

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química



**Especies transitorias en sistemas bioorgánicos
modelo conteniendo cromóforos de tipo
bifenilo, naftaleno o benzofenona**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Paula Bonancía Roca

Dirigida por:

Dra. M. Consuelo Jiménez Molero

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química



**Especies transitorias en sistemas bioorgánicos
modelo conteniendo cromóforos de tipo
bifenilo, naftaleno o benzofenona**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Paula Bonancía Roca

Dirigida por:

Dra. M. Consuelo Jiménez Molero

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

Valencia, 2012

Dña. MARIA CONSUELO JIMÉNEZ MOLERO, Catedrática de Universidad de Química Orgánica de la Universitat Politècnica de València, y D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Catedrático de Universidad de Química Orgánica de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: **“Especies transitorias en sistemas bioorgánicos modelo conteniendo cromóforos de tipo bifenilo, naftaleno o benzofenona”**, ha sido desarrollada por PAULA BONANCÍA ROCA, bajo su dirección, en el Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València.

Dña. M. Consuelo Jiménez Molero

D. Miguel A. Miranda Alonso

- Adiós- dijo.

- Adiós- dijo el zorro-. Éste es mi secreto. Es muy sencillo: sólo se ve bien con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos.

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY, El Principito

*¿Y si durmieras? ¿Y si en tu sueño, soñarás?
¿Y si soñarás que ibas al cielo y allí recogías una extraña y
hermosa flor?
¿Y si cuando despertaras tuvieras la flor en tu mano?
Ah, ¿entonces qué?*

COLERIDGE

*A mis padres, Pepe y Pilar,
a mi hermano Álex,
a Edu*

Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando en Septiembre del 2008 llegué al Poli, empezando esta aventura llamada “doctorado”, en cambio, ya han pasado un poco más de cuatro años, lo que parecía una eternidad está llegando a su fin. Ahora toca volver a poner el cronómetro a cero y empezar otra nueva etapa.

Estos años de formación y trabajo me han ayudado a crecer, tanto a nivel profesional como personal. Así que quiero mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la culminación de esta tesis, que han hecho el camino más llevadero, tanto dentro como fuera del Poli.

En primer lugar, gracias al MICINN por la beca FPI disfrutada.

A mis directores de tesis, Chelo y Miguel Ángel, porque como ellos dicen, han sido mamá y papá en el Poli, porque confiaron en mí y me brindaron la oportunidad de realizar la tesis bajo su dirección, porque me han formado y enseñado.

A mis compañeros de laboratorio, a “mis chicos”, Cal-lo, Pavel y Rafa, porque conseguisteis que todos los días tuviera ganas de llegar al lab., Cal-lito, tú me enseñaste “all about LFP”, Rafa, las síntesis, con tus

consejos, siempre fueron más fáciles, y Pavel, tu música, tus consejos, siempre me alegraban el día. Con los tres disfruté de un gran viaje al norte, de cervecitas, cenas, etc., sin vosotros, nunca hubiera sido lo mismo!!! A Raúl, el papá en el laboratorio, porque siempre te has preocupado por nosotros, por tus chistes (malísimos!!), pero con ellos nos hemos reído mucho. A Dani y a Neus, porque vuestra alegría y positivismo se contagian. A Nacho, porque tuviste mucha paciencia al empezar y enseñarme un poco de todo, porque volviste de París y aquí seguía yo, otra vez!!, gracias por tu ayuda incondicional. A Dolors, mi gran compañera, mi amiga.

Al resto de gente y profesores del departamento, con los que he compartido cafés, cervecitas, grandes conversaciones... porque por los pasillos siempre se ha respirado buen ambiente.

A los compañeros del ITQ, en especial a Edurne, ¿qué voy a decir de ti que no sepas? Gracias por tus ánimos, por tus consejos, por estar siempre a mi lado, por...

A mis amigas, en especial a Patri, Cedes y Tania, por los cafés de cada día (cuando conseguíamos cuadrar horarios), por vuestra amistad, por vuestro apoyo, por vuestra paciencia en estos últimos meses en los que he estado “desaparecida”.

A mis padres y mi hermano, porque todo lo que soy os lo debo a vosotros. Porque necesitaría otra tesis para agradeceros todo lo que hacéis por mí.

A Edu, porque haces que sea mejor persona, porque siempre sabes sacarme una sonrisa, porque te has convertido en imprescindible, porque estoy deseando que llegue junio, porque TVTB.

A las personas que, siendo conscientes o no, han contribuido a que los días interminables hayan sido menos duros. A todos vosotros, gracias.

Y sin que suene pretencioso, porque me lo he ganado, quiero acabar con un: «Por mí y por todos mis compañeros, y por mí el primero».

Abreviaturas y símbolos

ΔG	Energía libre
$\langle \tau \rangle$	Tiempo de vida promedio
ΔA	Incremento de absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
Arg	Arginina
AS	Albúmina sérica
ASH	Albúmina sérica humana
BPOH	Ácido 2-(2-hidroxi-1,1-bifenil-4-il) propanoico
BtOH	1-hidroxibenzotriazol
BZP	Benzofenona
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CIS	Cruce intersistemas
CPF	Carprofeno
Cys	Cisteína
δ	Desplazamiento químico
DCC	N, N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMAP	4-(dimetilamino) piridina
DMN	Dimetilnaftaleno
DMSO	Dimetilsulfóxido
dThd	Timidina
ϵ	Coefficiente de absorción molar
E*	Energía del estado excitado
EDC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
E_{OX}	Potencial de oxidación
E_{RED}	Potencial de reducción
E_S	Energía de singlete
ESIPT	Excited state intramolecular proton transfer (transferencia de protón intramolecular en el estado excitado)
ϵ_T	Coefficiente de absorción molar de triplete

E_T	Energía de triplete
EtOH	Etanol
EXC	Excímero
F	Fluorescencia
FBP	Flurbiprofeno
φ_{CIS}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
φ_D	Rendimiento cuántico de desactivación
φ_{D(din)}	Rendimiento cuántico de desactivación dinámico
φ_{D(tot)}	Rendimiento cuántico de desactivación total
FDL	Fotólisis de destello láser
φ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
φ_T	Rendimiento cuántico de triplete
FU	Fluorescence upconversion (fluorescencia de suma de frecuencias)
fwhm	Full width at half maximum (anchura a media altura)
η	Índice de refracción
H₂O	Agua
HCl	Acido clorhídrico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAc	Acido acético
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HRMS	High resolution mass spectrometry (espectrometría de masas de alta resolución)
I_F	Intensidad de fluorescencia
IBP	Ibuprofeno
I_p	Intensidad de fosforescencia
iPrOH	Isopropanol
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
k_{CI}	Constante de desactivación de conversión interna
k_{CIS}	Constante de desactivación de cruce intersistemas

k_D	Constante de desactivación
k_{EX}	Constante de formación excíplejo
k_{EXC}	Constante de formación excímero
k_F	Constante de desactivación de fluorescencia
k_P	Constante de desactivación de fosforescencia
k_{TE}	Constante de transferencia de energía
k_{TESS}	Constante de transferencia de energía singlete-singlete
k_{TP}	Constante de transferencia protón
KTP	Ketoprofeno
$LiAlH_4$	Hidruro de aluminio y litio
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
NaCl	Cloruro sódico
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NEA	(1-naftil) etilamina
NPT	Naftaleno
NPX	Naproxeno
P	Fosforescencia
PBS	Disolución de tampón fosfato
PSP	Pseudepéptido
r_0	Anisotropía de fluorescencia a tiempo cero
RC	Recombinación de carga
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RTE	Retrotransferencia electrónica
RV	Relajación vibracional
S	Singlete
T	Triplete
TCSPC	Time-correlated single-photon counting (recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente)

TE	Transferencia de energía
TEI	Transferencia electrónica
TESS	Transferencia de energía singlete-singlete
TETT	Transferencia de energía triplete-triplete
τ_F	Tiempo de vida de fluorescencia
Thy	Timina
TP	Transferencia de protón
Trp	Triptófano
TrpMe	Éster metílico del triptófano
τ_T	Tiempo de vida de triplete
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Ψ	% de fotones de luz absorbidos
λ_{em}	Longitud de onda emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda máxima



Índice



CAPÍTULO 1. Introducción

1.1. Compuestos bicromofóricos (diadas)	3
1.1.1. Definición.....	3
1.1.2. Procesos fotoquímicos y fotofísicos	5
1.1.3. Procesos fotoinducidos	9
1.1.3.1. Transferencia de energía	10
1.1.3.2. Transferencia electrónica y formación de exciplejos ..	12
1.1.3.3. Transferencia de protón	14
1.1.3.4. Formación de excímero	14
1.2. Propiedades fotofísicas de los cromóforos benzofenona, naftaleno, bifenilo, triptófano y timidina	17
1.2.1. Benzofenona (BZP)	17
1.2.2. Naftaleno (NPT)	20
1.2.3. Bifenilo (BPN).....	22
1.2.4. Triptófano (Trp)	24
1.2.5. Timidina (dThd).....	26
1.2.6. Tabla con las propiedades fotofísicas de los cromóforos	28
1.3. Antecedentes bibliográficos.....	29
1.3.1. Diadas bifenilo-triptófano	29
1.3.2. Diadas naftaleno-timidina	33
1.3.3. Diadas benzofenona-naftaleno	36
1.4. Albúmina sérica humana (ASH).....	40
1.4.1. Función de ASH.....	41
1.4.2. Estructura general de ASH.....	41

1.4.3. Interacción con fármacos	42
1.5. Referencias bibliográficas.....	44

CAPÍTULO 2. Objetivos

2.1. Objetivo general	51
2.2. Objetivos concretos.....	51

CAPÍTULO 3. Sistemas intermoleculares benzofenona/naftaleno

3.1. Introducción	55
3.2. Resultados y Discusión	58
3.2.1. Sistemas benzofenona/naftaleno	58
3.2.2. Sistemas ketoprofeno/(1-naftil)etilamina.....	63
3.3. Conclusiones.....	70
3.4. Parte experimental.....	71
3.4.1. Materiales y disolventes.....	71
3.4.2. Medidas de fluorescencia.....	71
3.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser	71
3.4.4. Medidas de fosforescencia.....	72
3.5. Referencias bibliográficas	73

CAPÍTULO 4. Pseudopéptidos basados en naftaleno

4.1. Introducción	79
4.2. Resultados y Discusión	83
4.2.1. Sistemas BZP/NPT.....	83
4.2.2. Sistemas BZP-BPN/NPT.....	91
4.3. Conclusiones.....	98
4.4. Parte experimental.....	99
4.4.1. Materiales y disolventes.....	99
4.4.2. General	99
4.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser	100
4.4.4. Síntesis de las diadas	100
4.4.5. Caracterización de las diadas	102
4.5. Referencias bibliográficas	107

