentes en el medio.

Para el uso de la FDL es conveniente que se cumpla una serie de requisitos:

- El compuesto debe absorber luz a la longitud de onda de excitación del láser.

- Tras la irradiación se generen intermedios (tripletes, radicales libres, iones radicales, birradicales, etc.) fácilmente detectables que absorban en la región UV-Vis y vivan en una escala de tiempos de nano/microsegundos.

- La irradiación de la proteína no induzca ninguna señal, al menos en la región donde lo hagan los intermedios del compuesto.

Entre las ventajas de la FDL destaca su sensibilidad, ya que es una técnica capaz de detectar las especies transitorias que genera el sustrato por absorción de luz a concentraciones muy bajas (de hasta 10^{-6} M). La cantidad de muestra necesaria es pequeña, en comparación con otras técnicas. Además se trata de un método sencillo y de rápida ejecución que ofrece resultados altamente reproducibles y de fácil procesado.

1.8. Estados excitados como sondas para los estudios de interacción entre fármacos y proteínas

1.8.1. Estado excitado singlete, fluorimetría

La fluorimetría es una herramienta potente en el estudio de la reactividad de sistemas químicos y biológicos debido a que es una técnica no invasiva que permite realizar ensayos sobre muestras con baja concentración del sustrato en condiciones fisiológicas. La forma, la intensidad y el tiempo de vida de fluorescencia son altamente sensibles al microentorno.

Como se ha mencionado anteriormente, la fluorescencia de los bencimidazoles ha sido utilizada para la detección de éstos en combinación con otras técnicas analíticas y separativas y para los ensayos de marcaje de fotoafinidad, en particular el estudio de interacción entre bencimidazol y la β -TUB.⁴⁷

Existen varios trabajos sobre la interacción entre la colchicina y la tubulina. Bhattacharyya y Wolff⁴⁸ registraron la fluorescencia de la COL tras su unión a la TUB, mientras que en medio acuoso u orgánico no es fluorescente. El rendimiento cuántico de fluorescencia ha sido relativamente bajo (0.03). Sardar⁴⁹ y colaboradores han estudiado la influencia de los residuos de triptófano (Trp) sobre la fluorescencia de complejos COL-TUB y la posible transferencia de energía entre el Trp y COL en el complejo. También existen estudios sobre las interacciones de COL con las albúminas séricas (ASB y ASH)

⁴⁷ B. Nare, G. Lubega, R. K. Prichard, E. Georges *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8575.

⁴⁸ B. Bhattacharyya, J. Wolff *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 2627.

⁴⁹ P. S. Sardar, S. S. Maity, L. Das, S. Ghosh *Biochemistry* **2007**, *46*, 14544.

mediante la desactivación de la fluorescencia de las albúminas séricas por la COL.⁵⁰

1.8.2. Estado excitado triplete. Fotólisis de destello láser

Los estados excitados triplete de algunos fármacos pueden ser usados como sondas para determinar los sitios de unión con las proteínas, debido a que los tiempos de vida son notablemente sensibles al microentorno dentro de dichas biomacromoléculas.

En la bibliografía se encuentran muy pocos trabajos relacionados con el uso de la técnica de fotólisis de destello láser para estudiar las interacciones entre fármacos y proteínas. Ejemplo de ello son los estudios de nabumetona en albúmina sérica bovina (ASB),⁵¹ nafazolina en ASB⁵² o ketoprofeno en ASB.⁵³ Recientemente, la atención se ha centrado sobre los estudios de interacciones entre los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y las proteínas transportadoras,⁵⁴ entre otras la albúmina sérica bovina (ASB), albúmina sérica humana (ASH) y la α -glicoproteína ácida humana (AAG).

⁵⁰ (a) Y-J. Hu, Y. Liu, L-X. Zhang, R-M. Zhao, S-S. Qu *J. Mol. Struct.* **2005**, 750, 174.

(b) Y-J. Hu, Y. Liu, L-X. Zhang, R-M. Zhao, S-S. Qu *J. Mol. Struct.* **2005**, 37, 122.

⁵¹ L. J. Martínez, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 646.

⁵² S. Sortino, J. C. Scaiano, S. Giuffrida *New. J. Chem.* **1999**, 23, 1159.

⁵³ S. Monti, I. Manet, F. Manoli, R. Morrone, G. Nicolosi, S. Sortino *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 13.

⁵⁴ (a) M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10134.

(b) V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126,

9538. (c) V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 423.

(d) I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11284.

Hasta la fecha no existen trabajos sobre el uso de la técnica de FDL para estudiar las interacciones entre antineoplásicos y proteínas.

(e) C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861.

(f) I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1015.

Capítulo 2

Objetivos y metodología

2.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo consiste en explorar las propiedades de las especies transitorias de algunos fármacos antitumorales como posibles sondas para el estudio de las interacciones de estos fármacos con proteínas, en particular con la tubulina, mediante el uso de las técnicas de fotólisis de destello láser y de fluorescencia. En este contexto se estudiarán las especies transitorias generadas tras la absorción de luz, las propiedades de los estados excitados de los fármacos y la influencia del medio sobre éstas. Así, se usarán las albúminas séricas (bovina y humana), proteínas transportadoras importantes y varios tipos de las ciclodextrinas (α -, β - y γ -CD), debido a su extenso uso en medicina para aumentar la solubilidad de algunos fármacos.

Como sustratos se utilizarán el 2-aminobencimidazol (AMBI), el tiabendazol (TBZ), la colchicina (COL) y las lumicolchicinas (β - y γ - LC). Se han escogido dichos compuestos por las siguientes razones:

- Su extendido uso en el mercado farmacológico y la creciente atención que ha generado su posible aplicación como anticancerígenos.
- El bencimidazol (cromóforo del AMBI y TBZ) es activo fotofísicamente y su estado excitado triplete no ha sido descrito.
- La fotoisomerización de la COL y las LCs no ha sido completamente caracterizada mecanísticamente.
- El estado excitado triplete de las LCs no ha sido descrito. Existe solo un trabajo que menciona el estado excitado triplete de la COL y no evalúa su posible uso como sonda para el estudio de interacciones fármaco-proteína.

La técnica de fotólisis de destello láser es muy sensible, capaz de detectar las especies transitorias que genera el sustrato por absorción de luz a concentraciones muy bajas (de hasta 10^{-6} M). Además es un método sencillo y de rápida ejecución y ofrece resultados altamente reproducibles y de fácil procesado.

Las propiedades que se miden con esta técnica están relacionadas con los estados excitados de las muestras a estudiar, los cuales se van a usar como sonda para el estudio de la interacción y distribución de fármacos en proteínas. Así pues, los tiempos de vida de tripletes pueden proporcionar información sobre la naturaleza y fuerza de enlace, la existencia de restricciones conformacionales, requerimientos estereoquímicos, protección frente al ataque de O_2 y otros reactivos, etc.

2.2. **Objetivos concretos**

Entre los objetivos concretos propuestos en esta tesis, cabe destacar los siguientes:

- Caracterizar los estados excitados y especies transitorias derivados de 2-aminobencimidazol
- Estudiar el mecanismo de abstracción de hidrógeno del 2-aminobencimidazol por tripletes $n\pi^*$ o $\pi\pi^*$ de cetonas aromáticas.
- Caracterizar el estado excitado triplete del tiabendazol y estudiar los efectos del medio sobre éste.
- Estudiar la fotoisomerización de la colchicina y las lumicolchicinas.
- Caracterizar los estados excitados triplete de las lumicolchicinas.
- Estudiar por FDL las interacciones colchicina-proteína tras la fotoisomerización *in situ* a lumicolchicinas.

Capítulo 3

Caracterización de estados excitados y especies radicalarias derivados del 2-aminobencimidazol

3.1. Introducción

Los bencimidazoles (**BZs**) han demostrado actividad antihelmíntica de amplio espectro y son efectivos como agentes antinematodos y protozoos.⁵⁵ Además, muchos de ellos con actividad antifúngica son usados en el tratamiento de frutas y verduras.⁵⁶ La actividad antitumoral presentada por varios de los miembros de la familia de bencimidazoles ha atraído considerable

⁵⁵ (a) J. M. Behnke, D. J. Buttle, G. Stepek, A. Lowe, I. R. Duce *Parasites & Vectors* **2008**, 1. (b) R. K. Prichard *Parasitology* **2007**, 134, 1087. (c) R. K. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna, W. J. Blackhall, T. G. Geary *Parasitology* **2007**, 134, 1073. (d) G. von Samson-Himmelstjerna, W. J. Blackhall, J. S. McCarthy, P. J. Skuce *Parasitology* **2007**, 134, 1077. (e) M. van de Bossche, D. Thienpoint, P. G. Janssens *Chemotherapy of gastrointestinal Helminths*, Springer, Berlin (1985). (f) J. A. Reynoldson, R. C. A. Thompson, B. P. Meloni *Biochem. Protozol.* **1991**, 52, 587.

⁵⁶ (a) H. Das, S. Jayaraman, M. Naika, A. S. Bawa *J. Food Sci. Technol.* **2007**, 44, 237. (b) S. Tahara, J. L. Ingham *Studies in Natural Products Chemistry* **2000**, 22 (*Bioactive Natural Products (Part C)*), 457. (c) L. C. Davidse *Annu. Rev. Phytopathol.* **1986**, 24, 43.

atención en los últimos años.⁵⁷ En este contexto, el estudio de la interacción entre la tubulina (**TUB**) y BZ ha sido un campo de investigación muy activo en vista de su importancia biológica. Es conocido que los BZs actúan formando enlace con el monómero de la β -TUB antes de la dimerización con la α -TUB, bloqueando así la formación de los microtúbulos.⁵⁸ Estudios recientes se han dedicado a identificar el dominio de enlace de la TUB,⁵⁹ y se ha propuesto que BZ interactúa con el sitio de alta afinidad del monómero de la β -TUB.⁶⁰

Para dilucidar la base molecular de este comportamiento se han utilizado diferentes métodos, entre los que cabe destacar ensayos de marcaje de fotoafinidad con el fin de identificar el receptor y el dominio de unión del ligando⁶¹ o los análisis de fluorescencia.⁶² Es, sin embargo, sorprendente la poca atención dedicada a los efectos de luz sobre los bencimidazoles.

⁵⁷ (a) M. E. Steams, M. Wang, K. Fudge *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3073. (b) M. Boiani, M. Gonzalez M. *Min. Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 409. (c) X.Wang H. W. Cheung, A. C. S. Chun, D. Jin, Y. Wong *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 2103.

⁵⁸ (a) M. S. Kwa, J. G. Veenstra, M. Van Dijk, M. H. Roos *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 500. (b) E. S. Didier, J. A. Maddry, P. J. Brindley, M. E. Stovall, P. J. Didier *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2005**, *3*, 419. (c) J. Hoeglund, K. Gustafsson, B. L. Ljungstroem, A. Engstroem, A. Donnan, P. Skuce *Vet. Parasitol.* **2009**, *161*, 60.

⁵⁹ G. von Samson-Himmelstjerna, W. J. Blackhall, J. S. McCarthy, P. J. Skuce *Parasitology* **2007**, *134*, 1077.

⁶⁰ G. W. Luneta, T. G. Geary, R. D. Klein, R. K. Prichard *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *62*, 281.

⁶¹ (a) B. Nare, Z. Liu, R. K. Prichard, E. Georges E. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 2215.

(b) B. Nare, G. Lubegas, R. K. Prichard, E. Georges *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8575.

⁶² L. M. MacDonald, A. Armson, R. C. A. Thompson, J. A. Reynoldson *Molecular & Biochem. Parasitol.* **2004**, *138*, 89.

Así, los estudios fotoquímicos se han limitado a la molécula no sustituida y algunos de sus derivados alquílicos,⁶³ aunque más recientemente el interés se ha centrado en la fotoeliminación de algunos de estos xenobióticos del medio ambiente. Por ejemplo, la influencia de luz UV sobre la persistencia en el medio ambiente del carbendazim, uno de los fungicidas más ampliamente usados y tóxico para seres humanos y animales, ha sido estudiada por varios autores.⁶⁴

En este contexto estamos interesados en el 2-aminobencimidazol (**AMBI**) subestructura común en numerosos derivados bioactivos del bencimidazol (véase figura 3.1). Este fragmento altamente fluorescente está también presente en la estructura de una serie de sensores químicos usados para el reconocimiento selectivo de aniones con un papel importante en varias actividades biológicas como fosfato,⁶⁵ acetato,⁶⁶ ioduro,⁶⁷ dicarboxilato⁶⁸ etc. Se conoce poco sobre el comportamiento fotofísico y/o fotoquímico del AMBI. Los estudios experimentales se limitan al efecto del disolvente y el pH sobre los espectros de absorción y emisión. Además, existen cálculos semiempíricos

⁶³ (a) E. R. Cole, G. Crank, E. Lye *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 2675. (b) G. Crank, A. Mursyldi *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 775.

⁶⁴ (a) P. Mazellier, E. Leroy, B. Legube *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2002**, *153*, 221. (b) A. Boudina, C. Emmelin, A. Baaliouamer, M. F. Grenier-Loustalot, J. M. Cjovelon *Chemosphere* **2002**, *5*, 649. (c) J. P. Escalada, A. Pajares, J. Gianotti, W.A. Massad, S. Bertolotti, F. Amat-Guerri, N. A. Garcia *Chemosphere* **2006**, *65*, 237.

⁶⁵ G. W. Lee, N. Singh, D. O. Jang *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1952.

⁶⁶ T. Y. Joo, N. Singh, G. W. Lee, D. O. Jang *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8846.

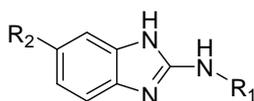
⁶⁷ N. Singh, D. O. Jang *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1991.

⁶⁸ H. S. Kim, K. S. Moon, D. O. Jang *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 97.

para caracterizar el primer estado excitado singlete.⁶⁹ Sin embargo, el estado excitado triplete y otras posibles especies transitorias del AMBI no han sido estudiados hasta la fecha.

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización completa de las propiedades fotofísicas del 2-aminobencimidazol. Su conocimiento es esencial para comprobar la posibilidad de usar AMBI como sonda para estudios de interacción con la tubulina, ya sea mediante cambios en la fluorescencia o estado excitado triplete.

Se ha demostrado recientemente que los estados excitados triplete de algunos fármacos pueden ser usados como sondas para determinar los sitios de unión con las proteínas, debido a que los tiempos de vida son notablemente sensibles al microentorno dentro de dichas biomacromoléculas.⁷⁰



Compuesto	R ₁	R ₂
2-Aminobencimidazol	H	H
Carbendazim	COOCH ₃	H
Mebendazol	COOCH ₃	Ph-CO-
Fenbendazol	COOCH ₃	Ph-S-
Oncodazol	COOCH ₃	Th-CO-

Figura 3.1. Estructura química de algunos derivados del BZ de interés farmacológico.

⁶⁹ (a) P. K. Behera, H. P. Mishra *Indian J. Chem.* **1993**, 32A, 418. (b) A. K. Mishra, S. K. Dogra *Indian J. Chem.* **1985**, 24A, 815.

⁷⁰ (a) M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10134.
 (b) V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9538. (c) V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 423.
 (d) I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11284.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1 Absorción UV de AMBI

En una fase preliminar se estudiaron las propiedades de absorción del 2-aminobencimidazol. En la figura 3.2.1 se muestran los espectros de absorción del 2-aminobencimidazol en distintos disolventes. Se puede observar que la forma y posición de las bandas en disolución acuosa son distintas de las registradas en disolventes orgánicos. Así, el espectro del AMBI en agua muestra una banda centrada a 278 nm mientras en MeOH o MeCN aparecen dos bandas con máximos a aproximadamente 240 nm y 289 nm. Esta diferencia puede ser atribuida al carácter básico del 2-aminobencimidazol debido a la unidad estructural de tipo guanidina que incluye tres átomos de nitrógeno que pueden ser potenciales sitios de protonación.

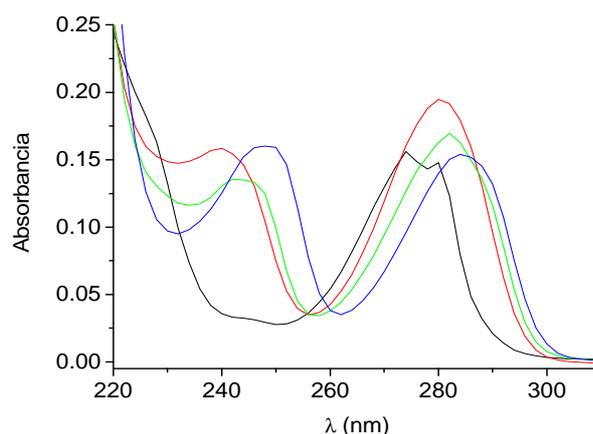


Figura 3.2.1. Espectro de absorción UV del 2-aminobencimidazol en disoluciones de H₂O (■), H₂O a pH = 8.5 (■), MeCN (■) y MeOH (■) registrados para la concentración $c_{\text{AMBI}} = 1 \times 10^{-4}$ M.

En disolución el AMBI puede encontrarse en dos formas distintas. En función del pH existe en forma protonada o neutra. El espectro registrado en disolución acuosa corresponde a la forma protonada, mientras que la forma neutra se observa a $\text{pH} \geq 8.5$.

3.2.2 Fluorescencia del AMBI

A continuación se registraron los espectros de emisión del 2-aminobencimidazol bajo distintas condiciones tras excitar a $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$. La forma y posición de la banda de emisión en MeOH coinciden con las de la banda registrada en MeCN, presentando un máximo a 312 nm, mientras que el máximo de emisión en agua está desplazado a 320 nm (véase figura 3.2.2).

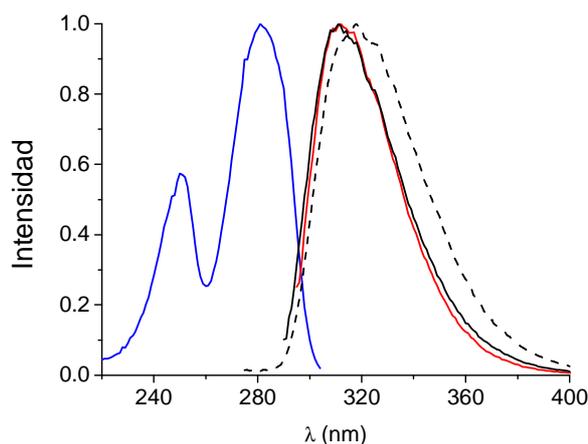


Figura 3.2.2. Espectros de emisión normalizados de 2-aminobencimidazol en MeCN (—), MeOH (—) y H₂O (pH = 8.5) (...) bajo excitación a 280 nm, junto con espectro de excitación en MeCN ($\lambda_{\text{em}} = 312 \text{ nm}$).

La figura 3.2.2 también muestra el espectro de excitación para la emisión a 312 nm en disolución de MeCN. El cruce entre las dos bandas, tras normalización, permite obtener una energía de singlete de 96 kcal/mol. Este valor es similar al obtenido en otros disolventes.

Tabla 3.1. Propiedades fotofísicas del 2-aminobencimidazol. Datos obtenidos bajo excitación a 280 nm.

Disolvente	$\Phi_f(N_2)$	$\Phi_f(\text{aire})$	$\tau(N_2)$ (ns)	k_f (s ⁻¹)
MeCN	0.37	0.31	2.3	4.34×10^8
MeOH	0.45	0.35	2.7	3.70×10^8
H ₂ O (pH = 8.5)	0.01	0.01	0.6-0.8	$ca.10^9$

En la tabla 3.1 se recogen los valores de varias propiedades fotofísicas del AMBI, incluyendo los rendimientos cuánticos de fluorescencia y tiempos de vida bajo distintas condiciones.

Se observa una diferencia significativa entre los resultados obtenidos en disolución orgánica y acuosa. El rendimiento cuántico de fluorescencia en medio acuoso es aproximadamente 40 veces inferior al observado en MeCN o MeOH. El tiempo de vida es también más corto. Este hecho concuerda con observaciones⁷¹ previas y puede atribuirse a una combinación de una desactivación rápida por vías no radiativas y un aumento de la fotoionización que conduce a la formación de radicales centrados en el átomo de nitrógeno.

Además, la fluorescencia del 2-aminobencimidazol es sensible a la presencia de oxígeno (véase figura 3.2.3). Así, se observó una disminución de

⁷¹ (a) P. K. Behera, H. P. Mishra *Indian J. Chem.* **1993**, 32A, 418.

(b) A. K. Mishra, S. K. Dogra *Indian J. Chem.* **1985**, 24A, 815.

rendimiento cuántico tras purgar las muestras con O₂. En MeCN, por ej., los valores varían de $\Phi_F = 0.37$ bajo atmósfera inerte, a $\Phi_F = 0.31$ en disolución al aire y $\Phi_F = 0.19$ bajo oxígeno.

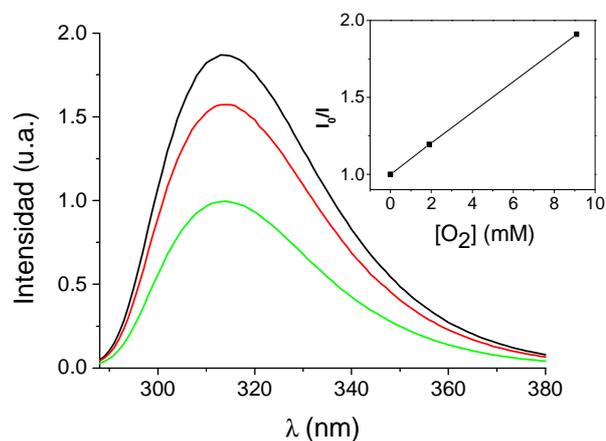


Figura 3.2.3. Espectros de emisión del 2-aminobencimidazol en MeCN bajo N₂ (—), aire (—) y O₂ (—). Inset: Representación de Stern-Volmer obtenida para la desactivación de singlete de AMBI por O₂.

De la representación de Stern-Volmer (véase figura 3.2.3, inset), se ha obtenido el valor de la constante de desactivación de fluorescencia $k = 4.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la disolución de AMBI en MeCN usando O₂ como desactivador. En disolución de MeOH resultó ser $k = 3.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.2.3 Medidas de fotólisis de destello láser

Tras los estudios de absorción y emisión del 2-aminobencimidazol se realizaron ensayos de espectroscopia de absorción transitoria. La fotólisis de destello láser ($\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$) de una disolución del 2-aminobencimidazol en metanol previamente purgada con N_2 reveló especies transitorias con absorción en el rango de 275-520 nm. Los espectros, registrados a tiempos cortos después del pulso de láser, presentaron máximos a 340, 375 y 450 nm.

Sin embargo, la señal con el máximo situado sobre 375 nm desapareció tras unos 16 μs después del pulso de láser (véase figura 3.2.4 A).

La figura 3.2.4. B muestra los espectros de absorción transitoria del 2-aminobencimidazol en disolución acuosa y en acetonitrilo. Se puede comprobar que la forma y posición de las dos bandas obtenidas son muy similares.

En principio, estas señales podrían asignarse al catión radical, al radical y/o a la formación del triplete. Es bien conocido que las aminas son fácilmente fotooxidables debido a su bajo potencial de oxidación dando lugar a un catión radical, cuya desprotonación da lugar a la formación de un radical neutro. Además de las especies radicalarias, se puede esperar también la formación del estado excitado triplete.

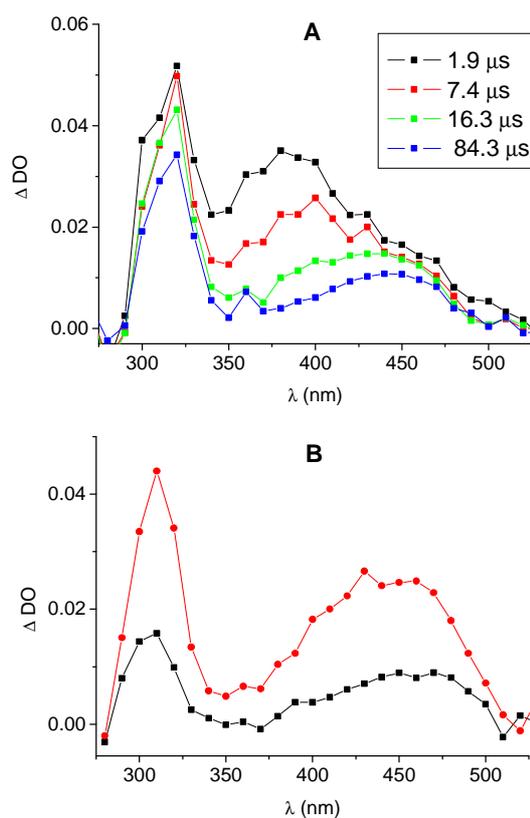


Figura 3.2.4. A: Espectro de absorción transitoria del AMBI ($4.5 \times 10^{-5}\text{M}$) en MeOH tras irradiación a $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$ a los tiempos indicados después del pulso de láser. **B:** Espectros de absorción transitoria del AMBI ($4.5 \times 10^{-5}\text{M}$) en MeCN (■) y disolución acuosa (●) tras irradiación a $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$. Los espectros fueron registrados 1.1 μs después del pulso de láser.

Para elucidar si alguna de las bandas de absorción transitoria puede ser asignada al triplete se llevaron a cabo medidas de fotólisis de destello láser de disoluciones del 2-aminobencimidazol en metanol expuestas al oxígeno y bajo nitrógeno. Para ello las muestras, tras haber sido purgadas con nitrógeno o con oxígeno, fueron excitadas a 266 nm. El espectro diferencia, entre el obtenido

bajo nitrógeno y bajo oxígeno, muestra una banda bien definida centrada a 375 nm que puede ser atribuida a la absorción triplete-triplete del 2-aminobencimidazol (véase figura 3.2.5). El tiempo de vida de triplete fue 8.9 μ s en disolución metanólica.

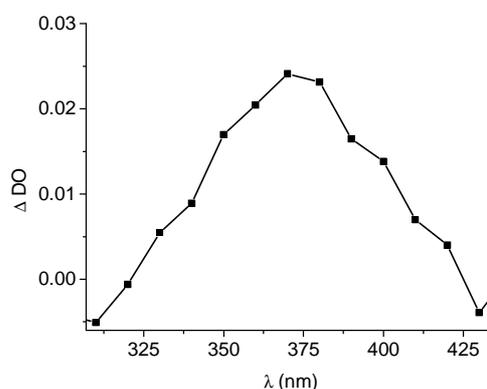


Figura 3.2.5. Espectro resultante de la resta de las señales obtenidas mediante fotólisis de destello láser del 2-aminobencimidazol ($\lambda_{exc} = 266$ nm) en disolución metanólica bajo N_2 y O_2 .

Con el fin de asignar la banda de absorción con el máximo a 450 nm a un radical o a un catión radical se empleó un procedimiento alternativo para generar el radical. Así, se llevó a cabo la irradiación del AMBI disuelto en una mezcla de acetonitrilo y *tert*-butilperóxido (10:1, v/v) a longitud de onda $\lambda_{exc} = 355$ nm. El radical *tert*-butoxilo (**RO•**) generado bajo estas condiciones puede abstraer hidrógeno del AMBI dando lugar a la formación de *tert*-butanol y un radical centrado sobre nitrógeno.⁷² La figura 3.2.6 representa el espectro resultante y el inset muestra la cinética de su formación seguida por el

⁷² H. Paul, R. D. Small, J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4520.

crecimiento monitorizado a $\lambda = 450$ nm. La señal registrada, aunque ruidosa, fue similar a la obtenida a 440 nm por irradiación directa de disoluciones del AMBI en agua, metanol o acetonitrilo. Por ello, el espectro con máximo a 440 nm ha sido asignado a un radical centrado en el nitrógeno.

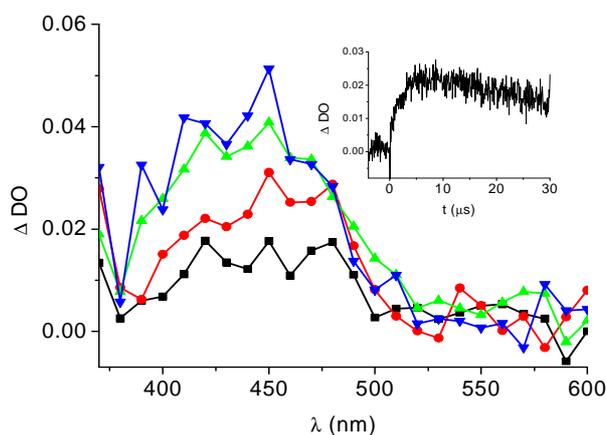


Figura 3.2.6. Espectros de absorción transitoria obtenidos tras la irradiación de una mezcla de acetonitrilo con *tert*-butilperóxido (10:1, v/v) en presencia del AMBI (1×10^{-3} M) a $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm registrados a $0.26 \mu\text{s}$ (■), $1.28 \mu\text{s}$ (●), $3.24 \mu\text{s}$ (▲) y $6.47 \mu\text{s}$ (▼) después del pulso de láser. **Inset:** Perfil de crecimiento monitorizado a 440 nm.

En principio, es posible la formación de dos radicales de ese tipo dependiendo del átomo de hidrógeno involucrado en el proceso. Los cálculos teóricos (véase adelante) demostraron que la abstracción de hidrógeno del grupo amino está más favorecida que la del grupo NH del anillo del bencimidazol.

Otra prueba que apoya la formación de radical se obtuvo mediante la fotólisis de destello láser de la benzofenona (**BP**) en presencia del AMBI a

$\lambda_{exc} = 355$ nm. La señal del triplete de la benzofenona es conocida y presenta un máximo a 525 nm. Al añadir AMBI se observa una rápida desactivación de la señal del triplete de la BP, acompañada por el crecimiento de dos bandas con máximos centrados a 450 nm y 550 nm (véase figura 3.2.7).

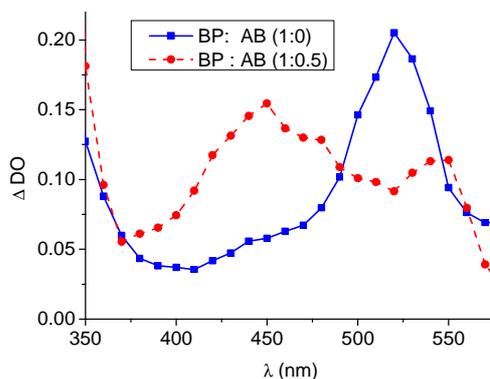


Figura 3.2.7. Espectros de absorción transitoria obtenidos tras la irradiación de una disolución de BP en acetnitrilo (2×10^{-3} M) en ausencia (■) y en presencia (●) del AMBI (1×10^{-3} M) excitando a $\lambda_{exc} = 355$ nm. Ambos espectros fueron registrados a $0.42 \mu\text{s}$ después del pulso de láser.

La transferencia de energía triplete-triplete no es posible bajo estas condiciones, ya que la energía de triplete de la benzofenona (69 kcal/mol) es inferior a la del 2-aminobencimidazol (véase el apartado de cálculos). Así pues las bandas de las especies transitorias pueden ser asignadas al radical derivado del 2-aminobencimidazol (450 nm) y al conocido⁷³ radical cetilo (550 nm). La formación de dichas especies se puede explicar mediante abstracción formal de hidrógeno del grupo amino por el triplete de la benzofenona, ya sea

⁷³ Y. Sakaguchi, H. Hayashi, S. Nagakura *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3177.

directamente o por transferencia de electrón seguida de transferencia de protón.

Las curvas de desaparición correspondientes al radical generado por fotólisis directa a 266 nm se ajustaron a una función monoexponencial; los valores de tiempo de vida en los disolventes usados fueron 359.9 μs en MeOH, 299.1 μs en MeCN y 258.8 μs en disolución acuosa (pH = 8.5).

El valor del coeficiente de absorción molar para **AMBI(-H)•** ha sido estimado en $\epsilon_{450} = 14040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ basándose en cambios de absorbancia absoluta y usando una disolución de BP en acetonitrilo como actinómetro, mientras que el rendimiento cuántico de la formación del radical ha sido determinado como 0.11. Asumiendo que en MeOH y H₂O los valores de ϵ para dicha especie son comparables, el rendimiento cuántico de la formación debe de ser 0.13 y 0.30, respectivamente. La absorbancia transitoria triplete-triplete solo fue reconocida en MeOH, dónde siempre apareció junto con otras señales. Por ello ha sido difícil hacer una estimación precisa del rendimiento cuántico de cruce intersistemas. No obstante, es posible establecer un límite máximo de $\Phi_{\text{CIS}} = 0.4$ para todos los disolventes, teniendo en cuenta la eficiencia de los procesos competitivos.

3.2.4 Cálculos teóricos de DFT

A continuación se procedió a estudiar teóricamente las estructuras del 2-aminobencimidazol en los estados excitados singlete y triplete usando la metodología de DFT (*Density Functional Theory*) al nivel de B3LYP/6-31G(d). La excitación del AMBI permite la formación del estado excitado singlete (S_1) que por cruce intersistemas (CIS) conduce al primer estado excitado triplete

(T_1). La posterior desactivación no radiante puede dar lugar de nuevo al estado fundamental (S_0). Para la excitación vertical del cromóforo al estado singlete S_1 se realizaron cálculos DFT dependientes del tiempo (TD-DFT) al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) sobre las geometrías B3LYP/6-31G(d), obteniéndose una energía de 105.4 kcal/mol.

Se requiere absorción de luz de longitud de onda $\lambda = 271.3$ nm ($f = 0.0047$) para promover al AMBI al primer estado excitado singlete S_1 a este nivel de cálculo. La excitación vertical de B3LYP/6-31G(d) de AMBI en el estado fundamental (S_0) al estado excitado triplete se ha establecido a 89.5 kcal/mol. La relajación del triplete daría lugar a una disminución de la energía del triplete T_1 a 79.6 kcal/mol.

La transferencia de hidrógeno, que tiene lugar durante la interacción del 2-aminobencimidazol con el radical *tert*-butoxilo, puede conducir en principio a la formación de *tert*-butanol y tres posibles radicales neutros, dependiendo de la naturaleza del átomo de hidrógeno cedido por AMBI en el estado fundamental (S_0): N1-H (**R1**), amina-Ha (**R2**) o amina-Hb (**R3**).

En la tabla 3.2 se presentan las energías de AMBI en los estados S_0 , S_1 y T_1 junto con las de las correspondientes especies radicalarias neutras, mientras que la figura 3.2.8 representa las geometrías de los radicales.

Tabla 3.2. (U)B3LYP/6-31G(d). Energía absoluta (E, en u.a.) y relativa (ΔE , en kcal/mol) de los puntos estacionarios involucrados en la fotoactivación/desactivación de AMBI, radicales R1, R2, R3, y complejos moleculares MC1 y MC2. a) Cálculos TD-DFT B3LYP/6-311+G(d,p).

	E	ΔE
AMBI (S₀)	-435.226323	-
AMBI (S₁)	-435.183053 ^a	105.4 ^a
AMBI (T_{1v})	-435.083630	89.5
AMBI (T₁)	-435.099479	79.6
R1	-434.585064	1.4
R2	-434.587344	0.0
R3'	-434.578191	4.3
<i>ter</i> -BuO•	-233.006172	-
<i>ter</i> -BuOH	-233.670958	-
MC1a	-668.246103	-8.5
MC1b	-668.246153	-8.6
MC2-1	-668.278841	-29.1
MC2a	-668.280039	-29.8
MC2b	-668.261597	-18.3

La abstracción del hidrógeno Ha del átomo de nitrógeno de la amina da lugar a la formación de la especie radicalaria **R2** más estable. Por otra parte, las energías de los radicales **R1** y **R3** formados por abstracción de los hidrógenos enlazados al nitrógeno N1 o del hidrógeno Hb unido al nitrógeno del grupo amino son de 1.4 y 4.3 kcal/mol más altas respectivamente.

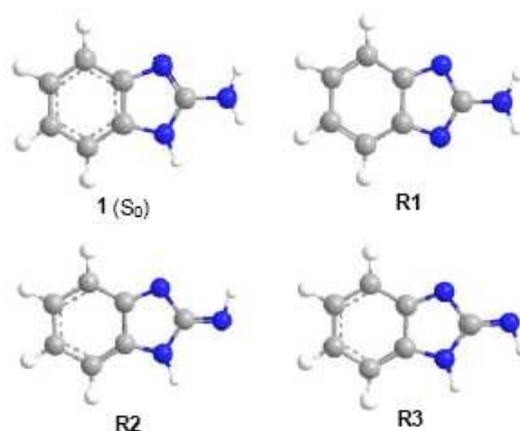


Figura 3.2.8. Geometrías de los radicales neutros formados tras interacción entre 2-aminobenzimidazol y radical *tert*-butoxilo.

Tanto el radical *tert*-butoxilo como *tert*-butanol pueden formar puentes de hidrógeno con 2-aminobenzimidazol en el estado fundamental (S_0) o con los radicales neutros. En vista de este hecho se optimizaron los correspondientes complejos moleculares **MC1** y **MC2** cuyas energías absolutas y relativas se presentan en la tabla 3.2, mientras que la figura 3.2.9 representa las geometrías de dichos complejos moleculares. El radical *tert*-butoxilo solo puede formar dos complejos moleculares diferentes porque su átomo de oxígeno está unido por el puente de hidrógeno a los hidrógenos del grupo N-H y amina-Ha simultáneamente, formando el complejo molecular **MC1a**. Ambos complejos moleculares **MC1a** y **MC1b** son más estables (8.5 y 8.6 kcal/mol, respectivamente) que los reactivos por separado (**AMBI+RO \cdot**) como consecuencia de la formación del puente de hidrógeno. Se pueden formar tres nuevos productos por transferencia de hidrógeno de 2-aminobenzimidazol a **RO \cdot** en **MC1a** y **MC1b**. El complejo molecular **MC2b** es 9.7 kcal/mol más estable que el **MC1b** mientras que las energías de **MC2-1** y **MC2a** son 20.5 y

21.3 kcal/mol inferiores a la de **MC1a**. Las abstracciones de hidrógeno son altamente exotérmicas y por ello termodinámicamente favorecidas. Cabe destacar que la energía relativa de **R1** disminuye 0.8 kcal/mol frente a **R2** tras la formación del complejo molecular correspondiente. Por otra parte, la formación de **MC2b** está desfavorecida termodinámicamente en 11.6 kcal/mol respecto a **MC2a** debido a que el complejo molecular **MC2a** forma dos puentes de hidrógeno, mientras que **MC2b** solo puede formar uno (véase la figura 3.2.9).

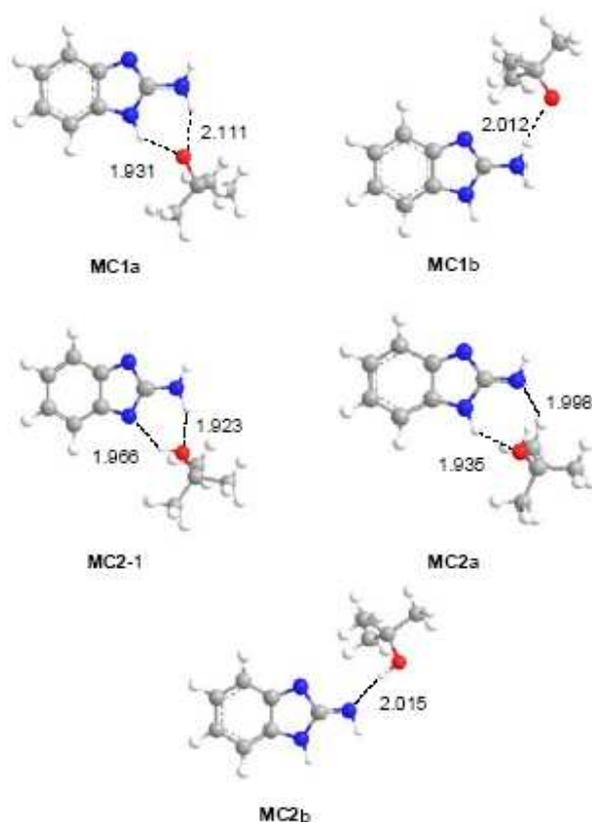


Figura 3.2.9. Estructuras B3LYP/6-31G* de los complejos moleculares. Las distancias se muestran en Angstroms (Å).

La figura 3.2.8 muestra las geometrías del 2-aminobencimidazol en estado fundamental (S_0) y los correspondientes radicales neutros **R1**, **R2** y **R3**. Las longitudes de enlace N-H en 2-aminobencimidazol (S_0) son de 1.007 Å (N1-H), 1.011 Å (N-Ha) y 1.011 Å (N-Hb). Mientras que el enlace N-Ha está localizado cerca del plano del AMBI, el ángulo dihédrico N1-C2-N-Ha es 10 grados. El enlace N-Hb está girado - 43 grados. Estos parámetros geométricos apuntan a cierta piramidalización del átomo de N. El enlace N1-H está algo girado, formando un ángulo de 14 grados. En el caso del radical **R1**, la longitud de los enlaces N-H es 1.007 Å; los dos átomos de hidrógenos del grupo amina están localizados en el plano del AMBI. Dicha disposición apunta a que el átomo de nitrógeno de la amina presenta una hibridación sp^2 . Las longitudes de los enlaces N-H en el radical **R2** son 1.008 Å (N1-H) y 1.020 Å (HN-H), mientras que para el radical **R3** se obtuvieron valores de 1.009 Å (N1-H) y 1.025 Å (HN-H). Los enlaces N-H están situados en el plano molecular tanto en el caso de **R2** como en **R3**. La longitud de los enlaces C2-NH₂ en estos radicales son: 1.338 (**R1**), 1.298 (**R2**) 1.303 (**R2**) Å. Finalmente, la longitud de los puentes de hidrógeno en los complejos moleculares (MCs) se encuentran dentro del estrecho intervalo entre 1.93 y 2.11 Å, lo cual indica que se trata de interacciones de puente de hidrógeno similares.

3.3. Conclusiones

Para entender el comportamiento fotofísico del 2-aminobencimidazol (**AMBI**) se han realizado estudios de fluorescencia, fotólisis de destello láser (FDL) y cálculos de DFT (*"Density Functional Theory"*). El tiempo de vida y el rendimiento cuántico de la emisión dependen del disolvente. La fotólisis de destello láser del AMBI, a $\lambda_{exc} = 266$ nm en disolución de MeCN, produce una

especie transitoria identificada como el radical **AMBI(-H)•** por comparación con especies generadas mediante irradiación de *tert*-butilperóxido (ROOR) en presencia de AMBI. Además, en MeOH fue detectada una especie transitoria asignada al estado excitado triplete. Estudios teóricos DFT del proceso apoyan la formación del complejo AMBI...OR, en el que se produce la transferencia de hidrógeno desde el nitrógeno al oxígeno, originando los radicales **AMBI(-H)•** mencionados previamente.

Resumiendo, se ha demostrado que el 2-aminobencimidazol es un compuesto fotoactivo que tras la excitación permite la detección de una variedad de señales potencialmente útiles para estudios de las interacciones supramoleculares con proteínas y otras biomoléculas. Se puede promover al estado excitado singlete, con el máximo de emisión a 312 nm, rendimiento cuántico de *ca.* 0.4 y tiempo de vida de *ca.* 2.5 ns. Las propiedades de la fluorescencia son sensibles al entorno ya que tanto la intensidad de la emisión como el tiempo de vida disminuyen notablemente en el medio acuoso y/o bajo condiciones aeróbicas. La espectroscopia de absorción de las especies transitorias revela la formación de un estado excitado triplete con máximo centrado sobre 375 nm, acompañado por un radical centrado sobre nitrógeno registrado a 450 nm. La contribución relativa de dichas especies al espectro depende de la naturaleza del disolvente empleado. Así, el triplete se observa con más claridad en disoluciones metanólicas. Los cálculos teóricos DFT han proporcionado una estimación razonable de las energías de los estados excitados y han permitido explicar la formación del radical centrado sobre nitrógeno, justificando la asignación como resultado de una abstracción formal del hidrógeno del grupo amino exocíclico.

3.4. Parte experimental

3.4.1. Materiales y disolventes

2-Aminobencimidazol, S-flurbiprofeno, peróxido de *tert*-butilo y benzofenona fueron suministrados por Aldrich. Su pureza ha sido comprobada mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y análisis por cromatografía líquida de alta resolución ("*High Performance Liquid Chromatography*" - HPLC).

Los disolventes de calidad de HPLC (acetonitrilo y metanol) fueron suministrados por Scharlau y usados sin purificación previa.

3.4.2. Espectros de absorción

Los espectros de absorción en los distintos disolventes fueron realizados en un UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35.

3.4.3. Medidas de fluorescencia

Las medidas de los espectros de emisión se llevaron a cabo usando un sistema espectrofluorimétrico equipado con un monocromador de emisión M 300 con el rango de longitud de onda entre 200-900 nm y no están corregidos. Todos los espectros de emisión se registraron empleando cubetas de cuarzo Suprasil 10 x 10 mm² con 4 ml de capacidad. Las disoluciones fueron purgadas, durante 10 minutos como mínimo, con nitrógeno u oxígeno previamente a las medidas de fluorescencia. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron determinados usando como referencia el S-flurbiprofeno (ácido S-2-fluoro- α -

metyl-4-bifenilacético) en metanol como disolvente ($\Phi_F = 0.27$ a $\lambda_{exc} = 281$ nm en metanol).⁷⁴ Las absorbancias de las muestras a la longitud de onda de excitación fueron inferiores a 0.1. Las aperturas de las rendijas de emisión y excitación se mantuvieron constantes durante los experimentos de emisión. Para las medidas de fluorescencia de tiempo resuelto se ha usado el recuento de fotones convencional. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22°C).

3.4.4. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se llevaron a cabo usando un láser pulsado de Nd-YAG (*Quantel Brilliant*, de 355 nm, 5 ns fwhm, 14 mJ por pulso acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 *Luzchem*. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de xenon, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio *Tektronix 9 bit* de la serie TDS-3000 de 9 bit con ancho de banda de 300 MHz, un fotomultiplicador compacto y fuente de alimentación, un portacubetas, conectores de fibra óptica, y programa desarrollado en el entorno *LabVIEW* de *National Instruments*. El equipo de FDL proporciona un voltaje de pulsos de corte de 5 V con frecuencia y retardo de señal programables. Todos los espectros se registraron empleando cubetas de cuarzo de 10x10 mm² con capacidad de 4 ml; el diámetro del punto de disparo en la cubeta es aproximadamente 4 mm. Algunas de las muestras fueron purgadas con N₂ u O₂ durante 20 min antes de medir. La absorbancia de las muestras se mantuvo entre 0.2 y 0.3 a las

⁷⁴ M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038.

longitudes de onda correspondientes. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22°C).

3.4.5. Métodos computacionales

Los cálculos de DFT (*"Density Functional Theory"*) se llevaron a cabo usando el funcional B3LYP⁷⁵ junto con conjunto de bases estándar 6-31G.⁷⁶ Para el estudio de los estados excitados triplete y especies radicalarias se empleó el formalismo de capa abierta UB3LYP. Las optimizaciones geométricas se realizaron usando el método de Berny.⁷⁷ Las energías verticales de los estados excitados singlete fueron calculadas usando el método DFT dependiente del tiempo (TD-DFT)⁷⁸ a nivel B3LYP/6-311+G(d,p). Todos los cálculos se llevaron a cabo usando el conjunto de programas Gaussian 03.⁷⁹

⁷⁵ Y. Sakaguchi, H. Hayashi, S. Nagakura *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3177.

⁷⁶ W. J. Hehre, L. Radom, P. V. R. Schleyer, J. A. Pople *Ab initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, **1986**.

⁷⁷ (a) H. B. Schlegel *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 214-218. (b) H. B. Schlegel "Geometry Optimization on Potential Energy Surface," in *Modern Electronic Structure Theory*. D. R. Yarkony ed., World Scientific Publishing: Singapore, **1994**.

⁷⁸ (a) R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454.

(b) M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahud *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439.

⁷⁹ J. A. Pople *et al.*. Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

Capítulo 4

*Mecanismo de abstracción de hidrógeno del 2-amino-
bencimidazol por tripletes $n\pi^*$ o $\pi\pi^*$ de cetonas aromáticas*

4.1. Introducción

La abstracción de hidrógeno es probablemente la reacción química mejor conocida del estado excitado triplete de las cetonas aromáticas.⁸⁰ Así se han realizado estudios sobre la fotorreducción de la benzofenona (**BP**) por hidrocarburos,⁸¹ fenoles,⁸² tioles,⁸³ éteres⁸⁴ y aminas⁸⁵ durante cinco décadas.

⁸⁰ (a) J. C. Scaiano *J. Photochem.* **1973**, *2*, 81. (b) N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, **2008**.