CAPÍTULO 5. Diadas bifenilo-timidina

5.1. Introducción	111
5.2. Resultados y Discusión	114
5.2.1. Sistemas intermoleculares FBP/dThd.....	114
5.2.2. Comportamiento fotofísico de las diadas FBP-dThd	117
5.3. Conclusiones.....	134
5.4. Parte experimental.....	136
5.4.1. Materiales y disolventes.....	136
5.4.2. General	136

5.4.3. Medidas de fluorescencia.....	137
5.4.4. Medidas de fotólisis de destello láser	139
5.4.5. Medidas de fosforescencia.....	138
5.4.6. Síntesis de las diadas	139
5.4.7. Caracterización de las diadas	140
5.5. Referencias bibliográficas	146

CAPÍTULO 6. Sistemas modelo bifenilo-triptófano

6.1. Introducción	153
6.2. Resultados y discusión	156
6.2.1. Diadas FBP-Trp.....	156
6.2.2. Diadas BPOH-Trp	160
6.3. Conclusiones.....	173
6.4. Parte experimental.....	175
6.4.1. Materiales y disolventes.....	175
6.4.2. General	175
6.4.3. Medidas de fluorescencia.....	176
6.4.4. Síntesis de los compuestos estudiados	176
Síntesis de BPOH	177
Síntesis de BPOHMe.....	177
Síntesis de diadas BPOH-Trp	178
6.4.5. Caracterización de los compuestos estudiados	179
6.5. Referencias bibliográficas	189

CAPÍTULO 7. Estudios de derivados de bifenilo en medio proteico

7.1. Introducción	193
7.2. Resultados y discusión	195
7.2.1. Sistemas FBP/ASH.....	193
7.2.2. Comportamiento fotofísico de BPOH en ausencia de proteína	202
7.2.3. Estudio de sistemas (S)- y (R)-BPOH / ASH.....	208
7.3. Conclusiones.....	215
7.4. Parte experimental.....	217
7.4.1. Materiales y disolventes.....	217
7.4.2. Medidas de fluorescencia.....	217
7.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser	220
7.4.4. Medidas de fosforescencia.....	220
7.5. Referencias bibliográficas	221

CAPÍTULO 8. Instrumentación

8.1. Instrumentación general	225
8.1.1. Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono	225
8.1.2. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	225
8.1.3. Espectros de infrarrojo	226
8.1.4. Difracción de rayos-X.....	226

8.2. Instrumentación fotoquímica	226
8.2.1. Espectros de absorción ultravioleta-visible.....	226
8.2.2. Irradiación fotoquímica en estado estacionario	227
8.2.3. Fotólisis de destello láser	228
8.2.4. Fluorescencia	229
8.2.5. Fosforescencia	233
CONCLUSIONES	235
RESÚMENES	241
ANEXO I. Contribución a congresos	255
ANEXO II. Publicaciones	261

1.1. Compuestos bicromofóricos (diadas)

1.1.1. Definición

Se puede definir un cromóforo como una molécula o parte de una molécula capaz de absorber luz dando lugar a procesos fotoquímicos y/o fotofísicos. Un compuesto bicromofórico (o diada) es una molécula constituida por dos unidades moleculares diferenciadas conectadas mediante un puente molecular y cuyo espectro de absorción contiene los espectros de absorción de los dos cromóforos.¹⁻³ El puente molecular es una unidad espaciadora que mantiene conectados covalentemente los cromóforos y permite que la excitación de cualquiera de ellos dé lugar a interacciones entre los mismos, pudiéndose observar la formación de complejos en el estado excitado (exciplejos) o procesos intramoleculares de transferencia de electrón, de protón o de energía.

Normalmente representaremos un compuesto bicromofórico como D-()-A, donde D (dador) es el cromóforo que transfiere la carga, el protón o la energía, y A es el cromóforo aceptor. El espaciador entre ambas especies lo representaremos como -()-.

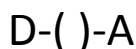


Figura 1.1. Representación general de un compuesto bicromofórico (diada).

La elección de estos sustratos D-()-A como objeto de estudio no es arbitraria, sino que responde a varias características que los hacen especialmente útiles, como son:

- Los fenómenos fotofísicos y la reactividad fotoquímica con participación de las dos subunidades se encuentran favorecidos, ya que se producen a nivel intramolecular.

- El espaciador permite modular la distancia entre D y A, haciendo que intervengan más eficientemente mecanismos tales como la transferencia de energía tipo Förster⁴ o Dexter⁵; en función de la rigidez que proporcione al sistema, es relevante la participación de diversas conformaciones.

- Es posible introducir subunidades que posean centros quirales, con la consiguiente posibilidad de analizar si existe estereodiferenciación en el comportamiento de los estados excitados.

- La presencia de sustituyentes en los cromóforos (que permite modular la energía de los estados excitados, su potencial redox o incluso su configuración electrónica, i. e. $\pi\pi^*$ versus $n\pi^*$) puede dar lugar a cambios en su fotorreactividad y/o propiedades fotofísicas, introduciendo una gran versatilidad.⁶

1.1.2. Procesos fotoquímicos y fotofísicos

La fotoquímica molecular es la ciencia relacionada con la descripción física y química de los procesos que se derivan de la absorción de fotones.

Un proceso fotoquímico se inicia por absorción de radiación UV-vis (200-800 nm). Esta energía no se distribuye al azar en la molécula, sino que es absorbida selectivamente por grupos cromóforos (cuyos electrones se encuentran en orbitales n o π , como dienos, grupos carbonilo, aromáticos, etc). Los espectros de absorción y emisión de una molécula proporcionan información relevante sobre la estructura, la energía y la dinámica de los estados electrónicos excitados. Su estudio puede ayudar a comprender e interpretar la reactividad fotoquímica y las propiedades fotofísicas de los compuestos.

Una molécula, tras absorber un fotón, pasa a un estado electrónicamente excitado, el cual es inestable respecto al estado fundamental. La molécula excitada, si no modifica su estructura química mediante un proceso fotoquímico, buscará otra forma de perder su energía para volver a su estado fundamental, dando lugar a un proceso fotofísico. Así pues, los distintos procesos por los cuales se puede producir la desactivación de una molécula al encontrarse en su estado excitado se pueden agrupar en dos: fotoquímicos y fotofísicos.⁷

Procesos fotoquímicos: son transformaciones que puede sufrir una molécula desde su estado electrónico excitado para dar lugar a

estructuras de diferente constitución o configuración a la del estado inicial.

Procesos fotofísicos: son transiciones en las que se producen interconversiones entre estados excitados o entre estados excitados y el estado fundamental. Estos procesos pueden ser radiativos o no radiativos. Un proceso *radiativo* implica la emisión de radiación electromagnética desde el estado electrónicamente excitado para regresar al estado electrónico fundamental. Sin embargo, en un proceso *no radiativo*, la población del estado inicialmente excitado se transfiere a otro estado sin que le acompañe ninguna emisión.

Los procesos radiativos más comunes son:

- **Absorción (A):** caracterizada por un coeficiente de absorción molar. Éstas pueden ser transiciones

permitidas (singlete-singlete, $S_0 + h\nu \longrightarrow S_n$), o

prohibidas (singlete-triplete, $S_0 + h\nu \longrightarrow T_n$) por la regla de espín.

- **Fluorescencia (F):** emisión permitida por la regla de espín, en la que se produce la desactivación de una especie excitada desde el primer estado excitado singlete al estado fundamental ($S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$) con la consiguiente emisión de un fotón de radiación. La fluorescencia puede ser inmediata o retardada:

- **Fluorescencia inmediata:** según el siguiente mecanismo:

1. absorción ($S_0 + h\nu \longrightarrow S_1$),

2. emisión ($S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu'$).

Esta emisión está caracterizada por una constante de velocidad k_F .

- **Fluorescencia retardada:** puede ser de tipo P, según el siguiente mecanismo:

1. absorción ($S_0 + h\nu \longrightarrow S_1$),

2. cruce intersistemas ($S_1 \longrightarrow T_1$),

3. aniquilación del estado triplete ($T_1 + T_1 \longrightarrow S_1 + S_0$),

4. emisión ($S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu'$)

o de tipo E, activada térmicamente a través de CIS

($T_1 \longrightarrow S_1$) en la etapa 3.

- **Fosforescencia (P):** emisión prohibida por la regla de espín, en la que generalmente se produce la desactivación de una especie excitada desde el primer estado excitado triplete al estado fundamental ($T_1 \longrightarrow S_0 + h\nu''$) con la consiguiente emisión de un fotón. Esta emisión está caracterizada por una constante de velocidad k_p .

Entre los procesos no radiativos más comunes se encuentran:

- **Conversión interna (CI):** transiciones permitidas entre estados de la misma multiplicidad en las que la molécula excitada pasa de un estado electrónico más alto a otro más bajo sin emisión de radiación (por ejemplo, $S_1 \longrightarrow S_0$). Se caracteriza por una constante de velocidad k_{CI} .

- **Cruce intersistemas (CIS):** transiciones prohibidas entre estados de distinta multiplicidad (por ejemplo, $S_1 \longrightarrow T_1$ o $T_1 \longrightarrow S_0$), caracterizadas por una constante de velocidad k_{CIS} .

- **Relajación vibracional (RV):** transmisión de un exceso de energía de un nivel vibracional excitado a un nivel vibracional de menor energía, dentro del mismo estado electrónico.

Estos procesos se muestran en el diagrama de Jablonsky de la Figura 1.2. La duración de éstos se muestra en la Tabla 1.1.

Proceso fotofísico	Tiempo (s)
Absorción	10^{-15}
Relajación vibracional	10^{-12} - 10^{-10}
Tiempo de vida del estado excitado S_1	10^{-10} - 10^{-7}
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9}
Cruce intersistemas	10^{-10} - 10^{-8}
Tiempo de vida del estado excitado T_1	10^{-6}

Tabla 1.1. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

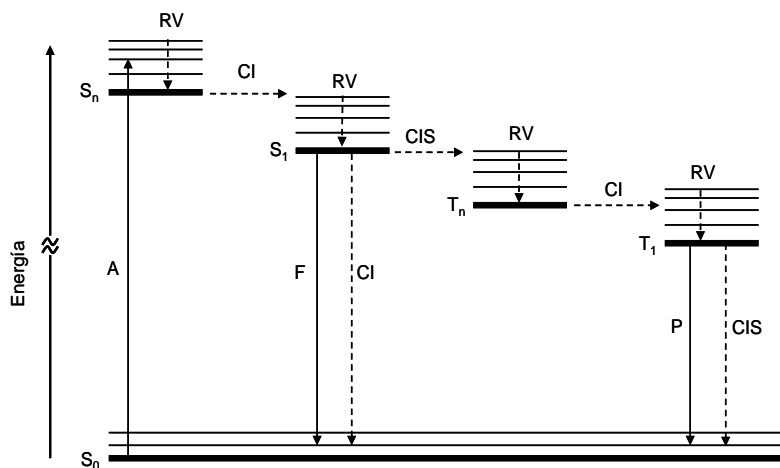


Figura 1.2. Diagrama de Jablonsky modificado, donde se encuentran representados los diferentes niveles de energía (S = singlete y T = triplete) y los procesos posteriores a la absorción de luz (**A**): **F** = fluorescencia; **P** = fosforescencia; **CI** = conversión interna; **CIS** = cruce intersistemas; **RV** = relajación vibracional. Las flechas continuas representan procesos fotofísicos radiantes y las discontinuas procesos no radiantes.