⁸¹ (a) T. Yamada, L. A. Singer *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3926. (b) K. Hamanoue, M. Shiozaki, T. Nakayama, H. Teranishi *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *129*, 186.

⁸² (a) P. K. Das, M. V. Encinas, J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4154. (b) E. C. Lathior, W. J. Leigh *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 291. (c) W. J. Leigh, E. C. Lathior, M. J. St. Pierre *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12339.

⁸³ (a) M. von Raumer, P. Suppan, E. Haselbach *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 263. (b) E. N. Step, N. J. Turro, M. E. Gande, P. P. Klemchuk *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1993**, *74*, 203.

⁸⁴ R. D. Small Jr., J. C. Scaiano. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 2064.

⁸⁵ (a) A. Beckett, G. Porter *Trans. Faraday Soc.* **1963**, *59*, 2038. (b) S. Inbar, H. Linschitz, S. G. Cohen *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1679. (c) J. B. Guttenplan, S. G. Cohen *J. Org.*

Básicamente, la reactividad parece estar gobernada por dos factores: la naturaleza del dador de hidrógeno y la configuración electrónica del estado excitado de la cetona. El proceso puede tener lugar por diversos mecanismos en función de la especie dadora. Dichos mecanismos pueden cambiar desde la abstracción pura de hidrógeno, como en el caso de los hidrocarburos, hasta la transferencia electrónica, como ocurre con las aminas, actuando el compuesto carbonílico excitado como aceptor. Es conocida la capacidad del estado excitado triplete $n\pi^*$ de las cetonas aromáticas de abstraer eficazmente los hidrógenos alifáticos o bencílicos formando radicales cetilo.⁸⁶ En cambio, es muy rara la abstracción directa de hidrógeno por triplete $\pi\pi^*$ de las cetonas aromáticas.⁸⁷

La naturaleza del primer estado excitado triplete viene, en este contexto, determinada por el tipo y posición de los sustituyentes del anillo aromático y por la polaridad del disolvente. Los grupos electrón dadores y disolventes polares estabilizan al triplete $\pi\pi^*$, teniendo como consecuencia la disminución de la reactividad.⁸⁸ La benzofenona (BP), por ejemplo, presenta un triplete $n\pi^*$ tanto en disolventes polares como apolares. En cambio, el 2-benzoiltiofeno (BT) presenta un triplete $\pi\pi^*$ en ambos tipos de disolventes.⁸⁹

Chem. **1973**, *38*, 2001. (d) S. Arimitsu, H. Masuhara, N. Mataga, H. Tsubomura *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 1255. (e) H. Miyasaka, K. Morita, K. Kamada, T. Nagata, M. Kiri, N. Mataga *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1991**, *64*, 3229. (f) M. Hoshino, H. Shizuka *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 714.

⁸⁶ K. Okada, M. Yamaji, H. Shizuka *J. Chem. Soc.; Faraday Trans.* **1988**, *94*, 861.

⁸⁷ P. Traynard, J. P. Blanche *J. Phys. Chem.* **1972**, *69*, 284.

⁸⁸ P. J. Wagner, R. J. Truman, J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7093.

⁸⁹ (a) R. S. Becker, G. Favaro, G. Poggi, A. Romani *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1410.

(b) D. R. Arnold, R. J. Birtwell *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4599.

Es interesante que en el caso de la 4-metoxibenzofenona (**MBP**) y la 4,4'-dimetoxibenzofenona (**DMBP**) se observa una inversión de $n\pi^*$ a $\pi\pi^*$ con el aumento de polaridad del medio.^{90, 91} Sin embargo, la 4-carboxibenzofenona (**CBP**) se comporta como el compuesto no sustituido.⁹² Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre el uso del bencimidazol o sus derivados como potenciales dadores de hidrógeno, a pesar de la atención dedicada a la fotorreducción de la benzofenona.

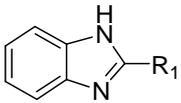
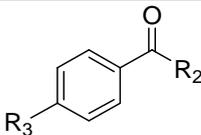
El objetivo de este trabajo ha sido llevar a cabo un estudio detallado sobre la fotorreactividad de algunos derivados de la benzofenona (BP) con el 2-aminobencimidazol (AMBI). Se ha estudiado también el bencimidazol (BZ) para comparación. Mediante la técnica de fotólisis de destello láser (FDL) se ha establecido que tiene lugar la abstracción de hidrógeno mediante la detección del espectro de absorción transitoria de radicales cetilo (**BPH•**) derivados de la benzofenona, junto a los radicales (**AMBI-H•**) derivados del 2-aminobencimidazol. A continuación se han realizado cálculos teóricos sobre las interacciones entre la benzofenona (BP) y el 2-benzotiofeno (BT), en sus estados excitados triplete, con el 2-aminobencimidazol (AMBI). Los resultados demuestran que el proceso es iniciado por transferencia del electrón del 2-aminobencimidazol a las cetonas aromáticas.

⁹⁰ F. Boscá, G. Cosa, M. A. Miranda, J. C. Scaiano *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 704.

⁹¹ E. C. Lathioor, W. J. Leigh *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 291.

⁹² S. Inbar, H. Linschitz, S. G. Cohen *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7323.

Figura 4.1. Estructuras químicas de los derivados de bencimidazol y de la benzofenona.

		R^1		R^2	R^3
					
2- Aminobencimidazol (AMBI)		NH ₂	(BP)	Ph	H
Bencimidazol (BZ)		H	(BT)	Th	H
			(MBP)	Ph	OMe
			(DMBP)	C ₆ H ₄ OMe	OMe
			(CBP)	C ₆ H ₄ COOH	H

4.2. Resultados y discusión

4.2.1 Estudios de fotólisis de destello láser

Se realizaron estudios dinámicos sobre la reacción del 2-aminobencimidazol (AMBI) con el estado triplete de las cetonas aromáticas BP, BT, MBP, DMBP y CBP (véase figura 4.1.) en acetonitrilo y disoluciones acuosas tamponadas bajo excitación por láser (Nd:YAG) a longitud de onda 355 nm.

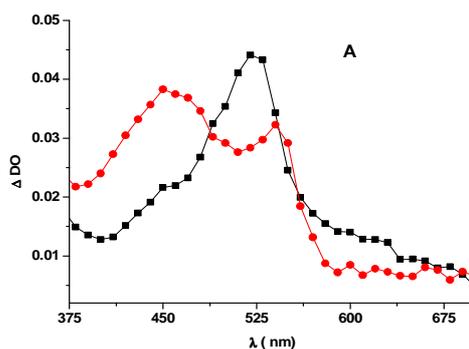
Tras la fotólisis de BP en acetonitrilo, bajo condiciones anaeróbicas, se registró una especie transitoria en el intervalo 300-700 nm. El espectro coincide con el estado excitado triplete de la benzofenona descrito previamente.⁹³ La desactivación de dicho triplete por el AMBI dio lugar a la

⁹³ (a) P. K. Das, M. V. Encinas, J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4154.

(b) E. C. Lathioor, W. J. Leigh *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 291.

(c) W. J. Leigh, E. C. Lathioor, M. J. St. Pierre *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12339.

formación de dos nuevas bandas de absorción centradas sobre 450 y 530 nm. Los cambios en el espectro de absorción se presentan en la figura 4.2. A y son consistentes con la generación del radical cetilo (**BPH•**) derivado de la benzofenona junto al radical (**AMBI-H•**) derivado del 2-aminobencimidazol. Resultados similares se obtuvieron para BT (véase figura 4.2. B), aunque los máximos del triplete y del radical cetilo (**BT-H•**) aparecieron, como era de esperar, a longitudes de onda diferentes (600 y 580 nm, respectivamente).^{94, 95} En principio, sería posible la formación de dos radicales **AMBI-H•** dependiendo del átomo de hidrógeno abstraído: la transferencia de hidrógeno del grupo amino conduciría a la formación del radical aminilo **A**, mientras que la abstracción del hidrógeno unido al nitrógeno del anillo daría lugar al radical **B** (véase figura 4.3.).



⁹⁴ (a) R. S. Becker, G. Favaro, G. Poggi, A. Romani *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1410.

(b) D. R. Arnold, R. J. Birtwell *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4599.

⁹⁵ J. Pérez-Prieto, F. Boscá, R. E. Galian, A. Lahoz, L. R. Domingo, M. A. Miranda *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5104.

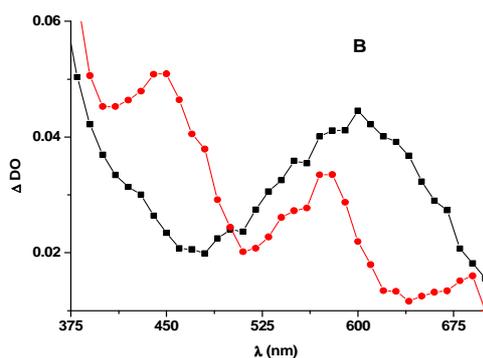


Figura 4.2. A: Espectros de absorción transitoria obtenidos tras irradiación a 355 nm de las siguientes disoluciones: benzofenona (4×10^{-3} M) en acetonitrilo en ausencia (■) y en presencia (●) de 2-aminobenzimidazol (1×10^{-4} M). Ambos espectros fueron registrados 2.56 μ s después del pulso de láser. **B:** Espectros de absorción transitoria obtenidos tras irradiación a 355 nm de las disoluciones de 2-benzoylthiopheno (1×10^{-3} M) en ausencia (■) y en presencia (●) de 2-aminobenzimidazol (7×10^{-4} M). Ambos espectros fueron registrados 0.48 μ s después del pulso de láser.

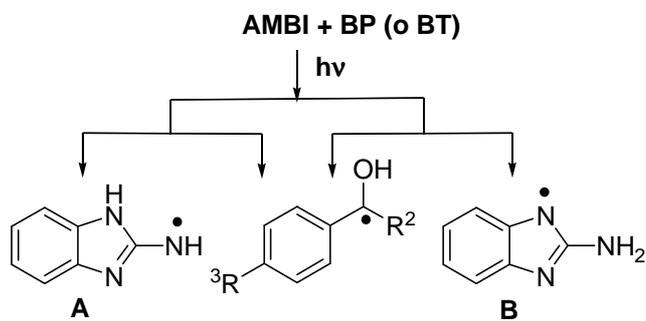


Figura 4.3. Fotorreacción entre 2-aminobenzimidazol y las cetonas BP o BT y formación de posibles pares radicalarios.

Se determinaron las constantes de desactivación del triplete por AMBI tras realizar las medidas del tiempo de vida de BP y BT en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de AMBI, usando las curvas de desaparición registradas a 620 y 640 nm, respectivamente. Los valores de las constantes de desactivación se obtuvieron a partir de las representaciones de Stern-Volmer, para concentraciones bajas del desactivador (menos de 0.1 mM), y de acuerdo con la ecuación (1)

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k_D [1] \quad (1)$$

donde τ_0 representa el tiempo de vida de triplete en disolución de acetonitrilo y τ es el tiempo de vida registrado en presencia del desactivador (véase figura 4.4.A). Los valores de la constante de desactivación fueron $k_D = 6.2 \times 10^9$ y $3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente. La similitud entre las dos constantes indica que la reducción de BP y BT no es abstracción pura de hidrógeno, sino más bien apunta a una transferencia de carga seguida de transferencia de protón. Cabe destacar que a concentraciones altas del desactivador se observaron claras desviaciones de la linealidad, indicando la formación de complejos (véase figura 4.4. B).⁹⁶ La contribución de este proceso puede explicar la observación de que las constantes de desactivación determinadas (véase arriba) fueron algo menores que el límite de difusión en los disolventes empleados.

⁹⁶ J. Pérez-Prieto, R. E. Galian, M. C. Morant-Miñana, M. A. Miranda *Chem. Commun.* **2005**, 3180.

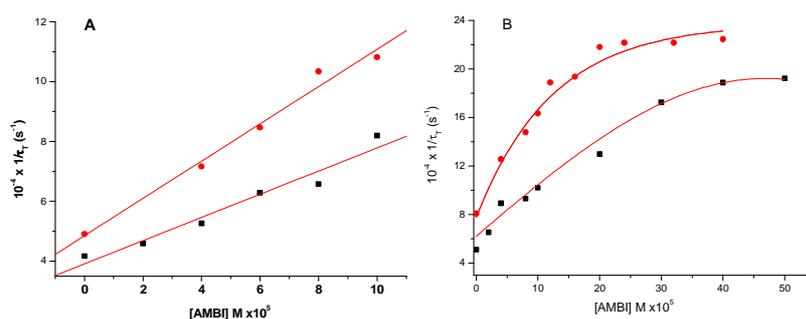


Figura 4.4. Representaciones de Stern-Volmer obtenidas para la desactivación de triplete de la benzofenona (●) y 2-benzotiofeno (■) por 2-aminobencimidazol mediante FDL a 355 nm. A: concentraciones de desactivador hasta 0.1 mM B: concentraciones de desactivador hasta 0.5 mM

A continuación, se llevó a cabo como experimento control, la fotólisis de destello láser de la benzofenona en presencia del compuesto modelo bencimidazol (BZ), que solo da lugar a la formación de un radical de tipo B. Hay que destacar que debido a su alta energía (75 kcal/mol)⁹⁷ no es posible la formación del triplete de BZ por transferencia desde el triplete de la BP (69.2 kcal/mol).⁹⁸ Por otra parte, la transferencia de electrón desde BZ a la BP en estado excitado está desfavorecida termodinámicamente. El valor de ΔG obtenido mediante la ecuación de Rehm-Weller⁹⁹ usando el potencial de oxidación de BZ ($E_{ox} = 1.56$ V),¹⁰⁰ el potencial de reducción de BP ($E_{red} = -1.78$

⁹⁷ A. Catalán, *J. Chem. Phys.* **2004**, 303, 205.

⁹⁸ S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc.; New York, 2nd edn. **1993**.

⁹⁹ D. Rehm, A. Weller *Isr. J. Chem.* **1970**, 8, 259.

¹⁰⁰ B. G. Ramsey *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 2093.

V)¹⁰¹ y la anteriormente mencionada energía de triplete de la BP, es positivo ($\Delta G = 8$ kcal/mol) e indica que se trata de un proceso no espontáneo. De hecho, la FDL de BP en presencia de BZ permitió la detección del espectro de una especie transitoria coincidente con el del triplete de la cetona sin la aparición de ninguna nueva señal. Adicionalmente, no se detectaron cambios del tiempo de vida del triplete de BP descartando la posible desactivación dinámica por BZ. Podemos concluir que el responsable de la transferencia electrónica, en el proceso de la reducción de la BP, es el grupo amino del AMBI con la consiguiente formación del radical de tipo A. Los cálculos termodinámicos realizados usando la ecuación de Rehm-Weller¹⁰² y conociendo el potencial de oxidación del AMBI ($E_{ox} = 0.60$ V), confirmaron el carácter espontáneo ($\Delta G = -12,8$ kcal/ mol) de los procesos redox. La misma tendencia se observó en el caso de BT, obteniéndose un valor de $\Delta G = - 6.6$ kcal/ mol tras la aplicación de la ecuación de Rehm-Weller, usando los correspondientes valores del potencial de reducción $E_{red} = - 1.8$ (V)³⁴ y la energía de triplete $E_T = 63.2$ kcal/ mol.¹⁰³

En principio, la funcionalización de los anillos aromáticos de la benzofenona con sustituyentes electrón dadores debería tener una influencia significativa sobre el proceso. Por este motivo se realizaron estudios sobre la abstracción de hidrógeno del AMBI por MBP y DMPB en estado excitado. El triplete de estas cetonas aromáticas presenta la configuración $n\pi^*$ en disolventes apolares, mostrando el comportamiento típico de la benzofenona. Sin embargo, el espectro de absorción de la especie transitoria en disoluciones

¹⁰¹ E. C. Lathioor, W. J. Leigh *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 291.

¹⁰² D. Rehm, A. Weller *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259.

¹⁰³ R. S. Becker, G. Favaro, G. Poggi, A. Romani *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1410.

acuosas revela máximos a 450 y 680 nm, atribuidos al estado excitado triplete $\pi\pi^*$.¹⁰⁴ (véase figura 4.5. A).

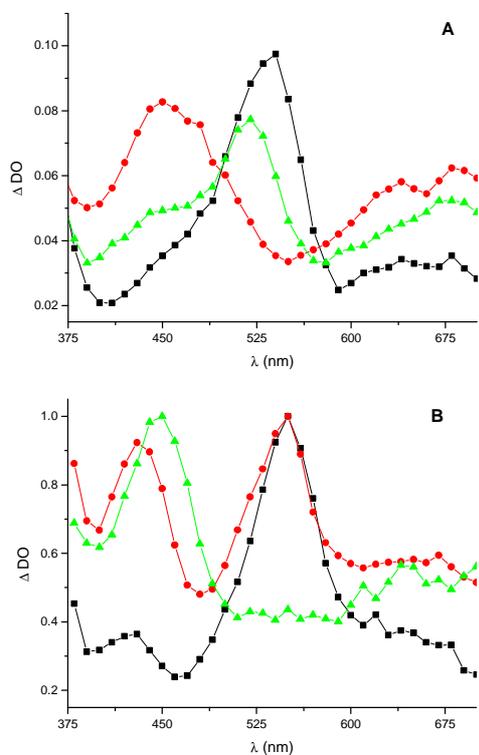


Figura 4.5. Espectros de absorción transitoria obtenidos mediante FDL (355 nm) de **A:** 4-metoxibenzofenona en acetonitrilo 0.56 μ s después del pulso de láser (\blacktriangle), en PBS/acetonitrilo (3:1, v/v) 0.88 μ s después del pulso de láser (\bullet), y en ciclohexano 0.12 μ s después del pulso de láser (\blacksquare), **B:** (Normalizado) 4,4'-dimetoxibenzofenona en acetonitrilo 0.56 μ s después del pulso de láser (\bullet), en PBS/acetonitrilo (3:1, v/v) 0.88 μ s después del pulso de láser (\blacktriangle) y en ciclohexano 0.12 μ s después del pulso de láser (\blacksquare).

¹⁰⁴ F. Boscá, G. Cosa, M. A. Miranda, J. C. Scaiano *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 704.

En realidad, el resultado de la FDL de MBP en acetonitrilo es un espectro de absorción transitoria similar al previamente descrito en ciclohexano,³⁶ solo que en este caso presenta mayor contribución de las bandas a 450 y 680 nm (véase figura 4.5. A). Los cambios del espectro en presencia de AMBI fueron consistentes con la formación del par de radicales aminilo/cetilo con sus correspondientes bandas características de **AMBI-H•** a 450¹⁰⁵ y **MBP-H•** a 550 nm.¹⁰⁶

A continuación se procedió a la determinación de la constante de desactivación del triplete de MBP por AMBI en acetonitrilo, midiendo a 520 ($n\pi^*$) y 680 ($\pi\pi^*$) nm. Los valores obtenidos fueron $4.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $3.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (véase tabla 4.1). Cabe destacar que de esta forma se estudiaron las cinéticas de desactivación de dos tripletes de distinta configuración electrónica de la misma cetona, presentes simultáneamente en el mismo medio y bajo las mismas condiciones experimentales.

El espectro de absorción de la MBP en una mezcla de agua tamponada y acetonitrilo (3:1, v/v) es muy diferente del obtenido en acetonitrilo. Se detectaron tres bandas centradas sobre 350 (intensidad mediana), 450 (alta), y 680 nm (amplia) que coinciden con el espectro del triplete $\pi\pi^*$ de MBP descrito previamente (véase figura 4.5. A).¹⁰⁷ Tras la comparación de las trazas registradas 0.24 μs después del pulso del láser en ausencia y en presencia del

¹⁰⁵ V. Viudes, P. Bartovsky, L. R. Domingo, R. Tormos, M. A. Miranda *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6608.

¹⁰⁶ M. Sakamoto, X. Cai, M. Hara, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 8147.

¹⁰⁷ F. Boscá, G. Cosa, M. A. Miranda, J. C. Scaiano *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 704.

AMBI, se reconocieron las señales residuales correspondientes a los radicales aminilo y cetilo (450 y 550 nm). La determinación de la constante de desactivación se realizó a longitud de onda 680 nm y su valor fue de $5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Los estudios se extendieron a la DMBP en medios orgánico o acuoso. Así, la FDL de DMBP en acetonitrilo permitió registrar un espectro con cuatro máximos a 360 (intensa), 425 y 550 (mediana) y 675 nm (amplia). El espectro obtenido en una disolución de acetonitrilo en agua tamponada (1:3 v/v) mostró dos bandas (a 370 y 670 nm) de intensidad mediana y una banda intensa con el máximo sobre 450 nm. Es posible asignar la banda de 425-450 nm al triplete $\pi\pi^*$ y la de 550 nm al triplete $n\pi^*$ por comparación con el espectro de MBP en la misma mezcla de disolventes. En presencia de AMBI se observó una disminución de la intensidad de las bandas a 425 y 550 nm y la absorción residual después de tiempos largos fue consistente con la formación del par radicalario aminilo/cetilo¹⁰⁸, sin embargo, en este caso se produjo un solapamiento con las bandas del triplete. Las constantes de desactivación se obtuvieron mediante representaciones de Stern-Volmer. Los valores determinados fueron 2.7 y $3.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para los tripletes $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$ respectivamente (véase tabla 4.1)

¹⁰⁸ M. Sakamoto, X. Cai, M. Hara, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 8147.

Tabla 4.1. Desactivación de tripletes $n\pi^*$ y $\pi\pi^*$ de derivados de la benzofenona por 2-aminobencimidazol.

Compuesto	λ (nm)	disolvente	k_D ($M^{-1} s^{-1}$)
BP	620 ($n \pi^*$)	MeCN	6.2×10^9
BT	640 ($\pi \pi^*$)	MeCN	3.9×10^9
MBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN	3.9×10^9
	520 ($n \pi^*$)	MeCN	4.0×10^9
MBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN:PBS (1:3)	5.4×10^9
MBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN:PBS (D_2O) (1:3)	4.2×10^9
DMBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN	2.8×10^9
	550 ($n \pi^*$)	MeCN	3.2×10^9
DMBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN:PBS (1:3)	3.9×10^9
DMBP	680 ($\pi \pi^*$)	MeCN:PBS (D_2O) (1:3)	3.3×10^9
CBP	680 ($n \pi^*$)	MeCN	8.0×10^9

A continuación se llevó a cabo el experimento en medio acuoso en el que solo se forma el triplete $\pi\pi^*$. La correspondiente constante de desactivación se determinó a la longitud de onda 680 nm y resultó ser $3.9 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$. Para comprender mejor los aspectos mecanísticos de la reacción se realizaron estudios sobre el comportamiento de los tripletes de MBP y DMBP en una mezcla de acetonitrilo/PBS (D_2O) (1:3). Las constantes de desactivación obtenidas bajo estas condiciones fueron $4.2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ y $3.3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ respectivamente (véase tabla 4.1). Así, los efectos isotópicos observados fueron $k_H/k_D = 1.23$ para MBP y 1.18 para DMBP. Dichos valores están dentro del intervalo esperado para la abstracción de hidrógeno por tripletes $\pi\pi^*$ de

cetonas¹⁰⁹ y son compatibles con el mecanismo de transferencia de electrón seguida por transferencia de protón.

Finalmente, se realizaron también ensayos de FDL sobre 4-carboxibenzofenona (CBP), en cuyo caso el sustituyente en el anillo aromático es de naturaleza electrón aceptor. El espectro obtenido en disolución de acetonitrilo posee máximos centrados sobre 350 y 550 nm, descrito previamente y asignado con anterioridad al triplete $n\pi^*$ de CBP.¹¹⁰ La desaparición de la banda a 550 nm, en presencia de AMBI, estuvo acompañada por la formación de nuevas especies transitorias con máximos sobre 450 y 570 nm que fueron asignados al par de radicales aminilo/cetilo. La constante de desactivación ($8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) resulto ser más alta que los valores obtenidos para los demás derivados de la benzofenona en el mismo disolvente.

4.2.2 Cálculos teóricos de DFT

El mecanismo de reacción de la abstracción de hidrógeno del 2-aminobencimidazol (AMBI) por el estado excitado triplete de la benzofenona (BP) o del 2-benzoiltiofeno (BT) se ha estudiado teóricamente usando métodos DFT (“*Density Functional Theory*”). En el estado fundamental el AMBI puede formar complejos moleculares con BP o BT (**MC3** y **MC4**), mediante la formación de puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de las cetonas y dos hidrógenos ácidos de AMBI (H1 y H10). Al nivel

¹⁰⁹ (a) W. J. Leigh, E. C. Lathioor, M. J. St. Pierre *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12339.