1.1.3. Procesos fotoinducidos

Cuando dos cromóforos se encuentran presentes en el mismo medio (unidos de forma covalente o no), pueden ocurrir entre ellos, tras excitación por luz, procesos como la transferencia de energía (TE), la transferencia electrónica (TEI), la formación de excíplejos (EX), la transferencia de protón o la formación de excímeros.

1.1.3.1. Transferencia de energía

En este proceso la energía de un cromóforo dador (D^*) en su estado excitado es transferida a otro cromóforo aceptor (A) en su estado fundamental, produciéndose así la desactivación del dador a su estado fundamental (D) y la excitación del aceptor (A^*).

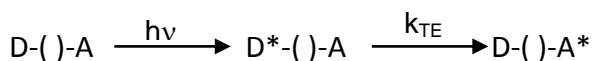


Figura 1.3. Proceso de transferencia de energía.

La transferencia de energía (TE) ocurre, generalmente, entre estados de la misma multiplicidad; así, podemos hablar de TE singlete-singlete y TE triplete-triplete.

Para que este proceso ocurra, la energía del estado excitado del dador debe ser superior a la del aceptor (Ecuación 1.1), con un tiempo de vida suficientemente largo para poder reaccionar.

$$\Delta G \approx \Delta H = E_D^* - E_A^* \quad (1.1)$$

donde ΔG es la variación de la energía libre del proceso, E_D^* es la energía del estado excitado del dador y E_A^* es la energía del estado excitado del aceptor. Existen tres mecanismos de transferencia de energía a pesar de que sólo dos de ellos son relevantes en la práctica.

El mecanismo trivial o radiante es poco frecuente ya que la probabilidad de que la energía emitida por un cromóforo excitado sea

reabsorbida por otro cromóforo en el estado fundamental es muy baja.

Aparte de este proceso poco usual, la transferencia de energía ocurre por dos mecanismos: coulombico o tipo Förster⁴ y de intercambio electrónico o tipo Dexter.⁵ El primero implica una interacción dipolo-dipolo y actúa a largas distancias (de hasta 100 Å). Sin embargo, el mecanismo tipo Dexter requiere una gran proximidad entre dador y aceptor (distancias menores de 10 Å), ya que debe producirse una interacción eficiente para el intercambio electrónico entre los orbitales LUMO y HOMO de dador y aceptor. En la Figura 1.4 se muestra esquemáticamente el mecanismo de estos procesos.

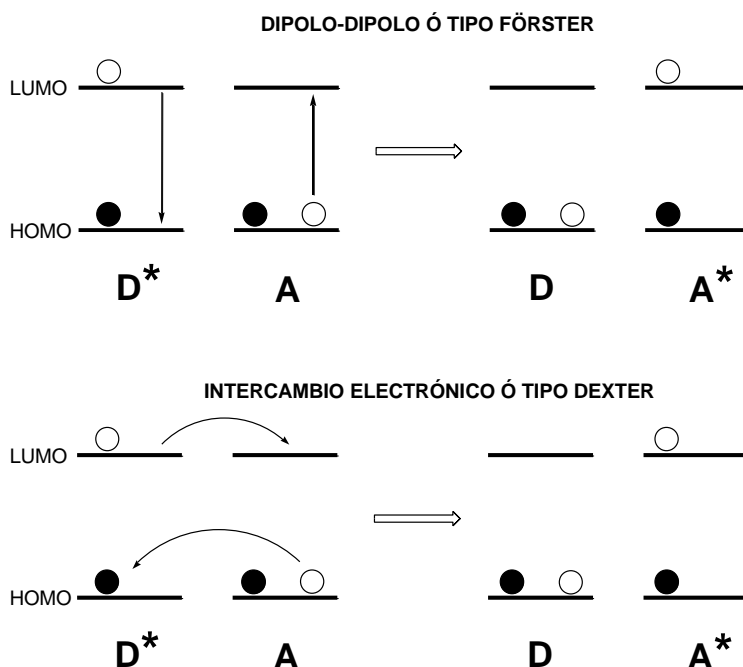


Figura 1.4. Mecanismos de transferencia de energía.

1.1.3.2. Transferencia electrónica y formación de exciplejos

En general, el proceso de transferencia electrónica (TEI), tiene lugar cuando una molécula en su estado excitado cede o acepta un electrón a o de otra molécula en su estado fundamental. En ciertos casos, se puede formar un complejo de transferencia de carga entre un cromóforo (D^*) en su estado excitado y otro cromóforo distinto (A) en su estado fundamental o viceversa, si el cromóforo excitado actúa como aceptor (A^*) y el cromóforo en el estado fundamental como dador (D). Este complejo, llamado exciplejo (EX), posee carácter de carga parcial en cada cromóforo y un elevado momento dipolar.

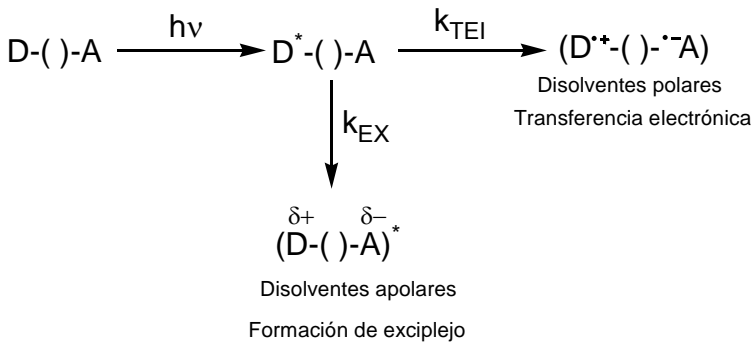
La termodinámica de estos procesos se puede determinar haciendo uso de la ecuación de Rehm-Weller^{8,9} (Ecuación 1.2).

$$\Delta G = E_{\text{OX}} - E_{\text{RED}} - E^* + C \quad (1.2)$$

donde ΔG es la variación de la energía libre del proceso, E_{OX} y E_{RED} son los potenciales de oxidación y reducción en el estado fundamental de dador y aceptor, E^* es la energía del estado excitado implicado, y C es el término coulombico que tiene en cuenta la estabilización de las especies generadas en el disolvente empleado. Los disolventes polares estabilizan el par de iones radicales generado por transferencia electrónica, mientras que en los disolventes apolares está favorecida la formación de exciplejo (Figura 1.5). Los exciplejos pueden detectarse haciendo uso de la técnica de fluorescencia; suelen darse entre

moléculas planas capaces de dar complejos de tipo sándwich y pueden vivir lo suficiente como para que se pueda detectar la emisión de luz.¹⁰⁻

12



o bien

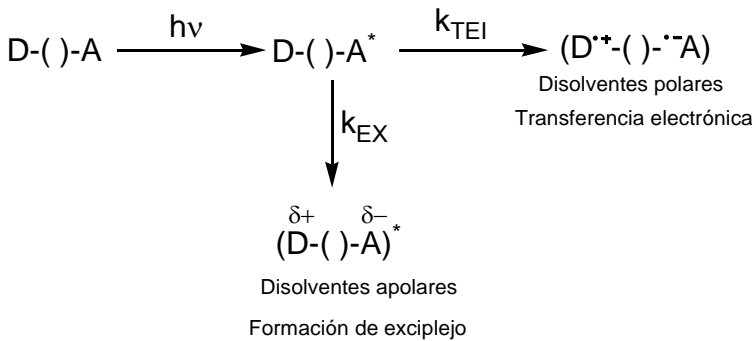
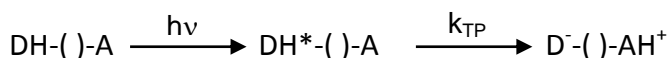


Figura 1.5. Mecanismo de transferencia electrónica.

1.1.3.3. Transferencia de protón

En la transferencia de protón, el dador (DH) transfiere un protón al aceptor (A). Este proceso puede ocurrir indistintamente por excitación de D o de A.



o bien

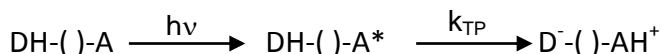


Figura 1.6. Proceso de transferencia de protón, bien por excitación del dador o del aceptor.

1.1.3.4. Formación de excímero

Un excímero es un complejo que se forma entre un cromóforo en su estado excitado y otro cromóforo idéntico en su estado fundamental. La formación de este complejo provoca la desactivación de la fluorescencia del monómero generando un dímero en el estado excitado capaz de emitir luz. Como ocurría en el caso de los exciplejos, también los excímeros (EXC) pueden ser detectados haciendo uso de la técnica de fluorescencia.^{13,14}

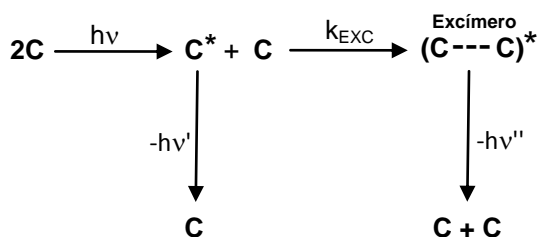


Figura 1.7. Proceso de formación de excímero para un cromóforo C.

Hay que destacar también que los procesos de transferencia electrónica, protónica y de energía definidos no ocurren aisladamente, sino que en muchas ocasiones se produce más de uno de ellos en una misma reacción fotoquímica; así, una transferencia protónica puede seguir a una transferencia electrónica, o una transferencia electrónica a una de energía, etc. Los posibles procesos que pueden ocurrir se resumen en la Figura 1.8.

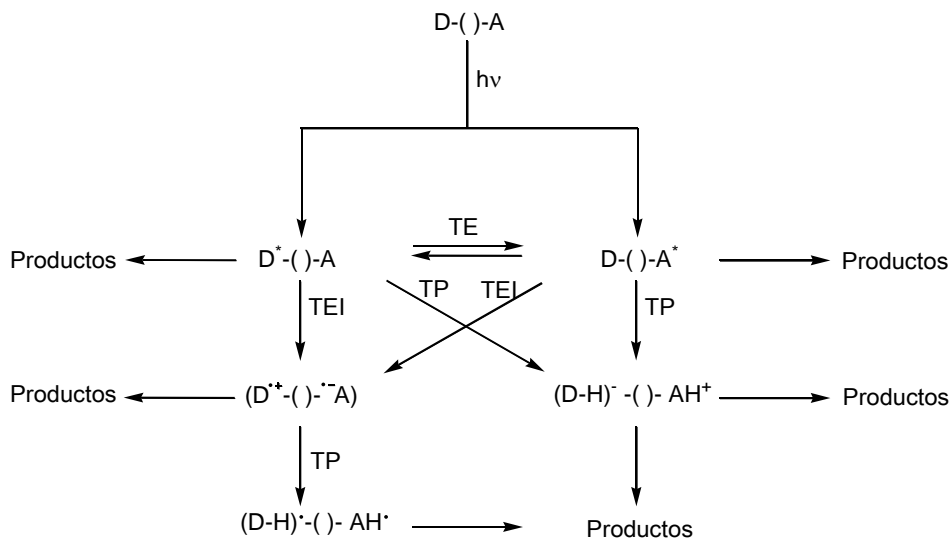


Figura 1.8. Procesos encadenados.

1.2. Propiedades fotofísicas de los cromóforos benzofenona, naftaleno, bifenilo, triptófano y timidina

A continuación se describen brevemente las principales características fotofísicas de los cromóforos mencionados aislados, para una mejor comprensión de su comportamiento cuando se encuentren incorporados en los sistemas bicromofóricos.

1.2.1. Benzofenona (BZP)

El espectro de absorción UV de BZP en ciclohexano (Figura 1.9, traza continua) presenta dos bandas, una con máximo a 250 nm ($\epsilon_{\text{máx}} \sim 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y otra con máximo a 350 nm ($\epsilon_{\text{máx}} \sim 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondientes a las transiciones $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$ respectivamente. En disolventes polares, como etanol, (Figura 1.9, traza discontinua) se produce un desplazamiento batocrómico de la banda $\pi\pi^*$ e hipsocrómico de la $n\pi^*$.^{7,15-17}

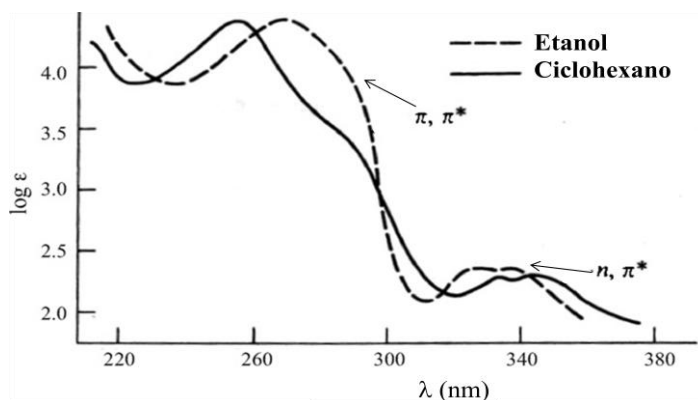


Figura 1.9. Espectro de absorción UV de benzofenona en etanol y ciclohexano.

La energía de singlete es de 74 kcal/mol y el rendimiento cuántico de fluorescencia inferior a 10^{-6} . Sin embargo, posee un rendimiento cuántico de cruce intersistemas muy eficiente, de aproximadamente la unidad, que permite su utilización como fotosensibilizador. Su energía de triplete es de 69 kcal/mol. En el espectro de absorción transitoria (Figura 1.10) puede observarse su triplete con máximos a *ca.* $\lambda = 320$ y 530 nm, con un tiempo de vida de $6.9 \mu\text{s}$ en ciclohexano y, si el disolvente es buen dador de hidrógeno, el radical cetilo a $\lambda = 550$ nm.^{7,15,17}

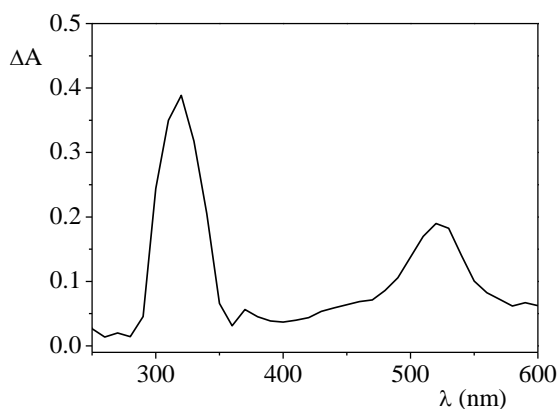


Figura 1.10. Espectro de absorción transitoria de benzofenona.

Su espectro de fosforescencia presenta la típica estructura vibracional en forma de dedos, correspondiente a una molécula con el estado triplete de más baja energía $n\pi^*$.^{7,15-17}

El triplete de la BZP se desactiva por oxígeno en acetonitrilo con una constante de $2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, y mediante transferencia de energía al naftaleno con $k_D = 4.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^{7,15,17}

1.2.2. Naftaleno (NPT)

El espectro de absorción UV de NPT presenta dos bandas, con máximos a 280 y 220 nm.^{7,15,16}

Su máximo de emisión de fluorescencia está centrado entre 330-350 nm, dependiendo del disolvente. El rendimiento cuántico de fluorescencia es 0.19 en ciclohexano y 0.21 en etanol. El tiempo de vida del singlete de NPT es 96 ns en ciclohexano y 105 ns en etanol, con una energía de singlete de 92 kcal/mol (Figura 1.11).^{7,15,16}

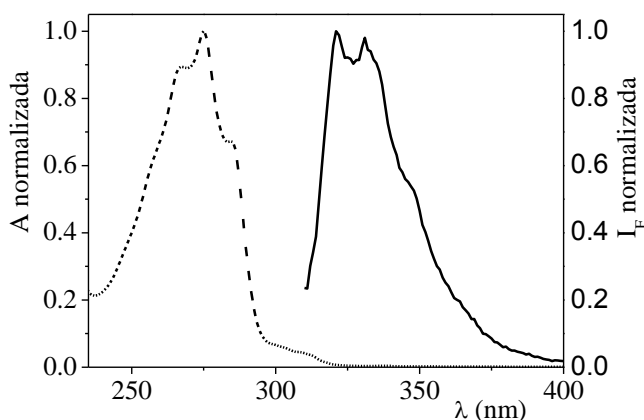


Figura 1.11. Espectro UV (línea discontinua) y de fluorescencia (línea continua) de naftaleno en acetonitrilo a temperatura ambiente.

En el espectro de absorción transitoria en ciclohexano se detecta el triplete de NPT con un máximo a 425 nm ($\epsilon \sim 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), tiempo de vida de 175 μs , y rendimiento cuántico de 0.75; La energía de triplete

es 60.6 kcal/mol (Figura 1.12). También se detecta el catión radical del NPT a 685 nm.^{7,15,16,18}

Tanto el singlete como el triplete de NPT se desactivan por oxígeno, con constantes de 2.7×10^{10} y de $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, en ciclohexano.^{7,15}

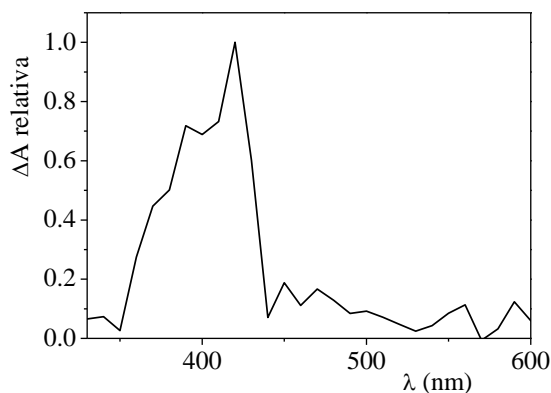


Figura 1.12. Espectro de absorción transitoria de naftaleno.

1.2.3. Bifenilo (BPN)

El espectro de absorción UV de bifenilo presenta una banda centrada a 248 nm (Figura 1.13).^{7,15,19,20}

Su máximo de emisión de fluorescencia está centrado a 310 nm en metanol con un $\epsilon = 16982$ (Figura 1.13).¹⁹ Posee un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.15 y un tiempo de vida de singlete de 16 ns en ciclohexano. Su energía de singlete es de 93 kcal/mol.^{7,15,20,21}

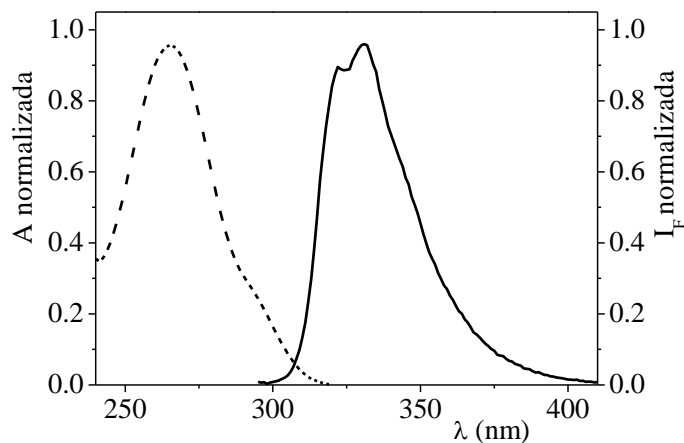


Figura 1.13. Espectro UV (línea discontinua) y de fluorescencia (línea continua) ($\lambda_{\text{exc}} = 250$ nm) de bifenilo.

En el espectro de absorción transitoria (Figura 1.14) se detecta el triplete de BPN con un máximo a 367 nm ($\epsilon \sim 27100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), con un

tiempo de vida de 130 μs y un rendimiento cuántico de 0.84 en ciclohexano; posee una energía de triplete de 65.4 kcal/mol.^{7,15}

Tanto el singlete como el triplete del bifenilo se desactivan por oxígeno, con constantes de $2.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en ciclohexano y de $1.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en benceno.^{7,15}

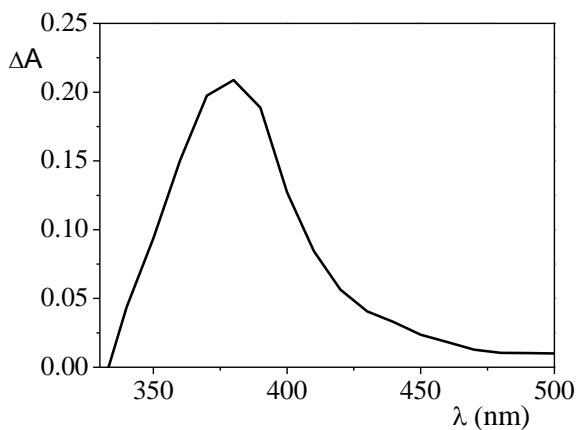


Figura 1.14. Espectro de absorción transitoria de bifenilo.