(b) M. V. Encinas, J. C. Scaiano *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6393. (c) J. Pérez Prieto, A. Lahoz, F. Bosca, R. Martínez Máñez, M. A. Miranda *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 374.

¹¹⁰ S. Inbar, H. Linschitz, S. G. Cohen *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7323.

B3LYP/6-311+G(d,p) los complejos moleculares **MC3** y **MC4** son 7.6 y 8.0 kcal/mol respectivamente más estables que los reactivos separados (AMBI + BP o AMBI + BT). Así pues, la transferencia de hidrógeno se ha estudiado en los complejos moleculares excitados. Las energías de los correspondientes estados excitados triplete de AMBI, BP, BT, los complejos moleculares **MC3** y **MC4**, así como las de los pares iónicos radicalarios resultantes (**RIP3**, **RIP4**) y los pares de radicales neutros (**RP3**, **RP3'**, **RP4**, **RP4'**) se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Energías total (E, en u.a.) y relativa (ΔE , en kcal/mol) de los puntos estacionarios involucrados en la fotorreacción de AMBI con BP y BT.

	6-31G(d)		6-311+G(d,p)	
	E	ΔE	E	ΔE
AMBI (S₀)	-435.226323	-	-435.3508632	-
BP (S₀)	-576.632268	-	-576.7818064	-
BP (T₁)	-576.530767	63.7	-576.6791541	64.4
MC3 (S₀)	-1011.874473	-10.0	-1012.145192	-7.6
RIP3	-1011.786074	45.5	-1012.058090	47.1
RP3	-1011.803358	34.7	-1012.074515	36.8
RP3'	-1011.804253	34.1	-1012.075141	36.4
BT (S₀)	-897.389704	-	-897.5470666	-
BT (T₁)	-897.292160	61.2	-897.4488589	61.6
MC4 (S₀)	-1332.631911	-10.0	-1332.910681	-8.0
RIP4	-1332.549395	41.8	-1332.828951	43.3
RP4	-1332.561298	34.3	-1332.840753	35.9
RP4'	-1332.564711	32.2	-1332.843527	34.1

En **MC3** y **MC4** la excitación electrónica está asociada con la promoción de un electrón del orbital HOMO al LUMO. El análisis de los coeficientes de los orbitales moleculares (MOs) indica que mientras los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMOs) están localizados mayoritariamente sobre el AMBI, los orbitales moleculares desocupados de menor energía (LUMOs) están localizados mayoritariamente sobre la BP o el BT (véase figura 4.6). La diferencia de energía HOMO/LUMO en estas especies es relativamente baja (58.0 kcal/mol en **MC3** y 53.3 kcal/mol en **MC4**).

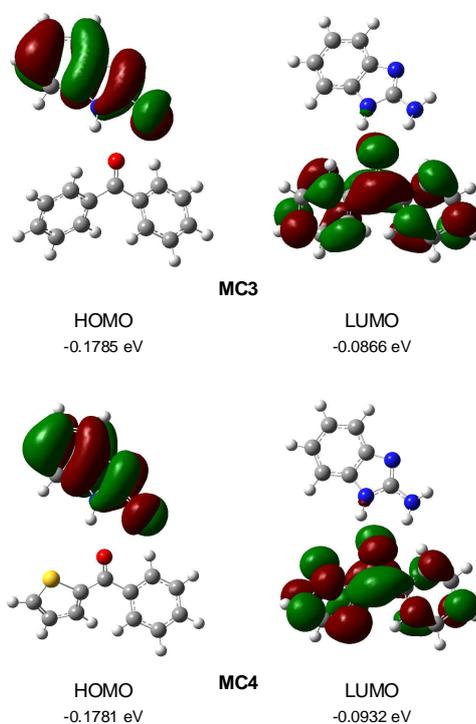


Figura 4.6. B3LYP/6.31G* HOMO y LUMO de MC3 y MC4.

Por tanto, la excitación electrónica de los complejos moleculares puede considerarse como una transferencia electrónica del HOMO del AMBI al LUMO de BP o BT dando lugar a la formación de pares de iones radicales **RIP3** o **RIP4**. Estas especies transitorias son 47.1 o 43.3 kcal/mol más energéticas que sus respectivos estados fundamentales y 17.3 o 18.3 kcal/mol más estables que los estados excitados separados AMBI (S_0) más BP (T_1) o BT (T_1), de acuerdo con la formación de los puentes de hidrógeno. La transferencia de protón entre los pares de iones radicales llevaría a la formación de los pares radicalarios **RP3**, **RP4**, **RP3'** o **RP4'**, los cuales son 36.8, 36.4, 35.9 y 34.1 kcal/mol más energéticos que los correspondientes estados fundamentales; así este paso estaría favorecido termodinámicamente en unas 10 kcal/mol. Todos los intentos de localizar los estados de transición para este proceso resultaron infructuosos, lo que sugiere que se trata de un proceso básicamente sin barrera energética.

La figura 4.7 muestra las geometrías de las especies intermedias (**RIP3**, **RIP4**, **RP3**, **RP4**, **RP3'** y **RP4'**) más relevantes involucradas en la transferencia formal de hidrógeno. Los datos más significativos son las longitudes de enlace N1–H1 y N10–H10, igual que las distancias entre estos hidrógenos ácidos del AMBI y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de BP o BT (véase tabla 4.3).

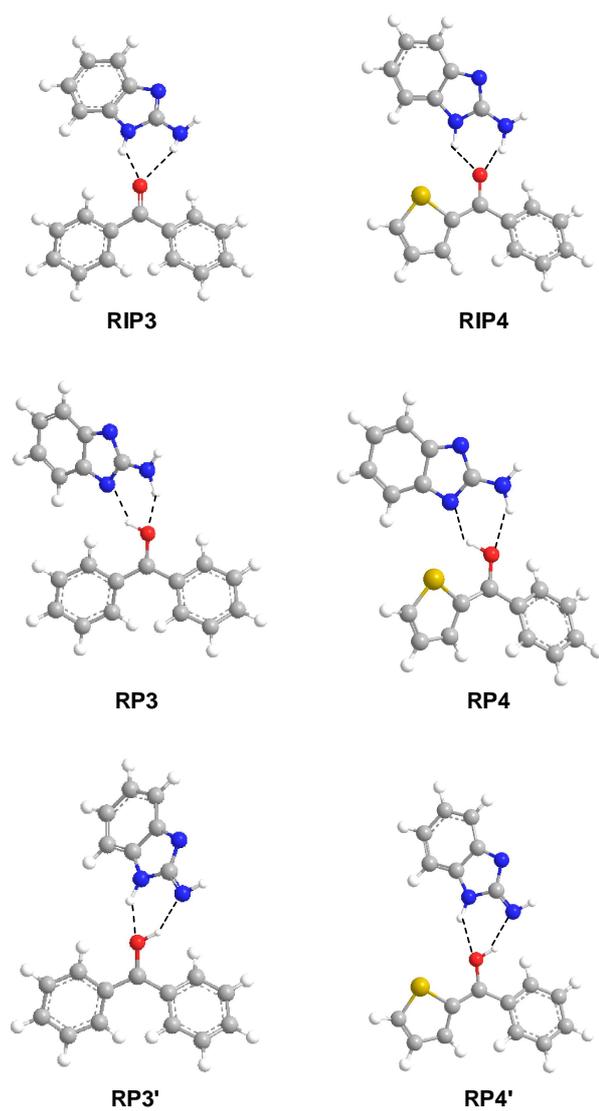


Figura 4.7. Geometrías de las especies intermedias involucradas en la transferencia formal de hidrógeno: **RIP3**, **RIP4**, **RP3**, **RP4**, **RP3'** y **RP4'**.

Tabla 4.3. (U)B3LYP/6-31G(d) parámetros geométricos seleccionados, longitud de enlace en Å, de los estados triplete implicados en la fotorreactividad de **MC3** y **MC4**.

	N1-H1	N10-H10	H1-O	H10-O
AMBI (S₀)	1.009	1.015	-	-
MC3	1.013	1.015	2.072	2.222
RIP3	1.093	1.063	1.507	1.683
RP3	1.859	1.018	0.994	2.035
RP3'	1.018	1.859	2.041	0.992
MC4	1.013	1.015	2.092	2.230
RIP4	1.047	1.080	1.732	1.568
RP4	1.827	1.018	0.998	2.042
RP4'	1.017	1.856	2.063	0.994

Las longitudes de los enlaces N-H de los complejos moleculares en estado fundamental son 1.013 Å (N1–H1) y 1.015 Å (N10–H10), mientras que las distancias H1–O y H10–O son 2.072 y 2.222 Å (**MC3**) o 2.092 y 2.230 Å en (**MC4**). En los pares de iones radicales, las longitudes de los enlaces NH son 1.093 Å (N1–H1) y 1.063 Å (N10–H10) en el caso de **RIP3** o 1.047 Å (N1–H1) y 1.080 Å (N10–H10) en el **RIP4**. Las distancias H1–O y H10–O son 1.507 y 1.683 Å en el caso de **RIP3** o 1.732 y 1.568 Å en **RIP4**. Así, mientras los enlaces N–H son más largos, las distancias H–O son más cortas en los RIPs; lo cual es consistente con una fuerte interacción por puente de hidrógeno. Las distancias N1-H1 y N10- H10 en el caso de pares de radicales **RP3** y **RP4** son 1.859 y 1.018 Å, o 1.827 y 1.018 Å respectivamente. De acuerdo con ello, las correspondientes distancias H1-O y H10-O son 0.994 y 2.035 Å, o 0.998 y 2.042 Å. Finalmente, las distancias N1-H1 y N10-H10 en **RP3'** son 1.018 y 1.859 Å, o 1.017 y 1.856 Å, mientras que las distancias de H1-O y H10-O son 2.041 y 0.992

Å, o 2.063 y 0.994 Å, respectivamente. Dichos valores indican que el átomo de hidrógeno transferido es el H1 de **RP3** y **RP4** o H10 de **RP3'** y **RP4'**.

Con el fin de establecer la naturaleza iónica o neutra de los RIPs y RPs se analizó el grado de transferencia de carga. Los valores la densidad de spin (*"Mulliken atomic spin densities"*) obtenidos para estas especies indican que ambas subunidades tienen carácter radicalario (véase tabla 4.4). En este análisis, las cargas atómicas naturales de las especies calculadas al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) se repartieron entre los fragmentos del dador, AMBI, y del aceptor, BP o BT. Así, mientras que en los pares de iones radicales, **RIP3** y **RIP4**, la separación de carga es de 0.81 e en los pares de radicales neutros **RP3**, **RIP3'**, **RP4** y **RP4'** la separación de carga es inferior a 0.04 e. Estos resultados indican que durante la reacción una gran parte de la densidad electrónica (ca. 1 e) ha sido transferida del fragmento de AMBI al de BP o BT y son consistentes con el mecanismo propuesto de transferencia de electrón seguida por transferencia de protón.

Tabla 4.4. (U)B3LYP/6-311+G(d,p) Valores totales de spin de Mulliken y cargas naturales de la subunidad de AMBI en los MCs y en los RIPs y RPs resultantes.

	spin	carga		spin	carga
MC3	0.00	-0.01	MC4	0.00	-0.01
RIP3	1.01	0.81	RIP4	0.99	0.81
RP3	1.01	0.03	RP4	1.01	0.04
RP3'	1.01	0.03	RP4'	1.01	0.04

4.3. Conclusiones

En este capítulo se ha examinado la fotorreactividad de benzofenona (BP), 2-benzoiltiofeno (BT), 4-metoxibenzofenona (MBP), 4,4'-dimetoxibenzofenona (DMBP) y 4-carboxibenzofenona (CBP) con 2-aminobencimidazol (AMBI). La fotólisis de destello láser (FDL) reveló desactivación de los tripletes de las cetonas aromáticas por 2-aminobencimidazol (AMBI), que da lugar a la formación de radicales cetilo junto con radicales aminilo **AMBI-H**. Las constantes de desactivación obtenidas fueron $6.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el triplete $n\pi^*$ de la benzofenona (BP) y $3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el triplete $\pi\pi^*$ de 2-benzoiltiofeno (BT). La similitud entre los dos valores indica que no se trata de abstracción pura de hidrógeno, sino más bien de transferencia de carga seguida por transferencia de protón. Dicha suposición está de acuerdo con los cálculos termodinámicos llevados a cabo usando la ecuación de Rehm-Weller. Los espectros de absorción transitoria de 4-metoxibenzofenona (MBP) y 4,4'-dimetoxibenzofenona (DMBP) muestran distintas bandas correspondientes a ambos tipos de tripletes ($n\pi^*$ y $\pi\pi^*$). Su relación depende de la polaridad del disolvente. Los cambios observados en presencia de AMBI fueron consistentes con la formación de los radicales aminilo/cetilo. Las constantes de desactivación de ambos tipos de radicales fueron muy altas, en el intervalo entre 10^9 y $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tras la unión de un sustituyente electrón aceptor al anillo aromático, como en el caso del triplete $n\pi^*$ de CBP, la constante de desactivación se incrementó, alcanzando un valor ($8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) cercano al correspondiente a la desactivación controlada por difusión. Se ha estudiado teóricamente el mecanismo de la abstracción de hidrógeno del AMBI por estados excitados triplete de la BP o del BT mediante la metodología DFT (*"Density Functional Theory"*). Los resultados indican la

formación de complejos moleculares en estado fundamental. El proceso incluye transferencia de un electrón del 2-aminobencimidazol a las unidades de la benzofenona o benzoiltiofeno excitadas, dando lugar a la formación de pares de iones radicales seguida por transferencia de protón del grupo amino al átomo de oxígeno de grupo carbonilo, produciéndose los pares de radicales neutros. La comparación de las energías relativas y la geometría de las especies involucradas en las reacciones fotoquímicas indica que todas las cetonas siguen un mecanismo similar.

4.4. Parte experimental

4.4.1. Materiales y disolventes

2-Aminobencimidazol (AMBI), bencimidazol, benzofenona (BP), 2-benzoiltiofeno (BT), 4-metoxibenzofenona (MBP), 4,4'-dimetoxibenzofenona (DMBP) y 4-carboxibenzofenona (CBP) fueron suministrados por Aldrich. Su pureza ha sido confirmada mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y cromatografía líquida de alta resolución (*“High Performance Liquid Chromatography”* - HPLC). Como disolvente se utilizó acetonitrilo de calidad HPLC suministrado por Scharlau sin purificación previa.

4.4.2. Espectros de absorción

Los espectros de absorción en distintos disolventes fueron registrados usando UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35.

4.4.3. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se llevaron a cabo usando un láser pulsado de Nd-YAG (*Quantel Brilliant*, de 355 nm, 5 ns fwhm, 14 mJ por pulso) acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 *Luzchem*. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de xenon, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio *Tektronix* 9 bit de la serie TDS-3000 de 9 bit con ancho de banda de 300 MHz, un fotomultiplicador compacto y fuente de alimentación, un portacubetas, conectores de fibra óptica, y programa desarrollado en el entorno *LabVIEW* de *National Instruments*. El equipo de FDL proporciona un voltaje de pulsos de corte de 5 V con frecuencia y retardo de señal programables. Todos los espectros transitorios se registraron empleando cubetas de cuarzo de 10x10 mm² con capacidad de 4 ml; el diámetro del punto de disparo en la cubeta es aproximadamente 4 mm. Las muestras fueron purgadas con N₂ u O₂ durante 20 min antes de medir. La absorbancia de las muestras se mantuvo entre 0.2 y 0.3 a las longitudes de onda correspondientes. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22°C).

4.4.4. Métodos computacionales

Los cálculos de DFT (*"Density Functional Theory"*) se llevaron a cabo usando el funcional B3LYP¹¹¹ junto con el conjunto de bases estándar

¹¹¹ (a) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr *Phys. Rev. B* **1998**, *37*, 785. (b) A. D. Becke *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

6-31G(d).¹¹² Las optimizaciones geométricas se realizaron usando el método de Berny.¹¹³ Para el estudio de los estados excitados triplete y especies radicalarias se empleó el formalismo de capa abierta UB3LYP. Las energías verticales de los estados excitados singlete fueron calculadas usando el método DFT dependiente del tiempo (TD-DFT)¹¹⁴ al nivel B3LYP/6-311+G(d,p). Las estructuras electrónicas de puntos estacionarios han sido analizadas empleando el método NBO (*"Natural Bond Orbital"*).¹¹⁵ Todos los cálculos se llevaron a cabo usando el conjunto de programas Gaussian 03.¹¹⁶

¹¹² W. J. Hehre, L. Radom, P. V. R. Schleyer, J. A. Pople *Ab initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, **1986**.

¹¹³ (a) H. B. Schlegel *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 214. (b) H. B. Schlegel "Geometry Optimization on Potential Energy Surface," in *Modern Electronic Structure Theory*. D. R. Yarkony ed., World Scientific Publishing: Singapore, **1994**.

¹¹⁴ (a) R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454. (b) M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahud *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439.

¹¹⁵ A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735.

¹¹⁶ J. A. Pople *et al.*, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

Capítulo 5

*Caracterización experimental y teórica (DFT) del estado
excitado triplete del tiabendazol*

5.1. Introducción

El tiabendazol (**TBZ**, véase figura 5.1) es un compuesto bioactivo extensivamente utilizado como antihelmíntico, tanto en animales como en humanos. Asimismo, se ha empleado como antifúngico en el tratamiento post cosecha de frutas y verduras. Es esta última aplicación la que ha llevado a desarrollar diversos métodos de detección de trazas, de éste y otros bencimidazoles, tanto en alimentos como en el agua. Así, por ejemplo, se ha utilizado fosforescencia a temperatura ambiente inducida por nylon,¹¹⁷ cromatografía líquida con detección por fluorescencia tras microextracción de muestras de frutas y verduras¹¹⁸ o cromatografía líquida rápida (*“Fast Liquid Chromatography”*) acoplada con espectroscopia de masas - tiempo de vuelo (*“Time of Flight Mass Spectroscopy”*) LC-TOFMS para la determinación simultánea de residuos de pesticidas en muestras de refrescos fabricados a base de cítricos.¹¹⁹

¹¹⁷ R. A .Correa, G. M. Escandar *Anal. Chim. Acta* **2006**, 571, 58.

¹¹⁸ A. Moral, M. D. Sicilia, S. Rubio *Anal. Chim. Acta* **2009**, 650, 207.

¹¹⁹ B. Gilbert López, J. F. García Reyes, M. Mezcuca, N. Ramos Martos, A. R. Fernández Alba, A. Molina Díaz *Talanta* **2010**, 81, 1310.

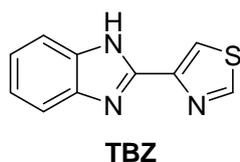


Figura 5.1. Estructura química del tiabendazol.

A pesar de su amplia utilización, los estudios sobre la fotoquímica del TBZ se han limitado a las disoluciones acuosas o metanólicas y al efecto del oxígeno singlete.¹²⁰ Así, se ha demostrado que el anillo de tiazol es la parte más vulnerable de la molécula y sufre ruptura, dando lugar a bencimidazol (BZ) y bencimidazol-2-carboxamida (BZ-2-CONH₂) en disoluciones metanólica y acuosa, mientras que en disolución etanólica se forma también etil bencimidazol-2-carboxilato de etilo¹²¹ (BZ-2-COOEt, véase figura 5.2).

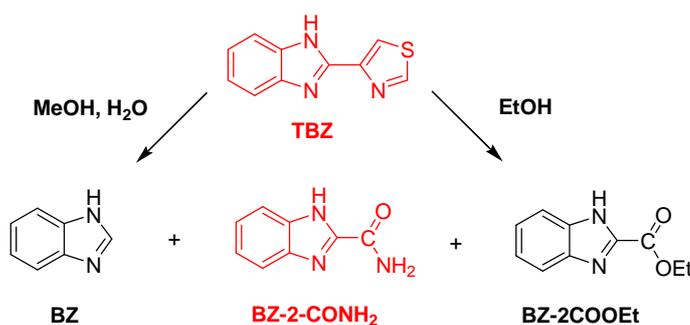


Figura 5.2. Fotorreactividad de TBZ en disolución acuosa, metanólica o etanólica.

¹²⁰ (a) T. A. Jacob, J. R. Carlin, R. W. Walker, F. W. Wolf, J. A. Vanden-Heuvel *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 704. (b) M. R. Mahran, M. M. Sidky, H. Wamhoff *Chemosphere* **1983**, *12*, 1611.

¹²¹ G. Crank, A. Mursyldi *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 775.

Por otra parte, el comportamiento fotofísico del TBZ permanece aún relativamente inexplorado, a excepción del estudio llevado a cabo por Tway y Love que caracterizaron el estado excitado singlete y describieron la fosforescencia.¹²² Sin embargo, la absorción del estado excitado triplete y otras posibles especies transitorias generadas a partir del TBZ no han sido descritas hasta la fecha. Con estos antecedentes, el objetivo de este capítulo es la caracterización completa de las propiedades fotofísicas del triplete del TBZ. Su conocimiento es un requisito esencial para comprobar en una etapa posterior el posible uso del TBZ como sonda para análisis de la interacción con tubulinas y otras proteínas, mediante las variaciones en los parámetros del estado excitado triplete. En este contexto hay que mencionar que recientemente se ha descrito la aplicación del estado triplete de algunos fármacos como sonda para la determinación del sitio de unión a las proteínas, ya que su tiempo de vida es sensible al microentorno dentro de las biomacromoléculas.¹²³ La aplicación del triplete como sonda es extensible al estudio del efecto de otros microambientes como, por ejemplo, las ciclodextrinas. Estas se utilizan con frecuencia en farmacia para encapsular compuestos con la finalidad de mejorar alguna de sus propiedades, como su solubilidad, estabilidad o eficacia. En el caso de los bencimidazoles se encapsulan con el fin de aumentar su escasa solubilidad en casi todos los disolventes.

¹²² P. C. Tway, L. J. Cline Love *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 5223.

¹²³ (a) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr *Phys. Rev. B* **1998**, *37*, 785. (b) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1 Absorción UV/Vis y fluorescencia

En una fase preliminar se registró el espectro de absorción del TBZ en acetonitrilo, que presenta una banda con un máximo centrado en 300 nm ($\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), con un hombro a 310 nm, como puede observarse en la figura 5.3. El desplazamiento y la forma de las bandas en disolución acuosa coinciden con las obtenidas en disolvente orgánico.

La figura 5.3 muestra también el espectro de fluorescencia del TBZ en acetonitrilo obtenido al excitar a 281 nm, acompañado por la banda de excitación para la emisión a 350 nm.

Un espectro similar se ha obtenido en la mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v). De la intersección entre las dos bandas se calculó el valor de la energía del estado excitado singlete $E_s = 89 \text{ kcal/mol}$. El rendimiento cuántico de emisión en disolución desgasificada del TBZ en acetonitrilo es 0.06 y en la mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v) resultó ser 0.07. La fluorescencia no muestra sensibilidad al oxígeno.

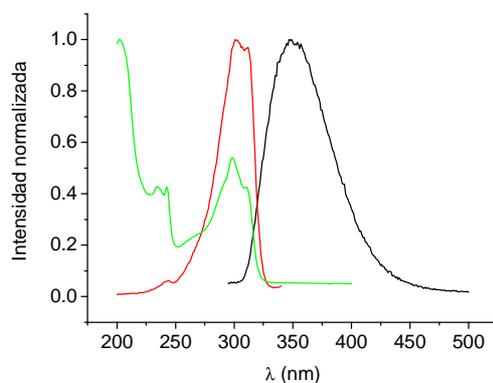


Figura 5.3. Espectros normalizados de absorción (—), emisión (—), excitación a 281 nm) y excitación (—, emisión a 350 nm) del TBZ en MeCN.

5.2.2 Espectroscopia de absorción transitoria

Después de haber estudiado las características de absorción y emisión se procedió a emplear la metodología de la espectroscopia de absorción transitoria. La fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) de disoluciones desgasificadas del TBZ en acetonitrilo o en una mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v) reveló especies transitorias entre 350 y 700 nm. Los espectros registrados muestran una banda amplia centrada en 570 nm, asignada en principio a la absorción triplete-triplete (véase figura 5.4. A). El tiempo de vida depende del disolvente. En acetonitrilo es de 1 μs mientras que en una mezcla PBS/MeCN (3.1, v/v) es diez veces más largo (10.3 μs). El aumento de la concentración de TBZ produce una disminución del tiempo de vida de triplete, lo cual indica la autodesactivación (*“self-quenching”*). En PBS/MeCN (3:1, v/v) la constante de desactivación es $k_D = 7.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ como se puede observar en la tabla 5.1.