1.2.4. Triptófano (Trp)

El triptófano presenta una banda centrada a 280 nm en el espectro de absorción UV en agua, a pH = 7 (Figura 1.15).²²

Su máximo de emisión de fluorescencia está centrado a 350 nm en agua, a pH = 7 (Figura 1.15).²² Posee un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.13 y un tiempo de vida de singlete de 2.5 ns en etanol. Su energía de singlete es de 95 kcal/mol.^{15,22}

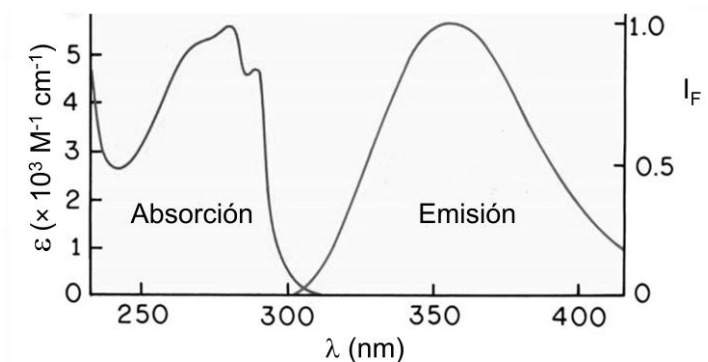


Figura 1.15. Espectro de absorción UV y de fluorescencia de triptófano en agua a pH = 7.

El espectro de fluorescencia de Trp depende fuertemente de la polaridad del disolvente, debido a la posible formación de enlaces de hidrógeno a través del grupo NH del indol (Figura 1.16).²²

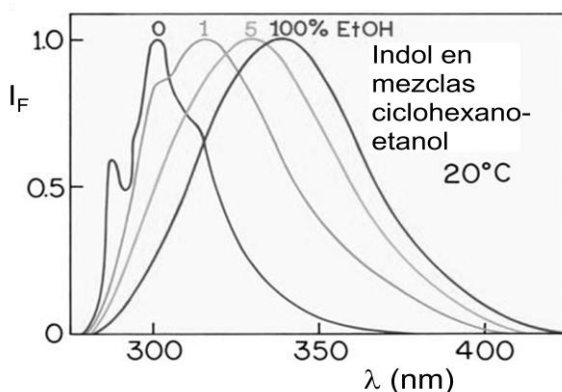


Figura 1.16. Espectro de fluorescencia de indol en ciclohexano, etanol y mezclas de ambos.

En el espectro de absorción transitoria se detecta el triplete del Trp con un máximo a 460 nm ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), con un tiempo de vida de 14.3 μs y un rendimiento cuántico de 0.18 en etanol.¹⁵ También se detectan el catión radical (Trp^+) a 580 nm ($\epsilon \sim 2900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), el radical (Trp^\cdot) a 510 nm ($\epsilon \sim 1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el electrón solvatado a 700 nm ($\epsilon \sim 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en agua, a pH = 7.4.^{23,24}

Tanto el singlete como el triplete del triptófano se desactivan por oxígeno, con constantes en agua de 5.9×10^9 y de $5.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente.¹⁵

1.2.5. Timidina (dThd)

La timidina presenta una banda centrada a 267 nm en el espectro de absorción UV, con un coeficiente de absorción molar de $9860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en agua (Figura 1.17).²⁵

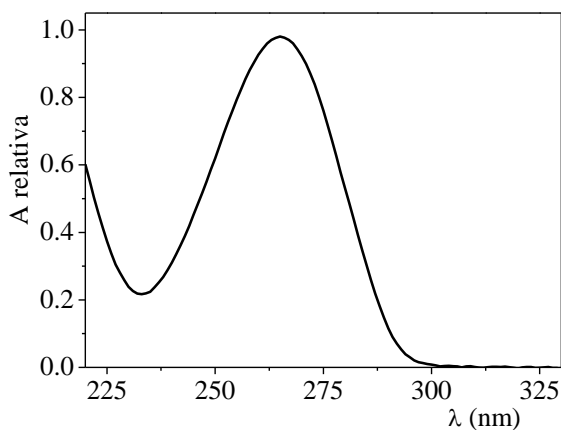


Figura 1.17. Espectro UV de timidina en agua

Su máximo de emisión de fluorescencia está centrado a 330 nm en agua (Figura 1.18).²⁵ Posee un rendimiento cuántico de fluorescencia de 1.32×10^{-4} y un tiempo de vida de singlete de 0.15 ps en agua.²⁵ Su energía de singlete es de 100 kcal/mol.¹⁵

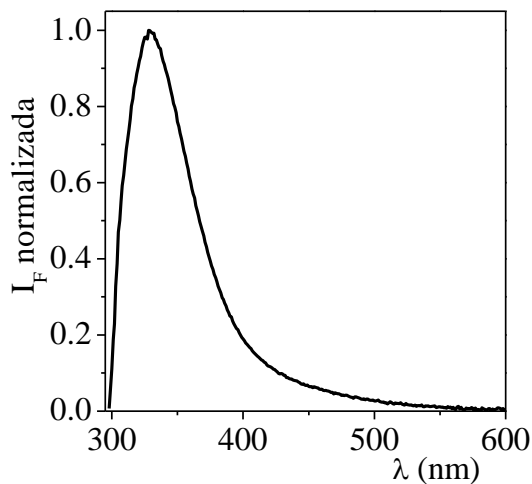


Figura 1.18. Espectro de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, 2×10^{-3} M, agua) de timidina.

En el espectro de absorción transitoria se detecta el triplete de la dThd con un máximo a 370 nm ($\epsilon \sim 2320$ M⁻¹ cm⁻¹), con un tiempo de vida de 25 μ s y un rendimiento cuántico de 0.069 en etanol.¹⁵

En la Tabla 1.1 se resumen los principales parámetros fotofísicos de los cromóforos descritos.

1.2.6. Tabla con las propiedades fotofísicas de los cromóforos

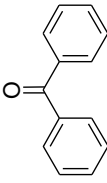
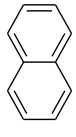
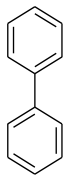
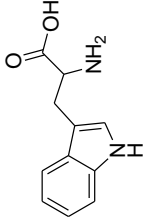
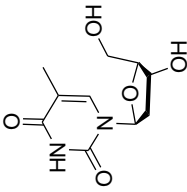
CROMÓFORO	ESTRUCTURA	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{S}}$ (nm)	E_{S} (kcal/mol)	ϕ_{F}	τ_{F} (ns)	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{T}}$ (nm)	E_{T} (kcal/mol)	ϕ_{cis}	τ_{T} (μs)
Benzofenona		---	74	$<10^{-6}$	<0.1	530	69	1	6.9
Naftaleno		340	92	0.19	96	425	61	0.75	175
Bifenilo		310 ^a	93	0.15	16	367	65	0.84	130
Triptófano		350 ^b	95 ^c	0.13 ^c	2.5 ^c	460 ^c	---	0.18 ^c	14.3 ^c
Timidina		330 ^b	100 ^b	1.32×10^{-4}	1.5×10^{-4b}	370 ^c	74 ^c	0.07 ^c	25 ^c

Tabla 1.1. Propiedades fotofísicas de los cromóforos en ciclohexano, ^a MeOH, ^b agua, ^c EtOH.

1.3. Antecedentes bibliográficos directos

En la bibliografía se encuentran trabajos sobre fotofísica y fotoquímica de diadas conteniendo alguno de estos cromóforos: diadas conteniendo el cromóforo naftaleno,²⁶⁻³² benzofenona,^{31,33-40} bifenilo,^{41,42} triptófano^{28,41} y timidina.^{26,27,35}

A continuación se describen en detalle algunas de ellas.

1.3.1. Diadas bifenilo-triptófano⁴¹

Mediante estas diadas se realizó un estudio sobre las interacciones que tienen lugar entre el fármaco flurbiprofeno (FBP) y el éster metílico del triptófano (TrpMe), aminoácido presente en el sitio I de unión de las albúminas séricas, como sistemas modelo en la interacción fármaco-proteína. Fármaco y aminoácido se encontraban unidos covalentemente mediante un enlace de tipo amida. Su estructura se muestra en la Figura 1.19.

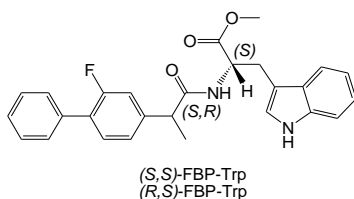


Figura 1.19. Estructura química de las diadas bifenilo-triptófano.

El espectro de absorción UV (Figura 1.20) de las diadas resultó ser idéntico al que correspondería de la suma de los espectros de (*S*)-FBP y (*S*)-TrpMe aislados a la misma concentración, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental. A la longitud de onda de 266 nm se observó que cerca del 60% de la luz era absorbida por el bifenilo mientras que el 40% restante era absorbido por el cromóforo indol.

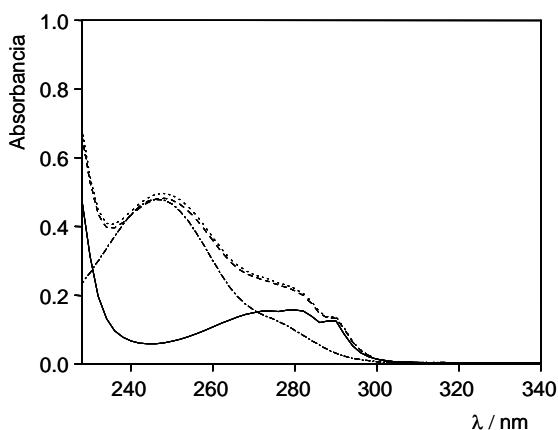


Figura 1.20. Espectro UV del (*S*)-FBP (- · - ·), (*S*)-TrpMe (———), (*S,S*)-FBP-Trp (- - -) y (*R,S*)-FBP-Trp (······) en acetonitrilo a concentración 2.5×10^{-5} M.

El fenómeno más importante observado en los espectros de fluorescencia (Figura 1.21.A) fue que en ambas diadas se produjo una desactivación casi total de la emisión, que consistió en una banda de baja intensidad atribuida al $^1\text{Trp}^*$, cuyo máximo se situaba a 340 nm. Así pues, no se observó emisión por parte del $^1\text{FBP}^*$ ($\lambda_{\text{máx}} = 310$ nm).

Además, al normalizar los espectros, se detectó la aparición de una nueva banda entre 380 y 500 nm, especialmente para la diada (*R,S*)-FBP-Trp, que correspondía a la formación de un exciplexo (Figura 1.21.B).