Ensayos realizados en presencia de oxígeno mostraron la desactivación de la especie transitoria, como cabe esperar en el caso de un triplete, apoyando así la previa asignación de la naturaleza de la especie transitoria. En la figura 5.4. B se puede apreciar la representación de Stern–Volmer de la que se obtuvo la constante de desactivación del triplete de TBZ por oxígeno, $k_D = 6.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en acetonitrilo.

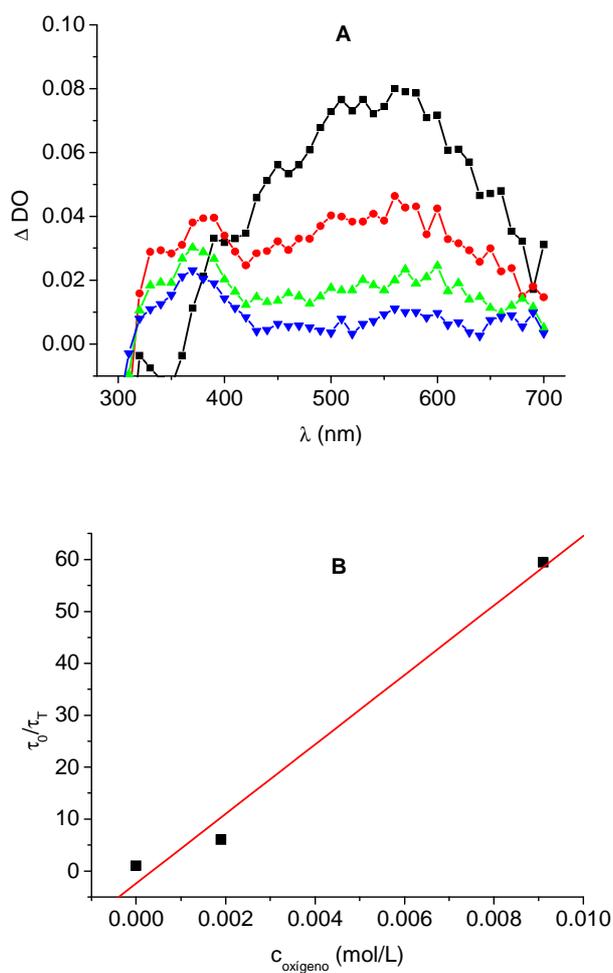


Figura 5.4. A: Espectro de absorción transitoria del TBZ en MeCN ($4.012 \times 10^{-3} M$) registrado tras excitación a 266 nm 0.23 μs (■), 1.0 μs (●), 2.17 μs (▲) and 4.52 μs (▼) después del pulso de láser. **B:** Representación de Stern-Volmer para la desactivación por O_2 del triplete del TBZ en MeCN.

A continuación, para caracterizar de forma inequívoca la naturaleza de la especie se procedió a la generación de la misma por sensibilización.

Se emplearon la xantona (XANT) y la 4,4'-dimetoxibenzofenona (DMBP), sensibilizadores conocidos de triplete y con energía de triplete $E_T = 74.1 \text{ kcal/mol}$ ¹²⁴ y con $E_T = 67.8 \text{ kcal/mol}$,¹²⁵ respectivamente. Para ello se sometieron a fotólisis de destello láser (355 nm) disoluciones de xantona en PBS/MeCN (3:1, v/v), purgadas con N_2 , en ausencia y en presencia de tiabendazol. En ausencia de TBZ se detectó el triplete de xantona con el máximo a 600 nm aproximadamente, mientras que en presencia de TBZ esta banda aguda se transformó en una señal mucho más ancha cuyo máximo se desplazó hacia 575 nm. Los resultados de las medidas cinéticas realizadas a 500 nm se muestran en la figura 5.5.

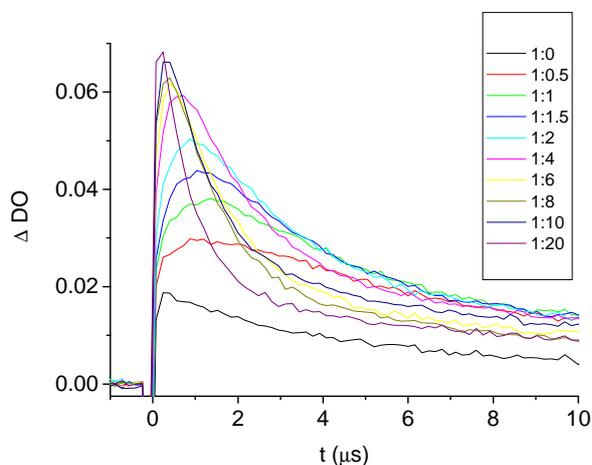


Figura 5.5. Sensibilización del triplete de TBZ vía transferencia de energía desde el estado excitado triplete de la xantona. Longitud de onda de registro: $\lambda_{\text{reg}} = 500 \text{ nm}$. Longitud de onda de excitación: $\lambda = 355 \text{ nm}$. Disoluciones desgasificadas en PBS/MeCN (3:1, v/v).

¹²⁴ S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc.; New York, 2nd edn. **1993**

¹²⁵ D. Jorner, Luis R. Domingo, Rosa Tormos, M. A. Miranda *enviado a J. Phys. Chem B*.

La constante de velocidad de este proceso resultó ser $k_D = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Cuando se utilizó DMBP como sensibilizador, el proceso de desactivación del triplete de la cetona aromática, con la correspondiente aparición del triplete del TBZ, fue más evidente como se puede apreciar en las figuras 5.6 y 5.7.

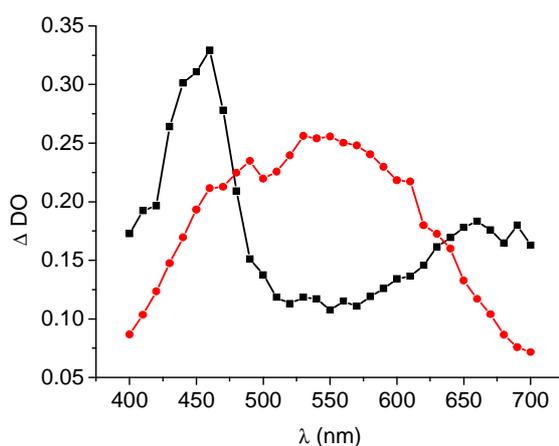


Figura 5.6. Sensibilización del triplete del TBZ vía transferencia de energía desde el estado excitado triplete de DMBP. Longitud de onda de excitación: $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$, disolvente: PBS/MeCN (3:1, v/v). Ambas muestras han sido purgadas con nitrógeno. Espectros registrados $0.4 \mu\text{s}$ después del pulso de láser.

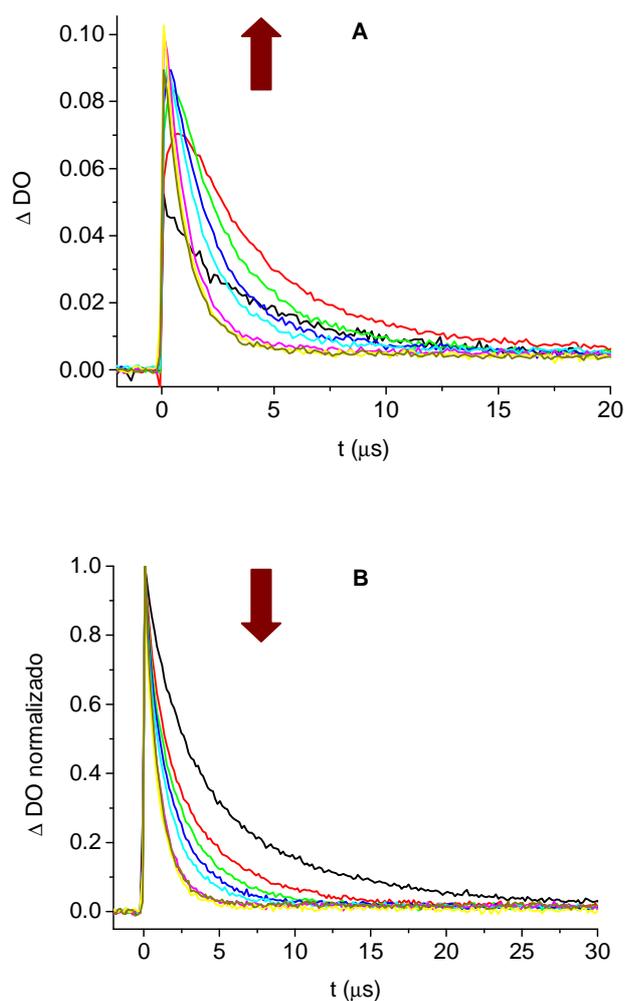


Figura 5.7. A: Formación del estado excitado triplete. Curvas de desactivación registradas a $\lambda_{reg} = 560$ nm. **B:** Desactivación del estado excitado triplete de DMBP por TBZ. Curvas de desactivación registradas a $\lambda_{reg} = 450$ nm tras la excitación a $\lambda_{exc} = 355$ nm, con disoluciones desgasificadas de DMBP+TBZ en PBS/MeCN (3:1, v/v). Relación molar DMBP/TBZ entre 1:0 and 1:8.

En este caso, la constante de velocidad resultó ser $k_D = 3.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ la cual es aproximadamente de un orden de magnitud menor que el valor obtenido para xantona.

Para obtener el valor de la energía del triplete del tiabendazol se utilizaron conocidos desactivadores como por ejemplo 1,3-ciclohexadieno, acenafteno, naftaleno y bifenilo, cuyo efecto sobre la banda de absorción triplete-triplete fue monitorizado. Las correspondientes constantes de velocidad se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Desactivación y sensibilización del triplete del TBZ.

Desactivación del triplete de TBZ			
Substrato	E_T (kcal/mol)	k_D ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Disolvente
oxígeno	22.5	6.6×10^9	MeCN
1,3-ciclohexadieno	52	4.5×10^9	MeCN
acenafteno	59	9.8×10^9	MeCN
naftaleno	61	5.5×10^9	MeCN
Autodesactivación			
TBZ		7.3×10^8	PBS/MeCN (3:1)
Transferencia de energía T-T			
Sensibilizador	E_T (kcal/mol)	k_{cis} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Disolvente
xantona	74.1	1.5×10^9	PBS/MeCN (3:1)
DMBP	67.8	3.9×10^8	PBS/MeCN (3:1)

Estos datos parecen indicar que la energía del triplete del tiabendazol debe de estar comprendida entre la del naftaleno y la DMBP.

Para obtener su valor de forma más precisa se utilizó la ecuación de Sandros (1) en base a resultados obtenidos, previamente, para la desactivación de DMBP en la mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v) tras la excitación a 355 nm en presencia de cantidades crecientes de desactivadores, incluido el TBZ. Las curvas de desaparición de la banda de absorción triplete-triplete se analizaron a 430 nm. Tras representar la inversa del tiempo de vida del triplete

de DMBP frente a la concentración del desactivador se obtuvieron distintas representaciones lineales (no se muestran) cuyas pendientes representan los valores de la constante de transferencia de energía intermolecular (véase la tabla 5.2).

Tabla 5.2. Desactivación del triplete de DMBP.

	E_T (kcal/mol)	k_{ET} ($M^{-1}s^{-1}$)
1,3-ciclohexadieno	52.3	4.0×10^9
difenilo	64.8	4.9×10^9
fluoreno	67.2	4.6×10^9
dibenzofurano	69.1	2.8×10^8
tiabendazol	-	3.9×10^8

Ecuación de Sandros

$$k_{ET} = (k_{max} e^{-\Delta E_T/RT}) / (e^{-\Delta E_T/RT} + 1) \quad (1)$$

donde la constante de velocidad de transferencia de energía (k_{ET}) entre dos diferentes estados excitados triplete depende de la diferencia de energía de triplete (ΔE_T) entre el donador y el aceptor y k_{max} es la constante de velocidad óptima del sistema, que es el valor medio de las constantes de desactivación cuando el proceso, entre DMBP y los aceptores, está controlado por difusión ($k_D \geq 1 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$).

Sustituyendo en la ecuación (1) el valor de la constante de desactivación de la DMBP por tiabendazol ($k_{ET} = 3.9 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$) se obtiene un $\Delta E_T = 1.4$ kcal/mol. Por tanto, el valor de energía del triplete del tiabendazol se estima en 69.2 kcal/mol.

A continuación se determinó el coeficiente de absorción molar del triplete del TBZ empleando el triplete de DMBP como patrón. Para ello se sometió una disolución desgasificada de DMBP con TBZ (relación molar 1:8) en PBS/MeCN (3:1,v/v) a la fotólisis de destello láser, excitando a 350 nm. Se registraron las curvas de desaparición a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción del TBZ (560 nm) y DMBP (450 nm). Los valores de ΔDO de dichas curvas de desaparición se usaron para calcular el coeficiente de absorción molar del triplete del TBZ: ΔDO (560 nm) = 0.06932, ΔDO (450 nm) = 0.05024. Por tanto, el coeficiente de absorción molar del triplete del TBZ tiene un valor de $\epsilon_T = 3961 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

El rendimiento cuántico de cruce intersistemas (Φ_{CIS}) del TBZ en una mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v) ha sido calculado a partir del ΔDO de las bandas de absorción T-T de disoluciones isoabsortivas ($A_{266} = 0.31$) del TBZ y DMBP registradas a 560 y 450 nm respectivamente. Conociendo los valores de ΔDO (560 nm) = 0.1, ΔDO (450 nm) = 0.068, los coeficientes de absorción molar de los estados excitados triplete de DMBP ($\epsilon_T = 2693 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y del TBZ ($\epsilon_T = 3961 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) así como el rendimiento cuántico de cruce intersistemas de DMBP ($\Phi_{CIS} = 0.97$), se llega a un valor de $\Phi_{CIS} = 0.91$.

Tras la caracterización del estado excitado triplete del TBZ se procedió a estudiar el efecto de la inclusión del TBZ en ciclodextrinas sobre las propiedades de esta especie transitoria. Para ello se sometieron a la fotólisis de destello láser disoluciones en PBS del TBZ en presencia de α -, β - y γ -CD, excitando a $\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$. La concentración del TBZ en todas las muestras fue $4 \times 10^{-5} \text{ M}$.

La señal obtenida en presencia de las ciclodextrinas tiene una forma idéntica a la registrada en PBS.

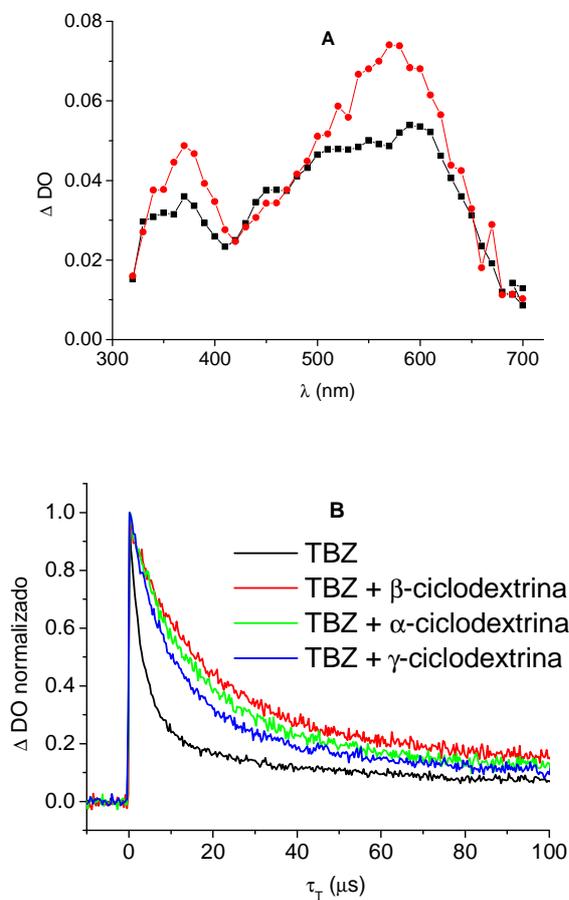


Figura 5.8. A: Espectro de absorción transitoria del TBZ ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) en PBS (■) y en β -CD (1:440 mol/mol, ●) registrado $0.31 \mu\text{s}$ después del pulso de láser ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$). **B:** Curvas de desaparición normalizadas del triplete del TBZ ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) en PBS, α -CD (1:400 mol/mol), β -CD (1:440 mol/mol) y γ -CD (1:600 mol/mol) registradas a $\lambda_{\text{reg}} = 570 \text{ nm}$ tras la excitación a $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

La formación del complejo TBZ-CD conlleva un aumento de la intensidad de la señal (véase figura 5.8.A) y, asimismo, del tiempo de vida del triplete del TBZ en el microentorno generado por las ciclodextrinas (véase tabla 5.3)

Más aún, se observó una diferencia en el efecto del tipo de las CDs sobre el tiempo de vida del triplete, que es más acusado en el caso de β - y α -CDs, mientras que para la γ -CD, el aumento observado fue menor (véase tabla 5.3). Estas diferencias en el comportamiento se deben probablemente al diferente grado de confinamiento asociado a los diferentes diámetros de las ciclodextrinas usadas.

Tabla 5.3. Efecto de la presencia de las ciclodextrinas sobre el tiempo de vida del triplete del TBZ.

	TBZ/CD	τ_T (μ s)
TBZ	(1:0)	3.4
TBZ- β -CD	(1:440)	14.2
TBZ- α -CD	(1:400)	12.2
TBZ- γ -CD	(1:600)	9.5

5.2.3 Cálculos teóricos de DFT

5.2.3.1 Optimización de la geometría de TBZ

Antes de proceder a estudiar los estados excitados singlete y triplete se llevó a cabo un análisis de las posibles geometrías del TBZ en el estado fundamental. Dos rotámeros son factibles debido a la rotación libre alrededor del enlace simple C1-C6 de TBZ. Estos rotámeros son el **TBZ-c** donde el grupo

NH de bencimidazol y el átomo de nitrógeno del tiazol presentan una disposición *s-cis* y el **TBZ-t** que presenta disposición *s-trans* (véase figura 5.7). En primer lugar se llevó a cabo un análisis conformacional con el fin de caracterizar la estructura más favorable.

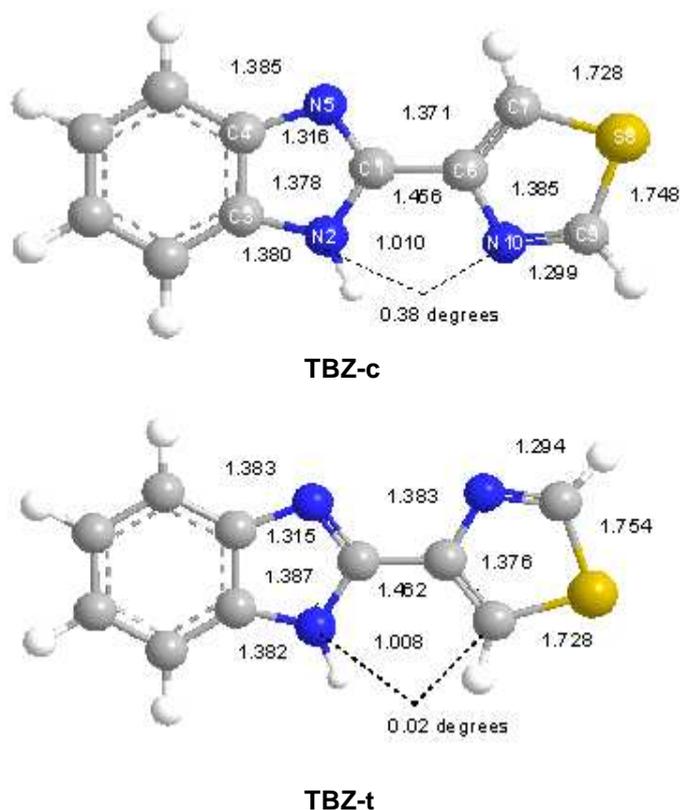


Figura 5.7. B3LYP/6-31G(d) Estructuras **TBZ-c** y **TBZ-t**. Las longitudes se presentan en Angstroms.

La optimización B3LYP/6-31G(d) de ambas estructuras sitúa la energía de **TBZ-t** 7.6 kcal/mol por encima de la de **TBZ-c**. La energía de activación asociada con la interconversión de ambas conformaciones vía la estructura **TBZ-90**, donde el ángulo dihedro entre bencimidazol y tiazol es 90 grados, es

9.8 kcal/mol. Aunque no es una energía de activación alta, la diferencia de energía entre las conformaciones **TBZ-c** y **TBZ-t** hace que la estructura *s-cis* sea la más favorecida. Como consecuencia de este hecho solo ha sido considerada la estructura **TBZ-c** en el estudio de la excitación singlete. Energías relativas similares se obtuvieron mediante optimización completa de las tres estructuras moleculares al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) como se puede comprobar en la tabla 5.3).

Tabla 5.3. Energías total (E en u.a.) y relativa (ΔE en kcal/mol) de TBZ-c, TBZ-90 y TBZ-t.

	B3LYP/6-31G(d)		B3LYP/6-311+G(d,p)	
	E	ΔE	E	ΔE
TBZ-c	-947.7350696		-947.902007	
TBZ-90	-947.7194715	9.8	-947.887831	8.9
TBZ-t	-947.7230448	7.6	-947.889882	7.6

La comparación entre las geometrías B3LYP/6-31G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p) ha revelado que no hay diferencias significativas entre unas y otras. Algunos parámetros geométricos junto con el orden de enlace de Wiberg (*“Wiberg bond order”, BO*), merecen un comentario: i) la longitud de enlace C1-C6 (1.456 Å) y el valor de BO correspondiente (1.06) apuntan hacia el enlace simple Csp^2-Csp^2 ; ii) las dos longitudes de enlaces S-C (1.728 y 1.748 Å) y el correspondiente valor de BO (1.21) apuntan hacia enlaces simples S-C con un ligero carácter π ; iii) las longitudes de los enlaces C6-C7 y C9-N10 (1.371 y 1.299 Å) junto con sus correspondientes valores de BO (1.56 y 1.65) señalan hacia un notable carácter π . Por último, el ángulo dihedro de N2-C1-C6-N10 de 0.38 grados indica la disposición de los dos anillos en un plano. El valor de BO de C1-C6 está de acuerdo con una ligera conjugación entre ambos anillos,

constante con la baja energía asociada con la rotación sobre el enlace C1-C6 encontrada para TBZ.

5.2.3.2 Estudios de la excitación singlete y triplete del TBZ

Los tres primeros estados excitados singlete y triplete del **TBZ-c** han sido estudiados utilizando el método dependiente del tiempo (TD) al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) sobre las geometrías B3LYP/6-311+G(d,p). La tabla 5.4 representa las energías de excitación y fuerza de oscilador.

Tabla 5.4. TD B3LYP/6-311+G(d,p) energías de excitación (EE en nm), fuerza de oscilador (f) y energías relativas ^{a,b} (ΔE en kcal/mol) de los tres primeros estados excitados singlete y triplete del TBZ-c.

Estado excitado	Transición	EE	f	ΔE
S1	52 $\pi \rightarrow$ 53 π^* (0.6490)	307.1	0.2462	93.1 (95.2)
S2	51 $\pi \rightarrow$ 53 π^* (0.6760)	291.7	0.0573	98.0 (101.3)
S3	52 $\pi \rightarrow$ 54 π^* (0.6399)	270.1	0.3354	105.9 (107.7)
T1	52 $\pi \rightarrow$ 53 π^* (0.7026)	434.8	0.0000	65.8 (68.0)
T2	51 $\pi \rightarrow$ 53 π^* (0.5016)	364.6	0.0000	78.4 (79.7)
T3	52 $\pi \rightarrow$ 54 π^* (0.5360)	326.4	0.0000	87.6 (89.1)

a) La energía total TD B3LYP/6-311+G(d,p) del estado fundamental S0 del **TBZ-c** es -947.902007 (fase gaseosa) y -947.921668 (en acetonitrilo) u.a

b) Entre paréntesis se muestran las energías relativas en acetonitrilo.

Con el propósito de caracterizar los orbitales moleculares (MOs) con mayor contribución a esas excitaciones singlete y triplete se realizaron análisis B3LYP/6-31G(d) de los orbitales moleculares frontera MOs 51 hasta 54. La representación gráfica de estos MOs se presenta en la figura 5.8.

Mientras los MOs 51 y 52 corresponden a los HOMO-1 y HOMO, los MOs 53 y 54 corresponden a los LUMO y LUMO+1, respectivamente. Los cuatro orbitales moleculares poseen simetría π .

El primer estado excitado singlete S1 que presenta una energía de excitación de 307.1 nm ($f = 0.2462$) corresponde mayoritariamente a la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO. El estado excitado singlete S1 está situado 93.1 kcal/mol por encima del estado fundamental S0.

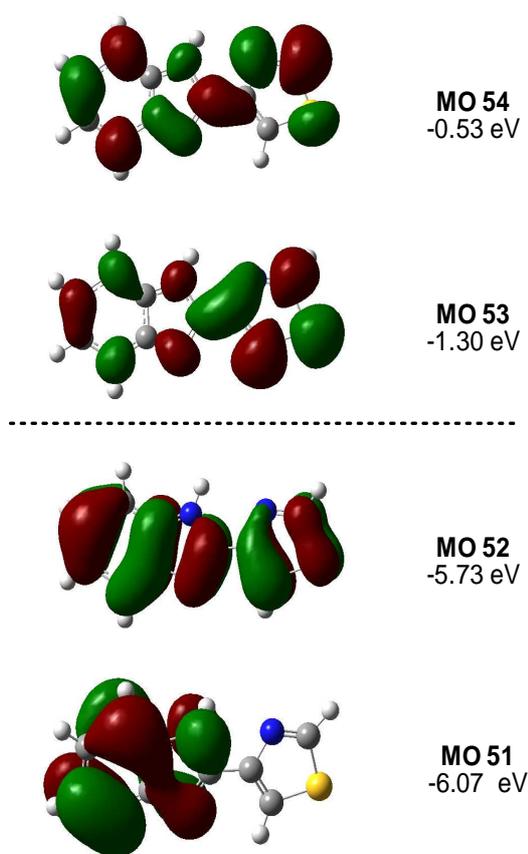


Figura 5.8. B3LYP/6-31G(d) MOs involucrados en el primer estado excitado singlete de TBZ-c.

El estado excitado singlete S2, que posee la energía de excitación de 291.7 nm ($f = 0.0573$), corresponde mayoritariamente a la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre los orbitales moleculares HOMO-1 y LUMO. El estado excitado singlete S2 se encuentra 98.0 kcal/mol por encima del estado fundamental S0. Finalmente, el estado excitado singlete S3 posee una energía de excitación de 270.1 nm ($f = 0.3354$) corresponde mayoritariamente a la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre los orbitales moleculares HOMO-1 y LUMO+1. El estado excitado singlete S3 se encuentra 105.9 kcal/mol por encima del estado fundamental S0.

El primer estado excitado triplete T1 cuya energía de excitación es de 434.8 nm, corresponde mayoritariamente con la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO. El estado excitado triplete T1 está situado a 65.8 kcal/mol por encima del estado fundamental S0. El estado excitado triplete T2, que presenta una energía de excitación de 364.6 nm corresponde mayoritariamente con la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre los orbitales moleculares HOMO-1 y LUMO. El estado excitado triplete T2 se encuentra 78.4 kcal/mol por encima del estado fundamental S0. El estado excitado triplete T3 que muestra una energía de excitación de 326.4 nm corresponde mayoritariamente con la excitación $\pi \rightarrow \pi^*$ entre ellos orbitales moleculares HOMO-1 y LUMO+1 y se encuentra 97.6 kcal/mol por encima del estado fundamental S0.

Por último, se consideraron los efectos del disolvente (acetonitrilo) sobre las energías de estos estados excitados singlete y triplete empleando los cálculos de TD B3LYP(PCM)/6-311+G(d,p) sobre las geometrías en fase gaseosa. Las energías relativas se muestran en la tabla 5.4. y son 94.1 (S1), 100.3 (S2) y 106.5 (S3) kcal/mol, mientras que para los estados excitados triplete son 67.3 (T1), 79.4 (T2) y 88.7 (T) kcal/mol. Tras incluir en los cálculos

de los estados excitados el efecto del disolvente, empleando un modelo continuo se produce un aumento de las energías relativas de 1-2 kcal/mol en comparación con las calculadas en fase gaseosa.

5.3. Conclusiones

En este capítulo se realizaron estudios experimentales y teóricos (TD-DFT) sobre los estados excitados singlete y triplete del tiabendazol (TBZ). Los estudios de fluorescencia del TBZ en acetonitrilo tras excitación a 281 nm revelaron una emisión con máximo a 350 nm. En la mezcla de PBS/MeCN (3:1, v/v) ha sido registrado un espectro similar. El rendimiento cuántico de fluorescencia de una disolución desgasificada del TBZ en acetonitrilo ha sido calculado como $\Phi_F = 0.06$ mientras que en la mezcla PBS/MeCN (3:1, v/v) el valor encontrado es de $\Phi_F = 0.07$. La fluorescencia del TBZ bajo esas condiciones no era sensible a presencia de oxígeno.

Al someter disoluciones desgasificadas del TBZ en acetonitrilo y en la mezcla de PBS/MeCN (3:1, v/v) a la fotólisis de destello láser ($\lambda_{exc} = 266$ nm) se han detectado espectros de absorción transitoria en forma de una banda amplia entre 350-700 nm con un máximo centrado sobre 570 nm. El tiempo de vida de la especie transitoria cambia notablemente en función del disolvente: en acetonitrilo era de 1 μ s mientras que en disolución acuosa era más estable (10.3 μ s). Con el aumento de concentración del TBZ se observó la disminución del tiempo de vida, indicando una autodesactivación, cuya constante ha sido calculada en PBS/MeCN (3:1, v/v) con un valor de $k_D = 7.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La naturaleza de la especie transitoria ha sido asignada al estado excitado triplete mediante varios ensayos con desactivadores de triplete establecidos (oxígeno, 1,3-ciclohexadieno, acenafteno, naftaleno) y tras la

generación del triplete del TBZ por transferencia de energía (cruce intersistemas.– CIS) desde el estado excitado triplete más energético de xantona y DMBP. La energía de triplete del TBZ ha sido establecida entre 61 y 67.8 kcal/mol.

Los cálculos de DFT muestran la existencia de dos posibles rotámeros TBZ-c y TBZ-t. El análisis conformacional de estas estructuras indica que la TBZ-c está energéticamente favorecida y por ello ha sido la única considerada en los cálculos de las energías de los estados excitados.

A continuación se ha procedido a calcular las energías de excitación, energías relativas y fuerza de oscilador de los tres primeros estados excitados singlete y triplete. Para eso se emplearon cálculos TD al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) sobre la geometría B3LYP/6-311+G(d,p). También se caracterizaron los orbitales moleculares (MOs) con mayor contribución a esas excitaciones singlete y triplete mediante análisis B3LYP/6-31G(d) de los orbitales moleculares MOs 51 hasta 54.

Finalmente se estudiaron los efectos del disolvente sobre las energías de estos estados excitados singlete y triplete, empleando los cálculos de TD B3LYP(PCM)/6-311+G(d,p) sobre las geometrías en fase gaseosa, y se observó un ligero aumento de energía relativa de los estados excitados singlete y triplete en acetonitrilo de 1-2 kcal/mol. La energía relativa calculada en acetonitrilo para el primer estado excitado triplete ($E_T = 68.0$ kcal/mol), que corresponde principalmente a la transición entre el HOMO y el LUMO, ambos de simetría π , está de acuerdo con los valores estimados experimentalmente, entre 61 y 67.8 kcal/mol.

5.4. Parte experimental

5.4.1. Materiales y disolventes

Tiabendazol (TBZ), xantona, 4,4'-dimetoxibenzofenona, 1,3-ciclohexadieno, acenafteno, naftaleno y bifenilo fueron suministrados por Aldrich. Su pureza ha sido comprobada mediante la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y análisis de cromatografía líquida de alta resolución (“*High Performance Liquid Chromatography*” - HPLC). Acetonitrilo de grado HPLC fue suministrado por Scharlau y usado sin previa purificación.

5.4.2. Espectros de absorción UV/Vis

Los espectros de absorción en distintos disolventes han sido adquiridos empleando un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35.

5.4.3. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se llevaron a cabo usando un láser pulsado de Nd-YAG (*Quantel Brilliant*, de 266 o 355 nm, 5 ns fwhm, 10 o 14 mJ por pulso acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 *Luzchem*. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de xenon, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio *Tektronix* 9 bit de la serie TDS-3000 de 9 bit con ancho de banda de 300 MHz, un fotomultiplicador compacto y fuente de alimentación, un portacubetas, conectores de fibra óptica, y programa desarrollado en el entorno *LabVIEW* de

National Instruments. El equipo de FDL proporciona un voltaje de pulsos de corte de 5 V con frecuencia y retardo de señal programables. Todos los espectros transitorios se registraron empleando cubetas de cuarzo de 10x10 mm² con capacidad de 4 ml; el diámetro del punto de disparo en la cubeta es aproximadamente 4 mm. Algunas de las muestras fueron purgadas por N₂ u O₂ durante 20 min antes de medir. La absorbancia de las muestras se mantuvo entre 0.2 y 0.3 a las longitudes de onda correspondientes. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22°C).

5.4.4. Métodos computacionales

Los cálculos de DFT (*"Density Functional Theory"*) se llevaron a cabo usando el funcional B3LYP¹²⁶ junto con el conjunto de bases estándar 6-31G(d) y 6-311+G(d,p).¹²⁷ Las optimizaciones se llevaron a cabo empleando el método del gradiente analítico de Berny.¹²⁸ Las estructuras electrónicas de los puntos estacionarios han sido analizadas usando las índices de Wiberg.^{129, 130} Las energías de excitación vertical de los estados excitados singlete y triplete han sido calculadas empleando la metodología de DFT dependiente del tiempo

¹²⁶ (a) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr *Phys. Rev. B* **1998**, *37*, 785. (b) A. D. Becke *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

¹²⁷ W. J. Hehre, L. Radom, P. V. R. Schleyer, J. A. Pople *Ab initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, 1986.

¹²⁸ (a) H. B. Schlegel, *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 214. (b) H. B. Schlegel Geometry Optimization on Potential Energy Surface. In *Modern Electronic Structure Theory*; D. R. Yarkony Ed.; World Scientific Publishing: Singapore, 1994.

¹²⁹ K. B. Wiberg, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1083.

¹³⁰ A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735.

(TD-DFT).¹³¹ Los efectos del disolvente (acetonitrilo) sobre los estados excitados han sido estudiados mediante cálculos TD-DFT sobre las estructuras en fase gaseosa usando un campo de reacción auto-consistente (SCRFF)¹³² basado en el método continuo polarizable (PCM) de grupo de Tomasi¹³³ sobre las estructuras en fase gaseosa. Todos los cálculos se realizaron empleando el conjunto de programas Gaussian 03.¹³⁴

¹³¹ (a) R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454. (b) M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahud *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439.

¹³² (a) J. Tomasi, M. Persico *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027. (b) B. Y. Simkin, I. Sheikhet, *Quantum Chemical and Statistical Theory of Solutions-A Computational Approach*, Ellis Horwood, London, 1995.

¹³³ (a) E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032. (b) M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, J. Tomasi *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *255*, 327. (c) V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 404.

¹³⁴ J. A. Pople. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

Capítulo 6

*Interacciones colchicina-proteína reveladas mediante
espectroscopia de absorción transitoria tras fotoisomerización
in situ a lumicolchicinas*

6.1. Introducción

La **colchicina (COL)**, véase figura 6.1) es el alcaloide principal de las liliáceas *Colchicum Autumnale* y *Gloriosa Superba*.¹³⁵ Se ha utilizado durante más de dos milenios en el tratamiento de gota. Presenta propiedades antiinflamatorias y antipiréticas y se ha aplicado en el tratamiento de la cirrosis hepática. También se ha estudiado su eficacia como neurotoxina en el estudio de enfermedades como la epilepsia y el Alzheimer.¹³⁶ En investigación básica sobre el cáncer se ha utilizado ampliamente, debido a que interrumpe la mitosis en la metafase. Por esto, trabajos recientes se han centrado tanto en el estudio de la interacción de la colchicina con diversas proteínas, de entre las

¹³⁵ (a) F. Santavý *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1951**, 16, 655. (b) H. G. Capraro, A. Brossi *The Alkaloids*, Vol. 23, ACADEMIC PRESS, New York, **1984**, pp. 1-70

¹³⁶ (a) A. Brossi, H. J. Yeh, M. Chrzanowska, J. Wolff, E. Hammel, C. M. Lin, F. Quin, M. Sulfness, J. Silverton *Med. Res. Rev.* **1988**, 8, 77. (b) F. D. Malkinson *Arch. Dermatol.* **1982**, 118, 453. (c) R. Brecht, F. Haenel, G. Seitz, G. Frenzen, A. Pils, W. Massa, S. Wocadlo *Liebigs. Ann.* **1997**, 851. (d) J. L. Weiner, A. V. Buhler, V. J. Whatley, R. A. Harris, T. V. Dunwiddie *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 95. (e) M. P. Mattson *Brain Res.* **1992**, 582, 107.

que cabe destacar la TUB, como a la síntesis de derivados con propiedades farmacológicas mejoradas, especialmente en lo que a la actividad antitumoral se refiere.

La COL ha sido uno de los primeros agentes utilizados sobre los microtúbulos (MTBs) y su mecanismo de acción se ha estudiado extensivamente. En realidad, la TUB fue purificada por primera vez usando su gran afinidad hacia la COL y por ese motivo se hacía referencia a ella como “*la proteína que se une a la colchicina*”.¹³⁷

En las últimas décadas, la COL ha recibido considerable atención en la investigación básica del cáncer por su capacidad de interrumpir la mitosis, terminando el proceso en la metafase.¹³⁸ De acuerdo con lo mencionado anteriormente, ha sido descrito que la COL, igual que otros fármacos que se unen al dominio de la colchicina de la β -tubulina, induce la despolimerización a concentraciones altas mientras que a concentraciones relativamente bajas reprime la dinámica de MTBs.¹³⁹ Sin embargo, el mecanismo exacto de la interacción de COL con los MTBs no es totalmente conocido hasta la fecha.

¹³⁷ (a) R. C. Weisenberg, G. G. Borisy, E. W. Taylor *Biochemistry* **1968**, *7*, 4466.

(b) G. G. Borisy, E. W. Taylor *Cell Biol.* **1967**, *34*, 525. (c) G. G. Borisy, E. W. Taylor *Cell Biol.* **1967**, *34*, 535.

¹³⁸ (a) G. Hong, M. I. Bazin-Redureau, J. M. G. Scherrmann *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 147.

(b) J. M. Andreu, B. Perez-Ramirez, M. J. Gorbunoff, D. Ayala *Biochemistry* **1998**, *37*,

8356. (c) S. Banerjee, G. Chakrabarti, B. Bhattacharyya *Biochemistry* **1997**, *36*, 5600.

(d) S. B. Hastie, R. P. Rava *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6993.

¹³⁹ (a) D. A. Skoufias, L. Wilson *Biochemistry* **1992**, *31*, 738. (b) J. B. Olmsted, G. G.

Borisy *Biochemistry* **1973**, *12*, 4282. (c) J. Nunez, A. Fellous, J. Francon, A. M. Lennon

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1979**, *76*, 86.

El interés generado por este fármaco, desde el punto de vista biológico, queda patente por la gran cantidad de trabajos publicados sobre el mismo. Se han utilizado diferentes métodos, como el marcaje de fotoafinidad o desactivación de la emisión de las proteínas, para dilucidar el mecanismo de la interacción colchicina-proteína.

La tubulina posee un sitio conocido como “*el sitio de unión de la colchicina*”, debido a su gran afinidad por la primera.¹⁴⁰ Por ello, la COL ha sido empleada como sonda para estudiar el papel de los microtúbulos en las células. Los estudios de las interacciones entre TUB y COL se han convertido en un área de investigación muy activa, visto el impacto biológico de dichas interacciones. Entre las metodologías analíticas, la fluorescencia es la más conveniente, ya que se produce un gran aumento del rendimiento cuántico de emisión de la COL cuando se une a la proteína.¹⁴¹ Recientemente ha sido determinada la estructura cristalina del complejo formado entre la TUB y un derivado de la COL, proporcionando información interesante sobre la naturaleza del sitio de unión de la colchicina.¹⁴²

Se conoce la fotoquímica y la fotofísica de la colchicina en disolución (véase el apartado 1.5.3). Se sabe que tanto la velocidad, como el rendimiento de la reacción dependen de la polaridad del disolvente. Se acepta que los

¹⁴⁰ (a) R. M. Lee, D. A. Gerwitz *Drug Dev. Res.* **2008**, *69*, 352. (b) M. Imazio, R. Trincherio, Y. Adler *Future Cardiol.* **2008**, *4*, 599. (c) B. Bhattacharyya, D. Panda, S. Gupta, M. Banerjee *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155. (d) A. Dorleans, M. Knossow, B. Gignat *Meth. Mol. Med.* **2007**, *137*, 235.

¹⁴¹ (a) B. Bhattacharyya, J. Wolff *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 2627.
(b) P. Saha Sardar, S. S. Maity, L. Das, S. Ghosh *Biochemistry* **2007**, *46*, 14544.

¹⁴² R. B. G. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Joudain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow *Nature* **2004**, *428*, 198.

fotoproductos se forman desde el estado excitado singlete y que no presenta fluorescencia. Por otra parte, se ha confirmado que el estado excitado triplete no es reactivo.

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado recientemente que los estados excitados triplete pueden ser usados como sondas para los sitios de unión de fármacos a proteínas debido a que el tiempo de vida del estado excitado triplete es altamente sensible al microentorno supramolecular experimentado dentro de esas biomacromoléculas.¹⁴³

El objetivo de este estudio fue demostrar que la espectroscopia de absorción transitoria puede ser usada para revelar las interacciones entre la colchicina y proteína tras lograr la fotoisomerización *in situ* a las lumicolchicinas (LCs) antes de llevar a cabo las medidas de destello láser.

6.2. Resultados y discusión

Para comprobar el concepto han sido seleccionadas como modelos las fácilmente asequibles albúminas séricas humana y bovina (ASH y ASB). Las albúminas séricas son proteínas transportadoras extensivamente usadas que contienen varios dominios con diferente capacidad de unión.¹⁴⁴

¹⁴³ (a) M. C Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.

(b) V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538. (c) V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 423.

(d) I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11284.

¹⁴⁴ T. Peters, *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and medical Applications*, ACADEMIC PRESS, New York, **1995**.

La irradiación selectiva del cromóforo de la COL en medio acuoso a longitud de onda larga ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) fue seguida tanto por espectroscopia de UV, mediante cambios de absorbancia a 350 nm (véase Figura 6.2. A) como por HPLC (véase figura 6.2. B). Independientemente de la presencia o ausencia de proteína, el resultado fue la fotoisomerización a β -LC como producto mayoritario acompañado por menor cantidad de γ -LC (véase figura 6.1). Experimentos control demostraron que LCs permanecen sin reaccionar bajo las mismas condiciones.

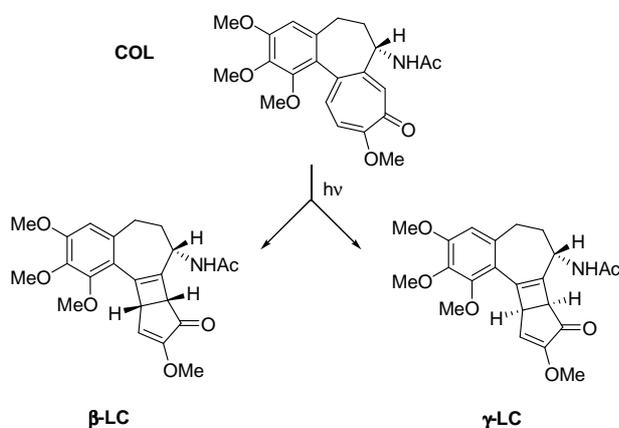


Figura 6.1. Fotoisomerización de la colchicina a las lumicolchicinas.

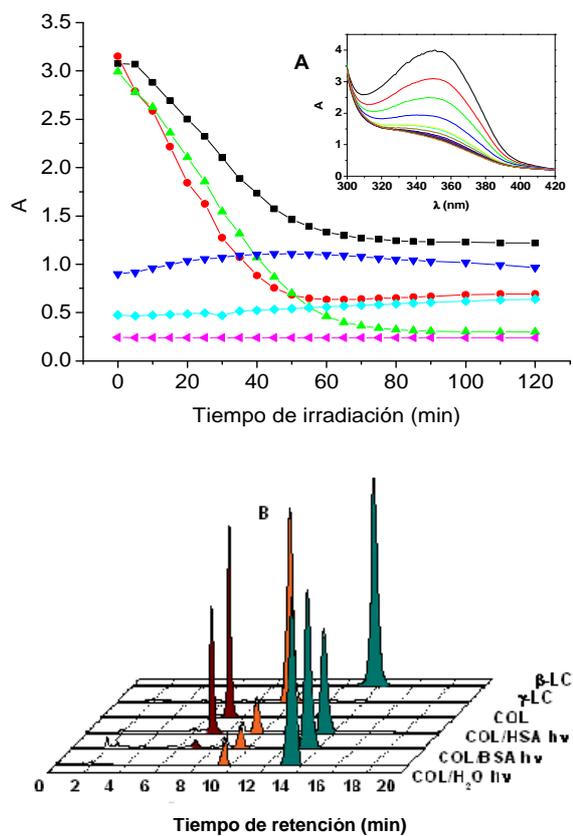


Figura 6.2. A: Irradiación de la COL en disolución acuosa en ausencia (▲) y en presencia de ASH (■) o ASB (●), monitorizada mediante cambios de absorbancia UV a 350 nm. Experimento paralelo con β-LC en agua (◀), ASH (▼) o ASB (◆). **Inset:** Típicos espectros de UV obtenidos a distintos tiempos de irradiación. B: Cromatogramas de HPLC obtenidos para muestras irradiadas de COL en H₂O y en presencia de ASH y ASB, junto muestras patrón de β-LC y γ-LC.

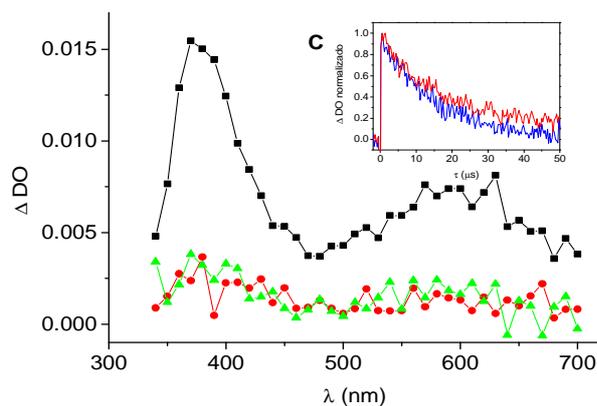


Figura 6.2. C: Espectros de absorción transitoria de la COL (2×10^{-4} M) tras irradiación en ASH (5×10^{-4} M, ■), agua (●) y en presencia de ASH (5×10^{-4} M) sin irradiación previa (▲). Todos los espectros han sido registrados 0.8 μ s después del pulso de láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm). **Inset:** Curvas de desaparición normalizadas de los tripletes generados por irradiación de COL en ASH (—) y ASB (—), registradas a $\lambda = 370$ nm.

Una vez irradiados, los complejos COL-ASH y COL-ASB han sido sometidos a fotólisis de destello láser (FDL), a 355 nm. En ambos casos han sido detectadas especies transitorias con el máximo de absorción a *ca.* 370 y 600 nm y con el tiempo de vida superior a 10 μ s (véase figura 6.2. C). Experimentos control demostraron que no se detecta absorción transitoria sin irradiación previa de complejos COL-AS ni tampoco en el caso de la COL irradiada en ausencia de proteínas.