Los tiempos de vida de fluorescencia medidos a $\lambda_{em} = 340$ nm fueron mucho menores en las diadas (0.9 ns para ambas) que en el modelo (*S*)-TrpMe (6.4 ns), lo cual era indicativo de la existencia de una desactivación dinámica. Por el contrario, los tiempos de vida de fluorescencia registrados a $\lambda_{em} = 440$ nm (máximo de emisión del exciplexo) fueron mayores (7.6 y 5.1 ns para (*S,S*)-FBP-Trp y (*R,S*)-FBP-Trp, respectivamente).

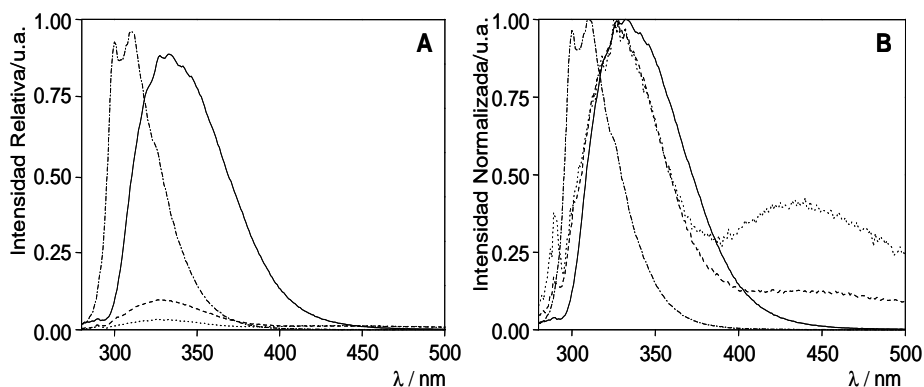


Figura 1.21. A: Espectros de fluorescencia y B: espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{exc} = 266$ nm, de (*S*)-FBP (— · — · —), (*S*)-TrpMe (—), (*S,S*)-FBP-Trp (— — —) y (*R,S*)-FBP-Trp (· · · · ·).

Cuando se realizaron los ensayos de FDL a la longitud de onda de excitación de 266 nm para las diadas (*S,S*)-FBP-Trp y (*R,S*)-FBP-Trp, se observó la típica banda de absorción triplete-triplete del FBP (máximo de absorción a 360 nm). El tiempo de vida de triplete en ambas diadas fue el mismo que para el FBP aislado (*ca.* 24 μ s), lo que indicaba la ausencia de una interacción intramolecular en el estado excitado triplete. En la Figura 1.22 se muestra el espectro de la especie transitoria y la cinética de desactivación de la señal a 360 nm.

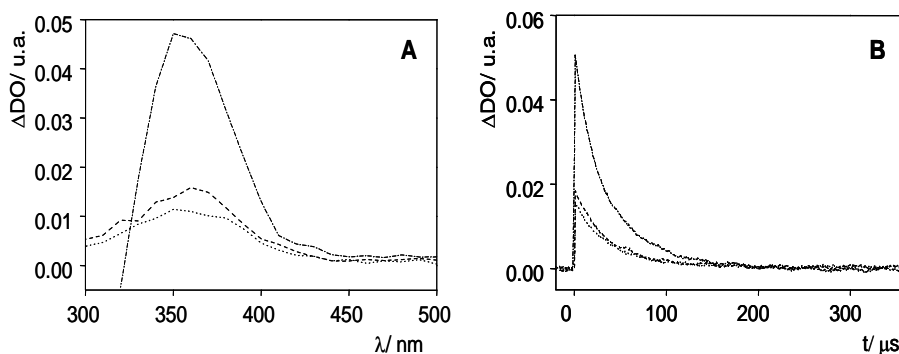


Figura 1.22. **A:** Espectros de FDL obtenidos 6 μ s después del pulso del láser de (*S*)-FBP (—), (*S,S*)-FBP-Trp (---) y (*R,S*)-FBP-Trp (.....) registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm. **B:** Desapariciones monitorizadas a 360 nm.

1.3.2. Diadas naftaleno-timidina^{26,27}

Mediante estas diadas se estudió la discriminación quiral de fármacos que fotosensibilizan el daño al ADN. El naproxeno (NPX) se encontraba unido covalentemente a la posición 5' del azúcar de la timidina (dThd). Su estructura se muestra en la Figura 1.23.

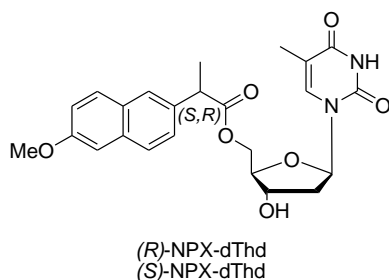


Figura 1.23. Estructura química de las diadas NPT-dThd.

El espectro de absorción UV de las diadas resultó ser idéntico al que correspondería de la suma de los espectros del naproxeno y de la timidina aislados a la misma concentración, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

El estudio de fluorescencia de las diadas fue llevado a cabo utilizando como disolventes acetonitrilo y metanol (Figura 1.24). En ambos casos, el espectro de emisión presentó una banda con un máximo alrededor de 350 nm, asignada al naproxeno. También se observó que tanto la intensidad de emisión como el tiempo de vida de

fluorescencia de las dos diadas en metanol estaban fuertemente desactivados, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el disolvente y la diada.

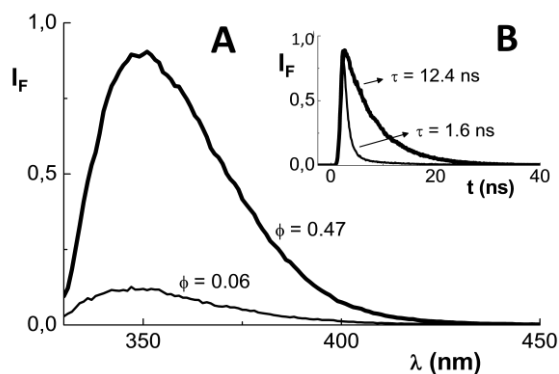


Figura 1.24. A: Espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 320$ nm) y B: desaparición de la señal a $\lambda = 350$ nm de la diada (*R*)-NPX-dThd (1×10^{-4} M) en acetonitrilo (—), y en metanol (---), bajo atmósfera inerte.

Cuando los estudios de fluorescencia fueron llevados a cabo en presencia de diferentes disolventes capaces de formar puentes de hidrógeno, se encontró una significativa estereoselectividad entre ambas diadas; siendo más rápida la desactivación para el caso de la diada (*R*)-NPX-dThd. En la Tabla 1.2 se presentan los valores obtenidos de las constantes de desactivación para cada diada y disolvente.

	$k_D \times 10^{-7}, M^{-1} s^{-1}$				
	HFIP ^a	H ₂ O	MeOH	EtOH	iPrOH
(R)-NPX-dThd	31.0	8.2	5.3	2.6	<1.0
(S)-NPX-dThd	22.0	7.3	3.4	2.0	<1.0

Tabla 1.2. Constantes de desactivación de fluorescencia de (R)-NPX-dThd y (S)-NPX-dThd en presencia de moléculas capaces de formar puentes de hidrógeno. Temperatura ambiente, atmósfera inerte, $\lambda_{exc} = 320$ nm. ^a Hexafluoro isopropanol.

Si bien los espectros de absorción resultaron ser idénticos, cuando se compararon los espectros de excitación de ambos compuestos, (Figura 1.25.A) no se observó ninguna diferencia en acetonitrilo mientras que en metanol sí (Figura 1.25.B), debido a que el proceso de transferencia de energía singlete-singlete desde la timina al naftaleno era estereoselectivo.

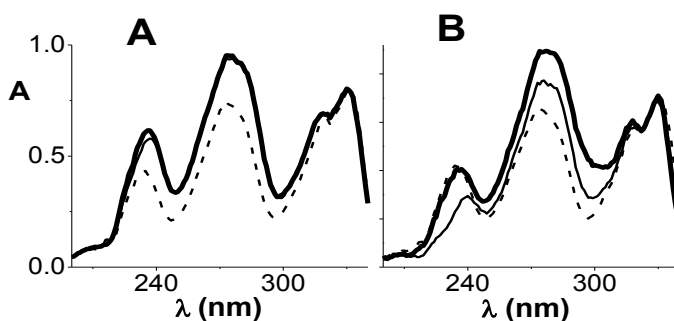


Figura 1.25. Espectros de excitación de NPX (---), (R)-NPX-dThd (—) y (S)-NPX-dThd (—) en atmósfera inerte y $\lambda_{em} = 350$ nm en **A**: acetonitrilo y **B**: metanol.

Cuando se realizaron los ensayos de FDL de ambos diastereómeros en presencia de acetonitrilo y metanol se observó la banda a 430 nm correspondiente al triplete del naftaleno. Los tiempos de vida de triplete fueron de 7 μ s para ambas diadas en MeCN y de 8 y 12 μ s para (*R*)-NPX-dThd y (*S*)-NPX-dThd, respectivamente, en MeOH.

1.3.3. Diadas benzofenona-naftaleno³³

Mediante estas diadas se investigó la estereoselectividad en la desactivación intramolecular inducida del triplete de naftaleno por la benzofenona. Se utilizaron como sistema modelo diadas donde ketoprofeno (KTP) estaba unido covalentemente a naproxeno (NPX) mediante un enlace tipo éster. Su estructura se muestra en la Figura 1.26.

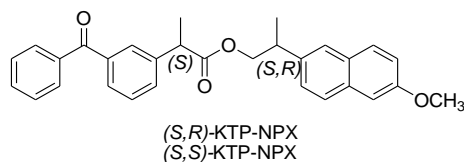


Figura 1.26. Estructura química de las diadas KTP-NPX.

El espectro de absorción UV de las diadas (Figura 1.27) resultó ser idéntico al que correspondería de la suma de los espectros del naproxol (naproxeno reducido a alcohol) y de la benzofenona aislados a

la misma concentración, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

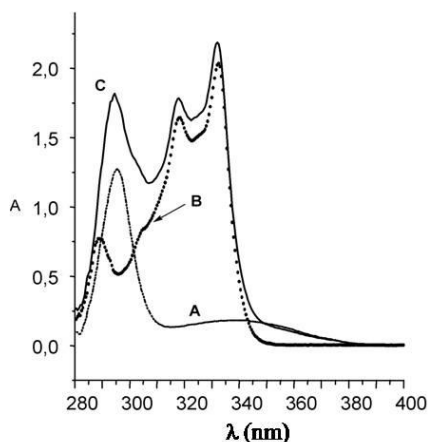


Figura 1.27. Espectro de absorción UV de KTP (A), naproxol (B) y (*S,S*)-KTP-NPX (C).