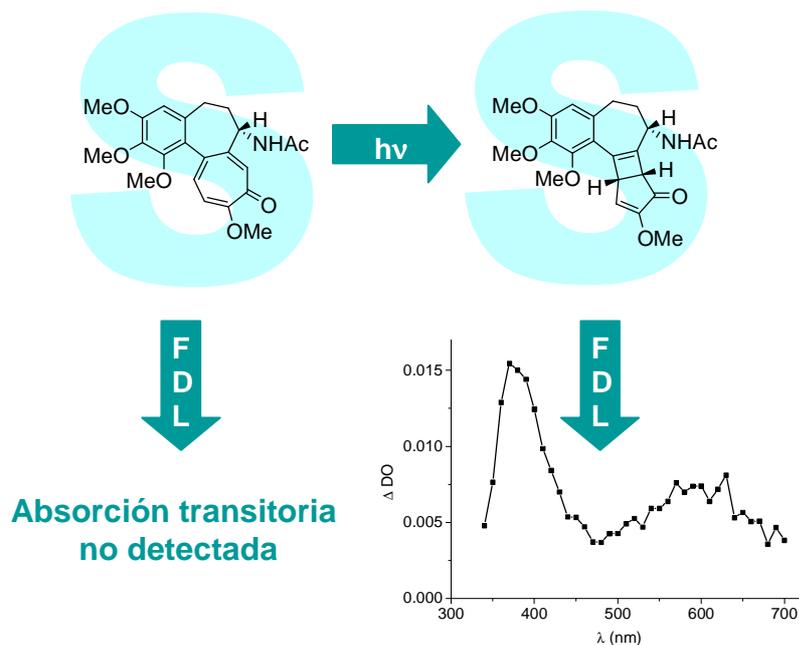


Figura 6.3. Esquema del uso de fotólisis de destello láser para el estudio de los complejos COL-AS (izquierda) y β -LC-AS (derecha). S = albúmina sérica.

A continuación, ambos isómeros de la lumicolchicina (β - y γ - LC) fueron sometidos a FDL excitando de nuevo a 355 nm con el fin de asignar el origen de las especies transitorias. En disolución acuosa (2×10^{-4} M) no ha sido observada ninguna especie transitoria. Por el contrario, FDL de las LCs en presencia de ASH o ASB bajo las mismas condiciones ha revelado formación de especies transitorias con tiempos de vida largos y con máximos de absorción a $\lambda = 370$ y 600 nm idénticas a las registradas mediante FDL de complejos COL-ASH irradiados previamente (véase figura 6.4).

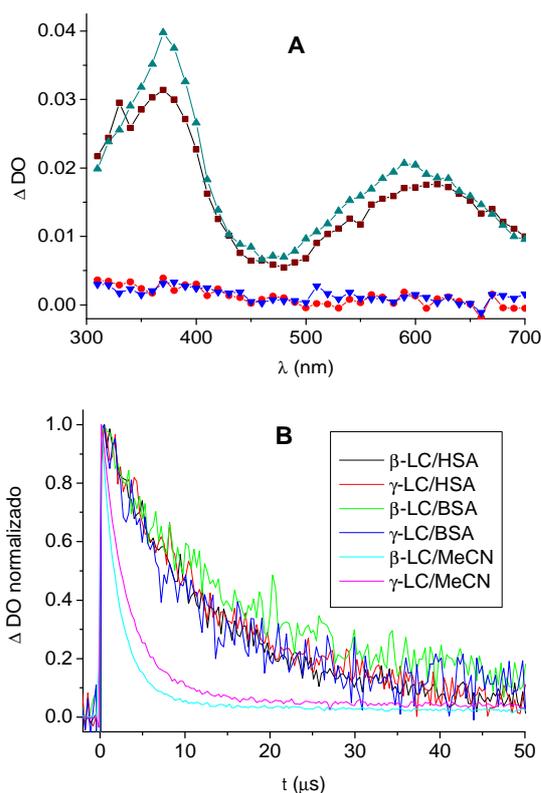


Figura 6.4. A: Espectros de absorción transitoria de LCs en presencia y en ausencia de ASH. Todos los espectros han sido registrados 3.8 μ s después del pulso de láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm): β -LC en ASH (■) y H₂O (●), γ -LC en ASH (▲) y H₂O (▼). **B:** Curvas de desaparición normalizadas de tripletes de β - y γ -LC generados en ASH, ASB y acetonitrilo registradas a $\lambda = 370$ nm.

La hidrofobicidad relativa de los sitios de unión de la proteína junto con la disminución de la desactivación no radiante asociada a la limitación de los grados de libertad dentro del medio confinado son, probablemente, responsables de las dramáticas diferencias observadas en el comportamiento fotofísico entre las LCs en disolución y dentro del entorno supramolecular.

En acetonitrilo, los espectros de las especies transitorias obtenidos fueron similares, no obstante sus tiempos de vida fueron notablemente más cortos (véase figura 6.4). En base a la eficiente desactivación por oxígeno ($k_D = 3.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la especie transitoria fue asignada, de manera tentativa, al estado excitado triplete.

Se ha llevado a cabo una serie de experimentos con β -LC, en acetonitrilo, para confirmar la asignación de triplete usando desactivadores bien establecidos. En todos los casos se observó una clara reducción de los tiempos de vida de acuerdo con las expectativas.

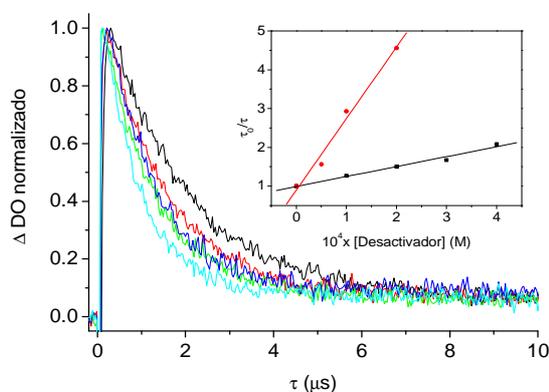


Figura 6.5. Curvas de desaparición normalizadas obtenidas tras someter distintas muestras de β -LC en acetonitrilo con cantidades crecientes de *cis*-estilbena (CS) a FDL ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$). **Inset:** Representaciones de Stern-Volmer obtenidas para la desactivación de triplete de β -LC por CS (—) y 1,3-ciclohexadieno (—).

La figura 6.5 muestra los resultados obtenidos para la desactivación por *cis*-estilbena (CS). Del diagrama de Stern-Volmer (figura 6.5, inset) han sido determinados los valores de $k_D = 1.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para

1,3-ciclohexadieno ($E_T = 52$ kcal/mol) y CS ($E_T = 58$ kcal/mol), respectivamente. Basado en esos datos fue establecida claramente la naturaleza de triplete de la especie transitoria y estimada su energía a *ca.* 60 kcal/mol para la β -LC.

El rendimiento cuántico de cruce intersistemas en acetonitrilo ha sido estudiado mediante comparación de la eficiencia de isomerización de *cis*-estilbena a *trans*-estilbena, tras la fotosensibilización por LCs y benzofenona. Ésta fue realizada usando luz ($\lambda_{exc} = 355$ nm) y disoluciones isoabsortivas ($A = 0.5$) de sensibilizadores (Sens) con concentraciones idénticas de *cis*-estilbena.

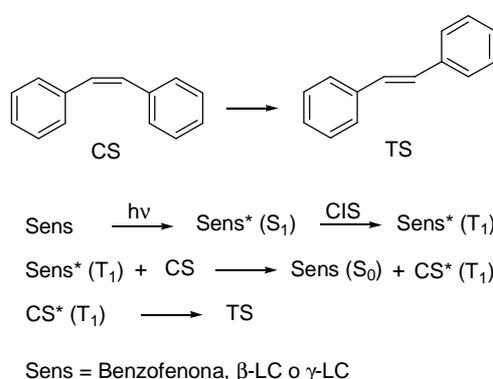


Figura 6.6. Determinación de rendimiento cuántico de CIS de las LCs mediante la isomerización de *cis*- a *trans*- estilbena fotosensibilizada por BP, β -LC o γ -LC.

La intensidad de señales del triplete obtenidas inmediatamente después de pulso de láser en sistemas LCs/ASs fueron comparadas con las generadas en acetonitrilo. La tabla 6.1 representa un resumen de resultados que también contiene los tiempos de vida del triplete en diferentes medios. Se puede observar que la formación de triplete en los sitios de unión dentro de la proteína es menos eficaz que en acetonitrilo mientras en disolución acuosa

no ocurre. Por el contrario, los tiempos de vida del triplete son notablemente más largos en el caso de complejos LCs-ASs.

Tabla 6.1 Tiempos de vida de triplete y rendimientos cuánticos encontrados para β - y γ -LC en presencia y en ausencia de proteínas.

Medio	$\tau_{\beta\text{-LC}}$ (μs)	$\tau_{\gamma\text{-LC}}$ (μs)	$\Phi_{\beta\text{-LC}}$	$\Phi_{\gamma\text{-LC}}$
H ₂ O	-	-	-	-
MeCN	2.2	3.3	0.40	0.30
HSA	12.2	16.3	0.10	0.08
BSA	19.5	11.7	0.04	0.03

6.3. Conclusiones

En conclusión, se han detectado especies transitorias mediante la fotólisis de destello láser de complejos COL-AS previamente irradiados. Dichas especies transitorias corresponden al estado excitado triplete de lumicolchicinas resultantes del proceso de fotoisomerización *in situ*. Esta estrategia puede ser en principio extendida para revelar las interacciones colchicina-proteína que podría ser de considerable interés en el caso de la tubulina en vista de sus consecuencias biológicas relacionadas con la investigación básica sobre cáncer.

6.4. Parte experimental

6.4.1. Materiales y disolventes

Albúminas séricas humana y bovina fueron suministradas por Sigma. La colchicina fue suministrada por Fluka. Ambas β - y γ -LCs fueron obtenidas por irradiación de COL a $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm. Todos los disolventes eran de calidad HPLC.

6.4.2. Procedimiento experimental para la preparación de LCs

Para obtener β - y γ - LC, ha sido disuelto 100 mg de COL en 200 ml de agua desionizada. La disolución fue sometida a la irradiación a $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm usando fotorreactores multilamparas equipados con 10 lámparas Hitachi FL8BL-B durante 16 h. Los isómeros formados de la LC fueron separados mediante HPLC semipreparativo, usando columna C18 de fase reversa y mezcla de metanol-agua (60:40 vol/vol) como eluyente. El flujo era 1.6 ml/min y detector PDA.

6.4.3. Procedimiento experimental para la fotoisomerización de COL

Disoluciones aireadas de COL, β -LC y γ -LC (2×10^{-4} M, 4 ml) fueron irradiadas en presencia y en ausencia de ASH o ASB (5×10^{-4} M), usando al fotorreactor equipado con 8 lámparas Hitachi FL8BL-B (máximo de emisión 350 nm, distribución gaussiana), a través del filtro de pyrex. El avance de la irradiación ha sido monitorizado mediante la espectroscopia UV a través del

seguimiento de cambios de absorción a 350 nm. Las muestras que contenían proteína fueron sometidas a desnaturalización por disolución de hidrocloreuro de guanidinio (6 M) y ultracentrifugación una vez terminada la irradiación. Las disoluciones resultantes han sido extraídas con cloruro de metileno, evaporado el disolvente y secadas las muestras. Los residuos fueron disueltos en 200 μ L de metanol. Alicuotas de 10 μ L fueron analizadas mediante HPLC, usando una columna C18 de fase reversa y mezcla de metanol-agua (50:50, vol/vol) como eluyente. El flujo era 1 ml/min y detector PDA.

6.4.4. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se llevaron a cabo usando un láser pulsado de Nd-YAG (*Quantel Brilliant*, de 355 nm, 5 ns fwhm, 14 mJ por pulso acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 *Luzchem*. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de xenon, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio *Tektronix* 9 bit de la serie TDS-3000 de 9 bit con ancho de banda de 300 MHz, un fotomultiplicador compacto y fuente de alimentación, un portacubetas, conectores de fibra óptica, y programa desarrollado en el entorno *LabVIEW* de *National Instruments*. El equipo de FDL proporciona un voltaje de pulsos de corte de 5 V con frecuencia y retardo de señal programables. Todos los espectros transitorios se registraron empleando cubetas de cuarzo de 10 x 10 mm² con capacidad de 4 ml; el diámetro del punto de disparo en la cubeta es aproximadamente 4 mm.

La concentración de COL, β -LC o γ -LC en disoluciones acuosas era 2×10^{-4} M, tanto en presencia como en ausencia de ASH o ASB (5×10^{-4} M). Experimentos paralelos fueron llevados a cabo con mezclas de COL/AS

previamente irradiadas. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22°C).

6.4.5. Determinación de rendimiento cuántico de cruce intersistemas para β -y γ -LC

Para determinar el rendimiento cuántico de cruce intersistemas de las lumicolchicinas se prepararon disoluciones isoabsortivas ($A_{355} = 0.5$) de β -LC ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$), γ -LC ($7.1 \times 10^{-4} \text{ M}$) y benzofenona (BP, $4.9 \times 10^{-3} \text{ M}$) en acetonitrilo. La misma cantidad de *cis*-estilbena fue añadida para alcanzar la concentración de $7.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de CS. Disoluciones desgasificadas (4 ml) han sido irradiadas usando una fuente de luz monocromática de 355 nm (lámpara de Xenon, equipo de fluorímetro) durante 15 min. Las muestras irradiadas fueron analizadas usando GC para comparar la eficiencia de la isomerización de *cis*-estilbena a *trans*-estilbena.¹⁴⁵

¹⁴⁵ G. S. Hammond et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3197.

Conclusiones

Conclusiones

1 Las propiedades de la fluorescencia del AMBI son sensibles al entorno. La intensidad de la emisión y el tiempo de vida disminuyen notablemente en medio acuoso y/o bajo condiciones aeróbicas. La espectroscopia de absorción transitoria revela la formación de un estado excitado triplete, acompañado por un radical centrado sobre nitrógeno. La contribución relativa de dichas especies al espectro depende de la naturaleza del disolvente. Los cálculos teóricos DFT proporcionan una estimación razonable de las energías de los estados excitados y explican la formación del radical centrado sobre nitrógeno, justificando la asignación como resultado de una abstracción formal del hidrógeno del grupo amino exocíclico.

2 Los estados excitados triplete $n\pi^*$ y $\pi\pi^*$ de distintas cetonas aromáticas reaccionan en presencia del AMBI. La fotólisis de destello láser revela desactivación de dichos tripletes por AMBI, como consecuencia de la formación de radicales cetilo junto con radicales aminilo **AMBI-H•**. Los resultados obtenidos indican que no se trata de abstracción pura de

hidrógeno, sino más bien de transferencia de carga seguida por transferencia de protón. Este mecanismo está de acuerdo con los cálculos termodinámicos.

3 El tiabendazol da lugar a una débil emisión de fluorescencia, con máximo a 350 nm. El espectro transitorio obtenido por fotólisis de destello láser corresponde al estado excitado triplete. Su energía se sitúa entre 61 y 68 kcal/mol y su tiempo de vida cambia notablemente en función del disolvente. Tanto la intensidad de la señal como el tiempo de vida aumentan en presencia de ciclodextrina.

4 Las especies transitorias detectadas mediante la fotólisis de destello láser de complejos COL-AS previamente irradiados. Corresponden al estado excitado triplete de las lumicolchicinas resultantes del proceso de fotosiomerización *in situ*. Su energía es de unas 60kcal/mol y su tiempo de vida es marcadamente sensible al entorno. Esta estrategia puede ser en principio extendida para revelar las interacciones colchicina-proteína, que podría ser de considerable interés en el caso de la tubulina en vista de sus consecuencias biológicas relacionadas con la investigación básica sobre cáncer.

Resúmenes

Resumen en castellano

Los bencimidazoles son un grupo de compuestos heterocíclicos extensivamente utilizados en el tratamiento de enfermedades, tanto en medicina humana como en veterinaria. Se usan como antihelmínticos, antinematodos y antiprotozoos. Algunos bencimidazoles se emplean, además, como fungicidas en el tratamiento post cosecha de frutas y verduras. La actividad antitumoral presentada por varios de los miembros de la familia ha atraído considerable la atención en los últimos años. Debido a su baja solubilidad en agua, los bencimidazoles se suministran frecuentemente encapsulados en ciclodextrinas para aumentar su eficacia.

La colchicina es un alcaloide tricíclico de origen natural. Se ha usado en el tratamiento de gota, reumatismo y fiebre mediterránea. También se ha estudiado su eficacia como neurotoxina en el estudio de la epilepsia y el Alzheimer. Recientemente, su potencial actividad antitumoral ha generado expectativas en la investigación del cáncer.

La actividad antitumoral de ambos tipos de compuestos (los bencimidazoles y la colchicina) se atribuye a su capacidad de influir en la

polimerización de la tubulina y como consecuencia en el proceso de mitosis. El mecanismo preciso de acción no es conocido. Se están llevando a cabo estudios sobre el posible uso de estos fármacos en el tratamiento del cáncer. El objetivo de la investigación sobre los agentes que inhiben la polimerización de la tubulina es determinar el mecanismo preciso de las interacciones. El conocimiento de las interacciones entre fármacos y proteínas, entre las que se encuentra la tubulina, es imprescindible para comprender la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo.

Por esta razón se propone la utilización de la fotólisis de destello láser para estudiar las interacciones entre los agentes antimitóticos en estado excitado con las proteínas y las ciclodextrinas. Esta técnica es relativamente novedosa, capaz de proporcionar datos sobre el carácter de las interacciones fármaco/proteína (sitio de unión, porcentaje de ocupación, etc.). A diferencia de otros métodos utilizados comúnmente, la fotólisis de destello láser es muy sensible, requiere baja concentración de sustratos, tiempos bajos de adquisición y proporciona resultados altamente reproducibles.

En general, se conoce poco sobre los estados excitados singlete de los bencimidazoles y de la colchicina, mientras que los estados excitados triplete no han sido descritos. En una primera fase se ha procedido a la caracterización fotofísica y fotoquímicas de los compuestos cuyas propiedades no han sido estudiadas con anterioridad. Así, se ha caracterizado el estado excitado triplete del 2-aminobencimidazol, del tiabendazol y de las lumicolchicinas. En este último caso, se ha recurrido a la generación *in situ* a través de la isomerización de la colchicina. Además, para el 2-aminobencimidazol se ha identificado el radical aminilo. A continuación la formación del estado excitado triplete ha sido utilizada como sonda en estudios mecanísticos sobre la reactividad

fotoquímica entre el triplete de distintas cetonas aromáticas y el 2-aminobencimidazol.

La segunda fase ha consistido en la valoración del uso de algunas de las especies transitorias seleccionadas para el estudio de interacción con biomoléculas y ciclodextrinas. Así, se ha estudiado el triplete del tiabendazol incluido en ciclodextrinas de distinto tamaño, mientras que se ha elegido la colchicina para el estudio de la interacción con proteínas, tomando como modelo las albúminas séricas humana y bovina.

La línea de investigación sigue abierta y actualmente se está trabajando para extender esta metodología a las interacciones de los bencimidazoles y la colchicina con la tubulina, con el fin de profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de los agentes antimitóticos.

Resúm en valencià

Els bencimidazols són un grup de compostos heterocíclics extensament utilitzats en el tractament de malalties, tant en medicina humana, com en veterinària. S'utilitzen com antihelmíntics, antinématods i antiprotozous. Alguns bencimidazols s'utilitzen també com a fungicides en el tractament post collita de fruites i verdures. L'activitat antitumoral presentada per diferents dels integrants d'aquesta família ha atret considerablement atenció en els últims anys. Degut a la seva baixa solubilitat en aigua, les bencimidazols es subministren freqüentment encapsulats en ciclodextrines per augmentar la seva eficàcia.

La coltxicina és un alcaloide tricíclic d'origen natural. S'ha usat en el tractament de gota, reumatisme i febre mediterrània. També s'ha estudiat la seva eficàcia com a neurotoxina en l'estudi de l'epilèpsia i l'Alzheimer. Recentment, la seva potencial activitat antitumoral ha generat expectatives en la investigació del càncer.

L'activitat antitumoral d'ambdós tipus de compostos (els bencimidazols i la coltxicina) s'atribueix a la seva capacitat d'influir en la polimerització de la

tubulina i com a conseqüència en el procés de mitosis. El mecanisme precís d'acció no és conegut. S'estan duent a terme estudis sobre el possible ús d'aquests fàrmacs en el tractament del càncer. El coneixement de les interaccions entre fàrmacs i proteïnes, entre els que es troba la tubulina, és imprescindible per a comprendre la biodistribució, el metabolisme, la eliminació i l'efecte farmacològic dels fàrmacs en l'organisme.

Per això es proposa la utilització de la *laser flash photolysis* per a estudiar les interaccions entre els agents antimitòtics en l'estat excitat amb les proteïnes i les ciclodextrines. Aquesta tècnica és relativament novedosa, capaç de proporcionar dades sobre el caràcter de les interaccions fàrmac/proteïna (lloc d'unió, el percentatge d'ocupació dels llocs d'unió, etc.). A diferència d'altres mètodes utilitzats, la *laser flash photolysis* és molt sensible, requereix baixa concentració de substrats, temps d'adquisició baixos i proporciona resultats altament reproduïbles.

En general, és coneix poc sobre els estats excitat singlet, mentre que els estats excitats triplet no han estat descrits. En una primera fase s'ha procedit a la caracterització fotofísica y fotoquímica dels compostos, les propietats dels quals, no han estat estudiades amb anterioritat. Així, s'han caracteritzat l'estat excitat triplet de l'2-aminobenzimidazol, del tiabendazol i de les lumicolchicines. En aquest últim cas, per generació *in situ* a través de d'isomerització de la coltxicina. A més, pel 2-aminobenzimidazol, s'ha identificat el radical aminil. A continuació la seva formació ha estat utilitzada com a sonda en estudis mecanístics duts a terme sobre la reactivitat entre el triplet de diferents cetones aromàtiques i el 2-aminobenzimidazol.

La segona fase ha consistit en la valoració de l'ús de les espècies transitòries d'aquests fàrmacs com a sondes en l'estudi d'interacció amb biomolècules i ciclodextrines. Així, s'han estudiat les interaccions del triplet del tiabendazol amb

ciclodextrines de diferent mida, mentre que s'ha elegit la coltxicina per l'estudi de d'interacció amb proteïnes, triant com a model les albúmines sèries humana i bovina.

La línea d'investigació segueix oberta y actualment s'està treballant per extrapolar aquesta metodologia a les interaccions entre els bencimidazols i la coltxicina amb la tubulina, amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement del mecanisme d'acció dels agents antimitòtics.

Summary

Benzimidazoles are members of a group of heterocyclic compounds extensively used in the treatment of diseases in human and veterinary medicine. They are commonly used as anti-helminthic, anti-nematode and anti-protozoal agents. In addition, many of them have found application as fungicides in the post-harvest treatment of fruits and vegetables. In the last years, the anti-cancer activity presented by several members of the benzimidazole family has attracted considerable attention. Benzimidazoles are frequently used in form of cyclodextrins inclusion complexes, due to their low solubility in water, in order to enhance their bioavailability.

Colchicine is a natural tricyclic alkaloid used in the treatment of gout, rheumatism and Mediterranean fever. Its efficacy as a neurotoxin in the research on epilepsy and Alzheimer's disease has also been studied. Recently, colchicine has received considerable attention in cancer research due to its potential activity.

The anti-cancer properties of both, benzimidazoles and colchicine, are thought to result from their ability to interfere in tubulin polymerization and,

as a consequence, in the process of mitosis. However, the exact mechanism of action is not well understood. Currently, there are several ongoing studies on the possible use of these drugs in cancer research.

The aim of the present investigation on agents capable to inhibit tubulin polymerization is to gain insight into the mechanism of their interactions with tubulin. The understanding of drug-protein interactions, is crucial to explain the bio-distribution, metabolism, elimination and pharmacological effect of drugs in human organism.

For this reason, laser flash photolysis has been used here to study interactions between excited anti-mitotic agents (benzimidazoles and colchicines) and proteins or cyclodextrins, which are important to enhance solubility of various drugs including benzimidazoles.

This technique is capable to provide information about the nature of drug/protein interactions (binding domain, distribution etc.).

Unlike the other commonly employed methods, laser flash photolysis is very sensitive, requires low concentration of substrates as well as short acquisition times and provides highly reproducible results.

Generally, little is known about the singlet excited state of benzimidazoles and colchicines, while there is no data on the corresponding triplet excited states. In a first stage, photophysical and photochemical characterization of the selected compounds has been undertaken. Thus, the triplet excited states of 2-aminobenzimidazole, thiabendazole and lumicolchicines have been characterized. In the last case, the strategy has been based on the generation *in situ* through the isomerization of colchicine. Besides, aminyl radical of 2-aminobenzimidazole has been identified and its formation has

been used as a probe for mechanistic studies on reactivity between triplet excited state of different aromatic ketons and 2-aminobenzimidazole.

The second research phase consisted of the evaluation of the use of transient species derived from these drugs as probes for studies of their interactions with biomolecules and cyclodextrins. Thus, the interactions of thiabendazole triplet excited state with cyclodextrins of a different size have been studied, while colchicine and lumicolchicines have been chosen for the study of their interaction with proteins. Human and bovine serum albumins were selected as model proteins.