Los espectros de fluorescencia de las diadas a ($\lambda_{\text{exc}} = 318$ nm (Figura 1.28) resultaron iguales al del naproxeno. Se observó una desactivación casi total de la fluorescencia del NPX en las diadas debido a la transferencia de energía singlete-singlete al KTP.

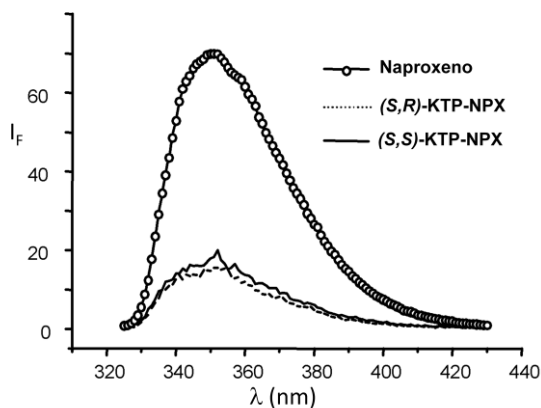


Figura 1.28. Espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 318$ nm, N_2 , MeCN). Las intensidades de las diadas están multiplicadas por diez.

Cuando se realizaron los ensayos de FDL a la longitud de onda de excitación de 355 nm para las diadas (S,S)-KTP-NPX y (S,R)-KTP-NPX, se observó la típica banda de absorción triplete-triplete de NPX (máximo de absorción a 430 nm) debido a la transferencia de energía triplete-triplete desde $^3KTP^*$ a NPX. Las curvas de desaparición monitorizadas a 430 nm (Figura 1.29) mostraron que los tripletes del (S)- y (R)- NPX se desactivaban de forma diferente por el (S)-KTP, con constantes de 5.3×10^5 y 8.5×10^5 s⁻¹ para (S,S)-KTP-NPX y (S,R)-KTP-NPX, respectivamente.

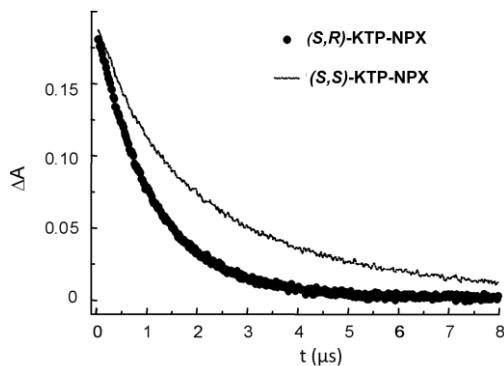


Figura 1.29. Cinéticas de desaparición de las diadas KTP-NPX a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{obs}} = 430 \text{ nm}$, MeCN).

Esta estereoselectividad resultó ser una evidencia de la implicación de excíplejos $^3(\text{KTP-NPX})^*$ en la desactivación de NPX así como de la necesidad de requisitos estructurales en la formación de intermedios tipo sándwich implicados en los procesos de desactivación inducida.

En el capítulo final de la tesis, se abordará el estudio de las interacciones entre cromóforos de tipo bifenilo encapsulados en el interior de ASH. Por ello, se presenta una breve descripción de las principales características de esta proteína.

1.4. Albúmina sérica humana (ASH)

La albúmina sérica humana (ASH), junto con la hemoglobina, es probablemente una de las primeras proteínas del cuerpo humano que llamó la atención de los investigadores. Son muchas sus aplicaciones, tanto en medicina clínica como en investigación básica.

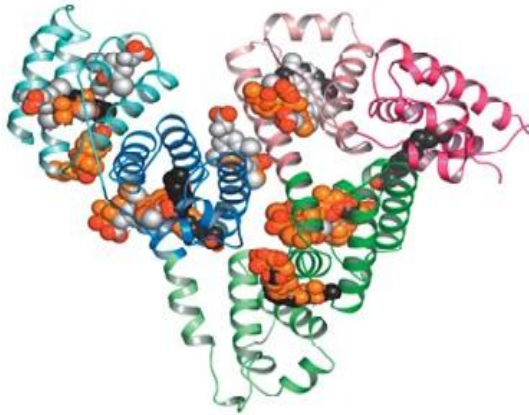


Figura 1.30. Estructura de la albúmina sérica humana.

1.4.1. Función de ASH

La ASH se sintetiza en el hígado. Puede encontrarse en cualquier fluido corporal, como por ejemplo en el fluido vítreo y acuoso ocular, en el sudor, en las lágrimas, saliva y sangre donde es la proteína

transportadora más abundante. Además, está presente en prácticamente todos los tejidos, pero sobre todo en la piel y los músculos.

Su principal función es actuar como vehículo de transporte y distribución de sustancias endógenas y exógenas en la sangre. Ejemplo de ello es el transporte de fármacos (influyendo, así, en la farmacocinética y distribución de estos), de ácidos grasos aniónicos de cadena larga, ácidos biliares, hormonas, vitaminas, etc.⁴⁴

La interacción de sustratos con ASH puede originar un incremento en la solubilidad de éstos en la sangre (como es el caso de los ácidos grasos), así como una disminución de su toxicidad o una protección frente a la oxidación (como es el caso del daño peroxidativo al ácido linoléico).⁴⁵

1.4.2. Estructura general de ASH

La ASH es una proteína globular que constituye alrededor del 60% del total de proteína en la sangre. Posee una masa molecular promedio de 66500 Da y consta de 585 aminoácidos, entre los cuales se forman un total de 17 puentes disulfuro; existe un tiol libre (Cys-34) y un único triptófano (Trp-214).⁴⁶ Según análisis cristalográfico de rayos-X de ASH, la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, con cerca del 67% de hélice- α , un 10% de giro β y un 23% de cadena extendida.^{43,47,48} Estudios

recientes proponen que la conformación global de ASH en disolución neutra es muy similar a la observada en la forma cristalina.⁴⁹

1.4.3. Interacción de ASH con fármacos

El estudio de la interacción fármaco/ASH es importante para conocer la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de éstos en el organismo.

Los AINES presentan un alto grado de unión con la albúmina, generalmente del 99%.⁴⁵ La naturaleza de estas interacciones es de tipo electrostático, por puente de hidrógeno, puente salino o de tipo van der Waals; el proceso, que generalmente es reversible, tiene unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M⁻¹. En otras ocasiones, las interacciones entre ASH y fármacos son irreversibles.⁴⁵ También puede darse que la ASH se una con fármacos covalentemente.⁵⁰

Aunque la ASH posee varios dominios de unión con sustratos, se sigue aceptando por consenso la existencia de dos sitios específicos de unión o centros activos para moléculas orgánicas pequeñas. Estos sitios de unión específicos fueron designados por Sudlow como **sitio I** (o sitio de unión de la warfarina) y **sitio II** (o sitio de unión del diazepam).⁵¹

En el **sitio I** las interacciones que predominan son de tipo hidrofóbicas.⁵² Es conocido que los ésteres de los ácidos 2-arilpropiónicos interaccionan preferentemente en este sitio de unión.⁵³ Algunas evidencias sugieren que el sitio I es flexible y de gran tamaño.

Esto puede ocasionar que sea más difícil observar estereoselectividad en la interacción con los sustratos. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son el Trp-214 y la Arg-218.

El *sitio II* es de menor tamaño y menos flexible que el sitio I.⁴⁶ Por esta razón, se cree que las interacciones estereoselectivas se pueden observar en mayor grado en este sitio de unión. Las interacciones que predominan son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas.⁵² Los sustratos que suelen unirse al sitio II son ácidos carboxílicos aromáticos, como los AINES de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Los aminoácidos Arg-410 y Tyr-411 desempeñan un papel importante en la interacción con los ligandos.⁴⁶

La fluorescencia de ASH está dominada por la del Trp, por lo que el análisis de la fluorescencia en sistemas ligando/proteína puede proporcionar información sobre la unión del ligando.

1.5. Referencias bibliográficas

1. G. P. Bartholomew, G. C. Bazan, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 30.
2. S. Speiser, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1953.
3. S. Levy, M. B. Rubin, S. Speiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10747.
4. T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7.
5. D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836.
6. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 783.
7. N. J. Turro, J. C. Scaiano, V. Ramamurthy, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books, Sausalito, **2009**.
8. D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, 8, 259.
9. A. Z. Weller, *Phys. Chem. Neue Folge.* **1982**, 133, 93.
10. G. Rosenblum, I. Zaltsman, A. Stanger, S. Speiser, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, 143, 245.
11. P. R. Bangal, S. Chakravorti, *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, 55, 2447.
12. N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.* **2005**, 6, 37.
13. J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley. New York, **1970**.
14. J. B. Birks, L. G. Christophorou, *Nature* **1962**, 194, 442.

15. S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, **1993**.
16. F. Bayrakçeken, *Spectrochim. Acta Part A* **2008**, 71, 603.
17. F. Boscá, M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol. Sci.* **1998**, 43, 1.
18. X. Cai, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 9319.
19. S. K. Nayaki, M. Swaminathan, *Spectrochim. Acta Part A* **2002**, 58, 2931.
20. H. Chena, J. E. Kenny, *Analyst* **2010**, 135, 1704.
21. N. Nijegorodova, V. Vasilenkob, P. Monowea, M. Masalea, *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, 74, 188.
22. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA, **2006**.
23. H. Kandori, R. F. Borkman, K. Yoshihara, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 9664.
24. F. D. Bryant, R. Santus, L. I. Grosswelner, *J. Phys. Chem.* **1975**, 79, 2711.
25. D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, T. Gustavsson, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 11367.
26. S. Encinas, M. J. Climent, N. Belmadoui, M. A. Miranda, *Chem. Commun.* **2005**, 2572.
27. S. Encinas, M. J. Climent, S. Gil, U. O. Abrahamsson, J. Davidsson, M. A. Miranda, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 1704.

28. I. Vayá, R. Pérez-Ruiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, 486, 147.
29. M. C. Jiménez, U. Pischel, M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2007**, 8, 128.
30. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 2167.
31. R. Pérez-Ruiz, M. Groeneveld, I. H. M. van Stokkum, R. Tormos, R. M. Williams, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 429, 276.
32. S. Abad, I. Vayá, M. C. Jiménez, U. Pischel, M. A. Miranda, *ChemPhysChem* **2006**, 7, 2175.
33. M. C. Jiménez, S. E. Stiriba, R. Tormos, J. Pérez-Prieto, M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 36.
34. C. Paris, S. Encinas, N. Belmadoui, M. J. Climent, M. A. Miranda, *Org. Lett.* **2008**, 10, 4409.
35. N. Belmadoui, S. Encinas, M. J. Climent, S. Gil, M. A. Miranda, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 553.
36. S. Abad, F. Boscá, L. R. Domingo, S. Gil, U. Pischel, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7407.
37. I. Andreu, I. Morera, F. Boscá, L. Sanchez, P. Camps, M. A. Miranda, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 860.
38. I. Andreu, F. Boscá, L. Sanchez, I. Morera, P. Camps, M. A. Miranda, *Org. Lett.* **2006**, 8, 4597.
39. F. Boscá, I. Andreu, I. Morera, A. Samadi, M. A. Miranda, *Chem. Commun.* **2003**, 1592.