Current efforts are directed to extend this methodology to study the interactions of benzimidazoles and colchicine with tubulin, in order to gain insight into the mechanism of action of antimitotic agents.

Anexos

Anexo I. Cinética de la fotoisomerización de COL y LCs**A I. 1. Longitud de onda de excitación $\lambda = 267$ nm**

Se han realizado estudios de cinética de la fotoisomerización de la colchicina y las lumicolchicinas bajo excitación a distintas longitudes de onda. Asimismo se ha evaluado la influencia del disolvente y de presencia de nitrógeno. La reacción fue seguida a través de cambios en el espectro de UV/Vis. Los resultados se muestran a continuación.

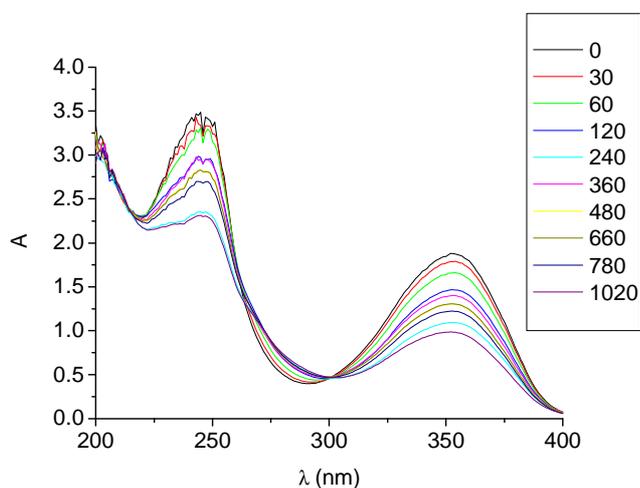


Figura A.I.1. Irradiación de disolución acuosa de COL (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 267$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

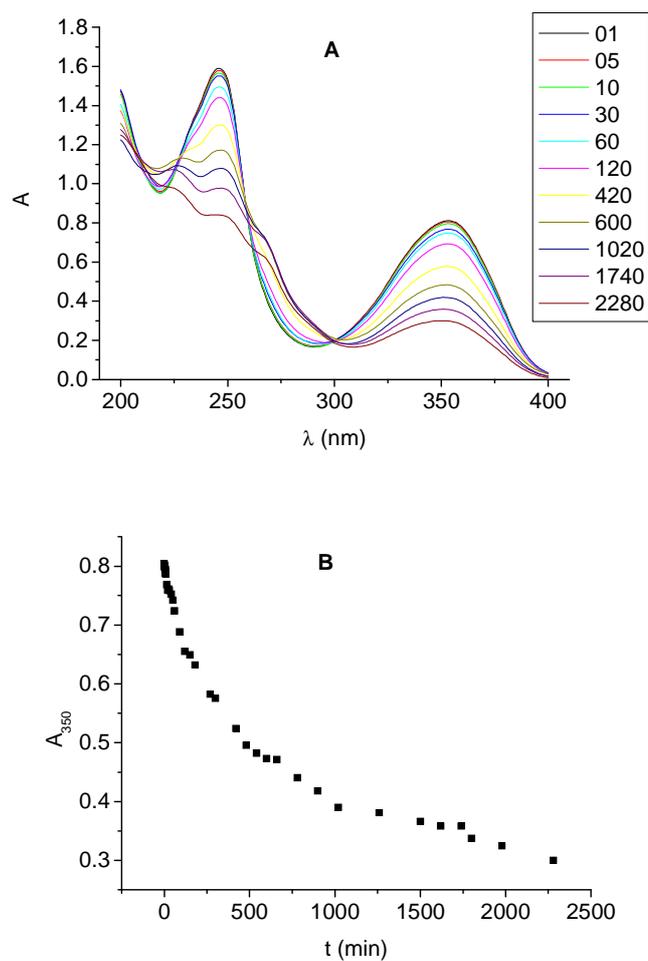


Figura A.I.2. A: Irradiación de disolución acuosa de COL (5×10^{-5} M) bajo atmósfera de nitrógeno, $\lambda_{exc} = 267$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos. **B:** Evolución de la absorbancia registrada a $\lambda = 350$ nm (el máximo de absorción de la COL) con el tiempo de irradiación.

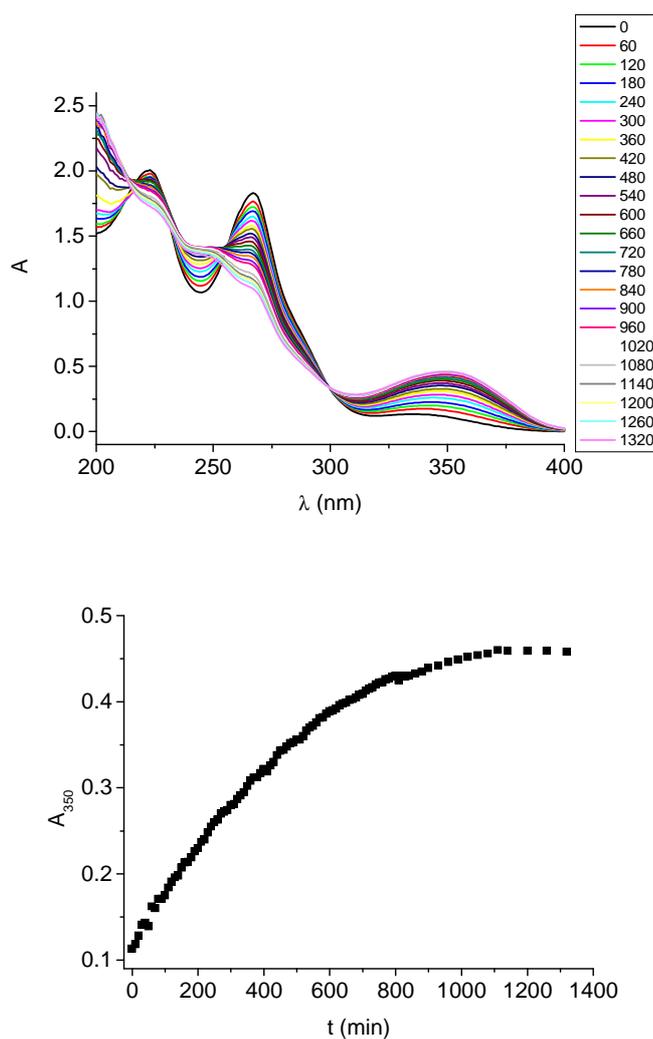


Figura A.I.3. A: Irradiación de disolución acuosa de β -LC (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 267$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

B: Evolución de absorbancia registrada a $\lambda = 350$ nm (el máximo de absorción de la COL) con el tiempo de irradiación.

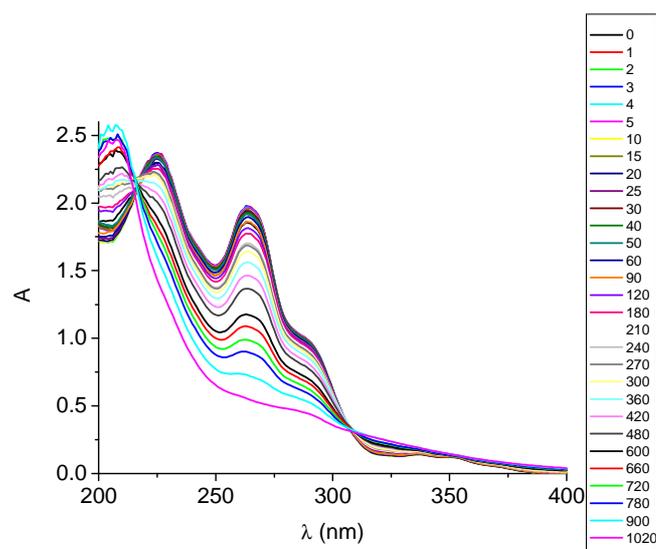


Figura A.I.4. Irradiación de disolución de β -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

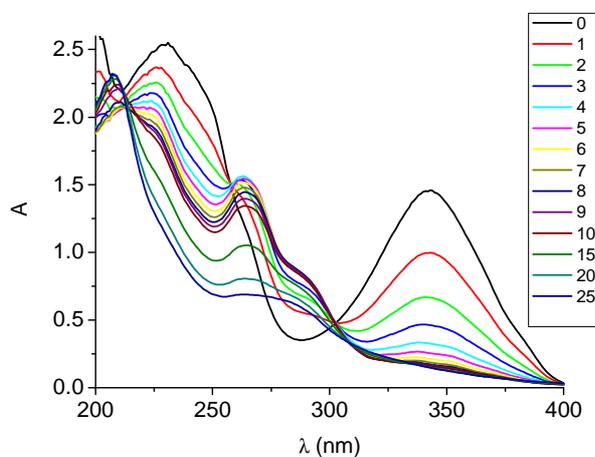
A I. 2. Longitud de onda de excitación $\lambda = 254$ nm

Figura A.I.5. Irradiación de disolución de COL en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 254$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

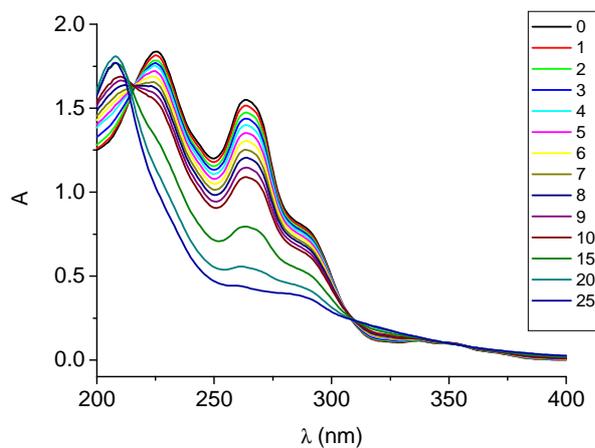


Figura A.I.6. Irradiación de disolución de β -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 254$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

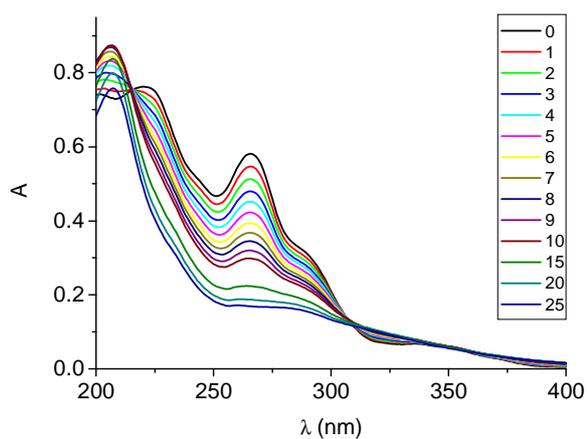


Figura A.I.7. Irradiación de disolución de γ -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 254$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

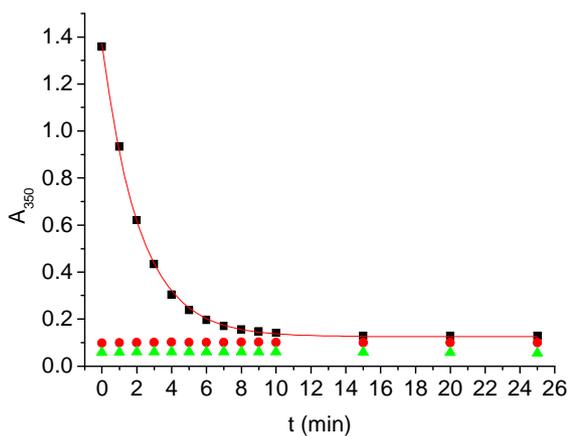


Figura A.I.8. Irradiación de disolución de COL, β - y γ -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 254$ nm. Evolución de la absorbancia registrada a $\lambda = 350$ nm (el máximo de absorción de la COL) con el tiempo de irradiación.

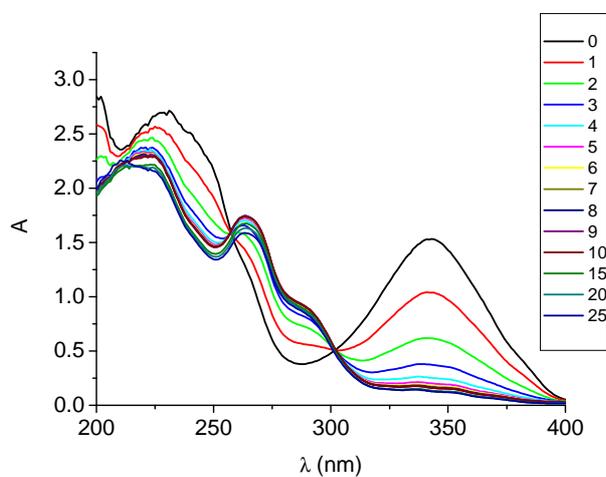
A I. 3. Longitud de onda de excitación $\lambda = 350$ nm

Figura A.I.9. Irradiación de disolución de COL en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 350$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

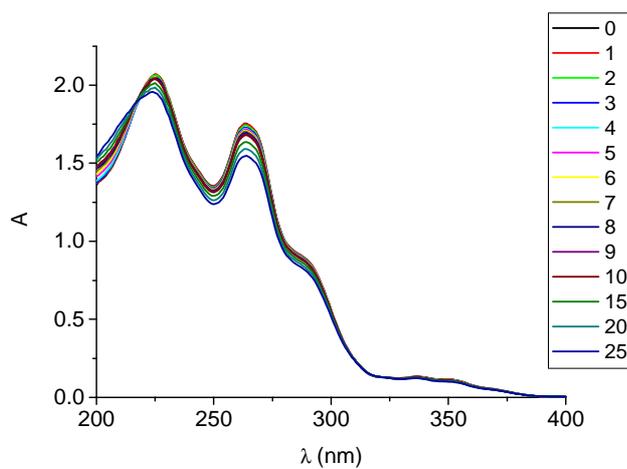


Figura A.I.10. Irradiación de disolución de β -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 350$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

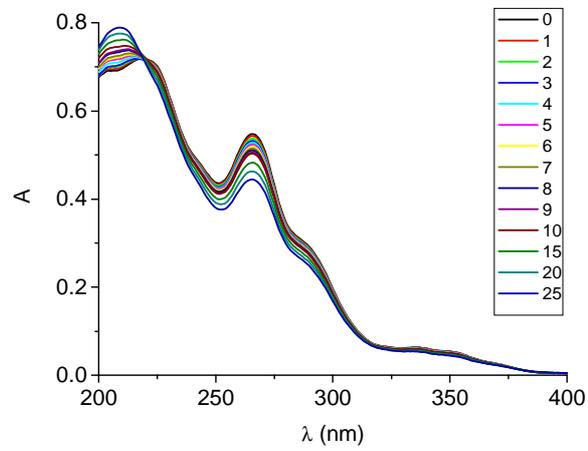


Figura A.I.11. Irradiación de disolución de γ -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm. El tiempo de irradiación se muestra en minutos.

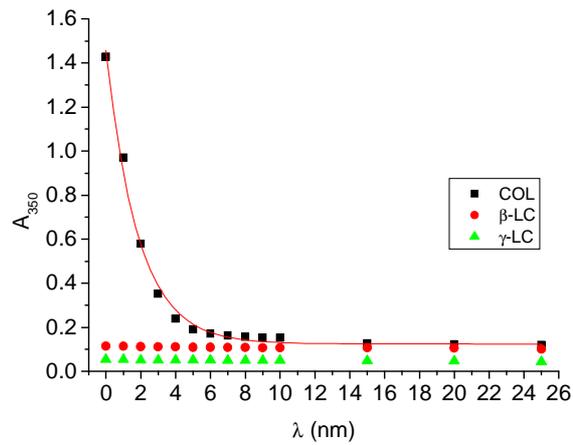


Figura A.I.12. Irradiación de disolución de COL, β - y γ -LC en MeCN (1×10^{-4} M) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm. Evolución de la absorbancia registrada a $\lambda = 350$ nm (el máximo de absorción de la COL) con el tiempo de irradiación.

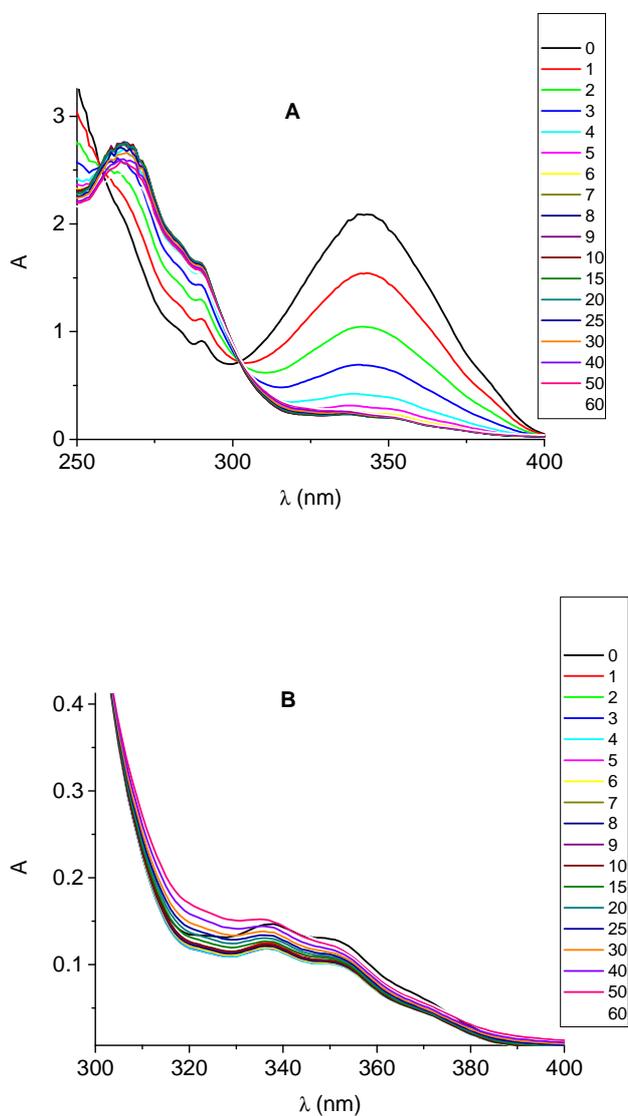
A I. 4. Irradiación en presencia del metil ester de triptófano (TrpMe)

Figura A.I.13. Irradiación de COL (A) y β -LC (B) en presencia de TrpMe (1×10^{-4} M, 1:1) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 350$ nm.

A I. 5. Irradiación en presencia de las albúminas séricas

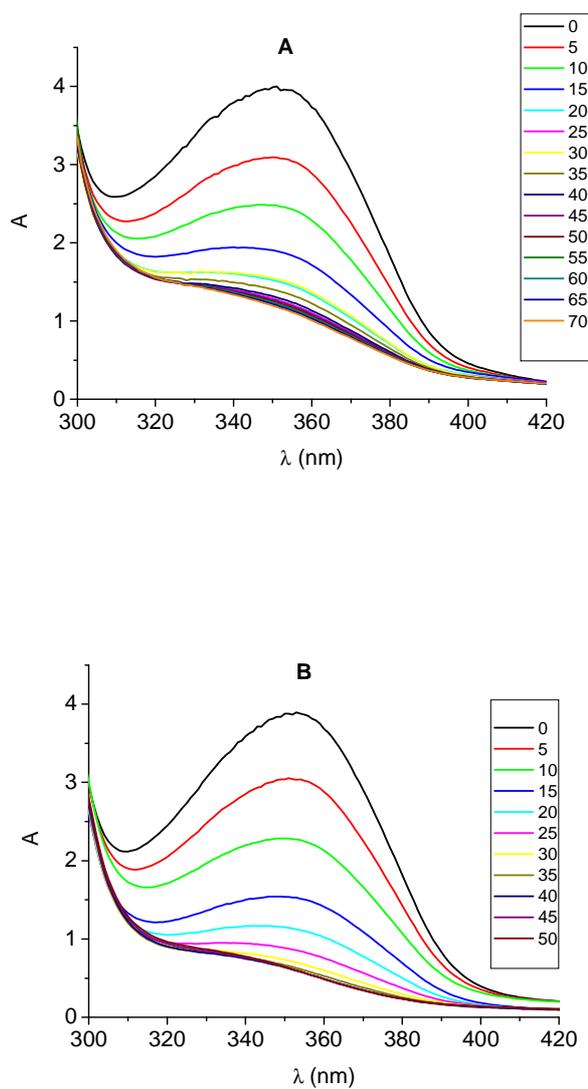


Figura A.I.14. Irradiación de COL en presencia de ASH (A) y ASB (B) bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 350$ nm. (COL/AS = 2×10^{-4} M / 5×10^{-4} M).

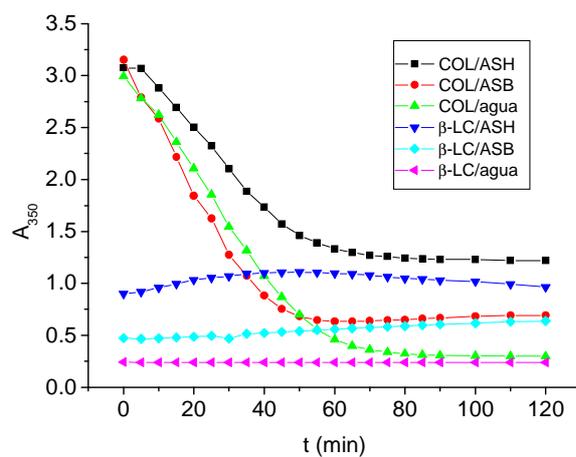


Figura A.I.15. Irradiación de COL y β -LC en medio acuoso y en presencia de ASH y ASB bajo atmósfera de aire, $\lambda_{exc} = 350$ nm. (COL/AS = 2×10^{-4} M / 5×10^{-4} M). Evolución de la absorbancia registrada a $\lambda = 350$ nm (el máximo de absorción de la COL) con el tiempo de irradiación.

Anexo II. Contribuciones a congresos

1 15 Jornadas Hispano-Francesas de Química Orgánica

15-20 de junio de 2008, Boussens, Francia

Comunicación oral: *Fotoisomerización de lumicolchicinas en matrices protéicas.*

2 XXII IUPAC Symposium on Photochemistry

28 de julio-1 de agosto 2008, Goteborg, Suecia

Poster: *Steady-State and Time-Resolved Studies on the Photoisomerization of Lumicolchicines within Serum Albumins.*

3 XXIV International Conference on Photochemistry

19-24 de julio 2009, Toledo

Poster: *Colchicine-Protein Interactions Revealed by Transient Absorption Spectroscopy after in situ Photoisomerization to Lumicolchicines.*

4 IV Workshop on Sensors and Molecular Recognition

8-9 de julio 2010, Valencia

Poster: *Interacciones colchicina-proteína reveladas por espectroscopía de absorción transiente tras la fotoisomerización in situ a lumicolchicinas.*

Anexo III. Publicaciones

- 1 Pavel Bartovsky, Rosa Tormos, Miguel A. Miranda
“Colchicine-Protein Interactions Revealed by Transient Absorption Spectroscopy after in situ Photoisomerization to Lumicolchicines”.
Chem. Phys. Lett. **2009**, *480*, 305-308.

- 2 Verónica Viudes, Pavel Bartovsky, Luis R. Domingo, Rosa Tormos, Miguel A. Miranda
“Experimental and Theoretical (DFT) Characterization of the Excited States and N-centered Radical Species Derived from 2-aminobenzimidazole, the Core Substructure of a Family of Bioactive Compounds”.
J. Phys. Chem. B **2010**, *114*, 6608-6613.

- 3 Dolors Jornet, Pavel Bartovsky, Luis R. Domingo, Rosa Tormos, Miguel A. Miranda
“Experimental and Theoretical Studies on the Mechanism of Photochemical Hydrogen Transfer from 2-Aminobenzimidazole to $n\pi^$ and $\pi\pi^*$ Aromatic Ketones”.*
J. Phys. Chem. B, **2010**, *114*, 11920-11926.

- 4 Pavel Bartovsky, Luis R. Domingo, Dolors Jornet, Rosa Tormos, Miguel A. Miranda
“Experimental and Theoretical (DFT) characterization of the Triplet Excited State of Bioactive Compound Thiabendazole”.
Enviado a *J. Phys. Chem.*.

*Yo, marínero, en la ríbera mía,
posada sobre un cano y dulce río
que da su brazo a un mar de Andalucía,*

*sueño en ser almirante de navío,
para partír el lomo de los mares
al sol ardiente y la luna fría.*

Rafael Albertí