40. M. A. Miranda, L. A. Martínez, A. Samadi, F. Boscá, I. M. Morera, *Chem. Commun.* **2002**, 280.
41. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 9363.
42. I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, 207, 52.
43. S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Eng.* **1999**, 12, 439.
44. M. Dockal, D. C. Carter, F. Ruker, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29303.
45. U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695.
46. K. M. He, D. C. Carter, *Nature.* **1992**, 358, 29.
47. D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153.
48. S. Curry et al, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 827.
49. M. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carrasco, J. Garcia de la Torre, A. U. Acuña, *Biophys. J.* **2001**, 80, 2422.
50. D. A. Keire, S. V. Mariappan, J. Peng, D. L. Rabenstein, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 1059.
51. G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.* **1976**, 12, 1052.
52. F. Lopicque, N. Muller, E. Payan, N. Dubois, *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, 25, 115.
53. M. H. Rahman, K. Yamasaki, Y. H. Shin, C. C. Lin, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, 16, 1169.

54. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 1038.
55. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, 1, 1015.
56. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11284.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de la tesis es la utilización de los estados excitados de cromóforos de tipo bifenilo, naftaleno o benzofenona incorporados en compuestos bicromofóricos como sistemas modelo para intentar extrapolar su comportamiento al de los sistemas reales.

2.2 Objetivos concretos

De modo concreto, los objetivos particulares de la presente tesis son los siguientes:

- A) Generar un mapa fotofísico completo de los procesos que tienen lugar en sistemas benzofenona/naftaleno, con especial interés en la participación de la fluorescencia retardada de tipo P, así como en una posible estereodiferenciación.
- B) Investigar el comportamiento del estado excitado triplete de pseudopéptidos conteniendo el cromóforo NPT en presencia de benzofenona o bifenilo.
- C) Profundizar en las interacciones que tienen lugar en los estados excitados entre fármacos y ADN mediante la utilización de diadas modelo conteniendo flurbiprofeno y timidina covalentemente unidos.

- D) Racionalizar los principales procesos fotofísicos en sistemas conteniendo covalentemente un derivado de bifenilo y un aminoácido fotoactivo del sitio de unión de la proteína, como posibles modelos de la interacción supramolecular.

- E) Utilizar los estados excitados de derivados de bifenilo para el estudio del comportamiento de ligandos encapsulados en albúmina sérica humana. Para ello se utilizarán distintos derivados de bifenilo, con energía de singlete superior e inferior a la del Trp.

Capítulo 3

Sistemas
intermoleculares
benzofenona/naftaleno

3.1. Introducción

Benzofenona (BZP) y naftaleno (NPT) son ejemplos ampliamente estudiados de cromóforos fotoactivos, que pueden experimentar gran número de procesos fotofísicos y fotoquímicos.^{1,2} Las especies transitorias generadas tras excitación de BZP y NPT se detectan por espectroscopía de emisión o absorción, y sus principales características se encuentran descritas en la literatura.³⁻²¹

Así, BZP posee una banda de absorción a $\lambda > 320$ nm que permite su excitación selectiva en presencia de un gran número de sustratos orgánicos, y por tanto, puede ser utilizada como fotosensibilizador. Posee un rendimiento cuántico de cruce intersistemas (ϕ_{CIS}) de aproximadamente la unidad, lo que le permite transferir energía (TETT) a sustratos con energía de triplete (E_T) más baja. Por otro lado, tanto el estado excitado triplete de energía más baja ($n\pi^*$, $E_T = 69$ kcal/mol, $\lambda = 520-530$ nm) como el radical cetilo ($\lambda = 550$ nm) se pueden detectar en el espectro de absorción transitoria mediante fotólisis de destello láser (FDL) en acetonitrilo.²²

Por otro lado, NPT tiene una $E_S = 92$ kcal/mol y un $\phi_F = 0.19-0.21$, detectándose la emisión de su primer estado excitado singlete ($^1NPT^*$) a $\lambda = 350$ nm. Posee un ϕ_{CIS} de aproximadamente 0.75, y su primer estado excitado triplete se detecta en el espectro de absorción transitoria con máximo a 410-430 nm.^{22,23} Bajo condiciones experimentales específicas se puede detectar el catión radical (NPT^+) a 685 nm.²⁴ Por irradiación directa del NPT, mediante aniquilación triplete-triplete de dos moléculas

de $^3\text{NPT}^*$ se puede generar una molécula de $^1\text{NPT}^*$, cuyo tiempo de vida corresponde a la mitad de su triplete precursor.²⁵ Este proceso se conoce “P-delayed fluorescence” o fluorescencia retardada de tipo P.

En la bibliografía se encuentran trabajos en los que se describen los procesos fotofísicos en sistemas conteniendo BZP y NPT. Tras excitación selectiva de BZP en presencia de NPT, se forma $^3\text{NPT}^*$ mediante transferencia de energía desde $^3\text{BZP}^*$ a NPT. La desactivación de $^3\text{NPT}^*$ ocurre, entre otras formas, mediante la formación de excíplejos del tipo $^3(\text{BZP/NPT})^*$.²⁶ También, se han estudiado sistemas conteniendo ambos cromóforos covalentemente unidos, observándose en ellos que los procesos fotofísicos son similares a los descritos anteriormente para los sistemas intermoleculares, pero con cinéticas más rápidas.^{27,28}

El objetivo de este capítulo es realizar una caracterización fotofísica completa de sistemas BZP/NPT, con especial atención a la detección de la emisión correspondiente a la fluorescencia retardada de tipo P del NPT en el espectro de absorción transitoria generado tras excitación selectiva de BZP, así como la posible estereodiferenciación en los fotoprocesos ocurridos, como paso previo al estudio de sistemas más complejos conteniendo el cromóforo naftaleno incorporado en una estructura pseudo-peptídica.

Para ello, se han utilizado BZP y (*S*)- o (*R*)- KTP como sensibilizadores y NPT y (*S*)- o (*R*)- (1-naftil)etilamina (NEA) como aceptores de energía de triplete.

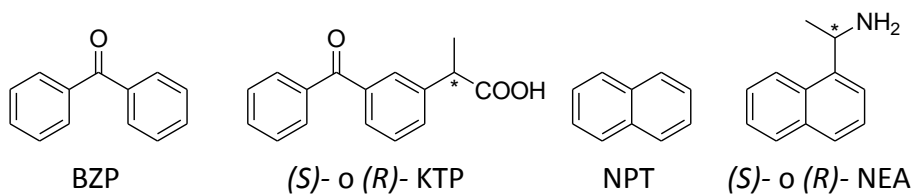


Figura 3.1. Estructura química de los compuestos estudiados, derivados de BZP y NPT.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Sistemas benzofenona/naftaleno

El espectro de absorción UV de BZP en acetonitrilo (2.6×10^{-3} M) no presentó ningún cambio significativo entre la región $\lambda > 320$ nm al añadir cantidades crecientes de NPT.

Al irradiar BZP a 355 nm mediante FDL en MeCN/N₂ se obtuvo la señal típica del triplete de BZP, con un máximo de absorción a 530 nm ($\tau_T = 1.7 \mu\text{s}$). En presencia de NPT, se observó una rápida desactivación de esta señal y la aparición de otra a 420 nm, correspondiente al triplete de NPT indicando una transferencia de energía triplete-triplete de ³BZP* a NPT. En la Figura 3.2.A se aprecia claramente la formación y desaparición de ³NPT*. Como era de esperar, el proceso fue más eficiente en presencia de cantidades crecientes de NPT (Figura 3.2.B). La constante obtenida para la desactivación por transferencia de energía fue de $k_D = 9.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Un aspecto a destacar es la banda negativa centrada a 340 nm que correspondería a la emisión de una especie transitoria cuya formación y desaparición están en la escala de los microsegundos.

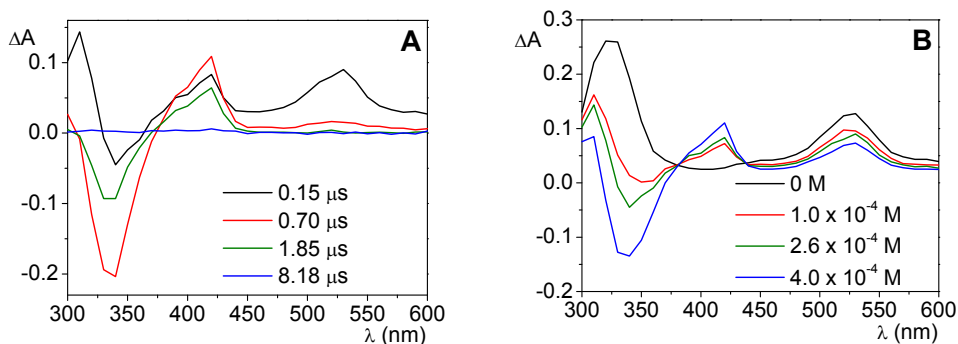
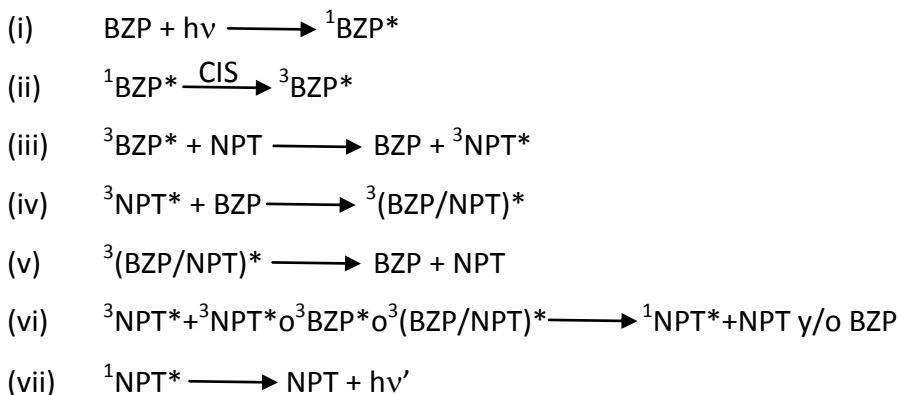


Figura 3.2. Espectro de absorción transitoria de BZP (2.6×10^{-3} M) en acetonitrilo y atmósfera de N_2 a $\lambda_{exc} = 355$ nm. **A:** En presencia de NPT (2.6×10^{-4} M) a diferentes ventanas de tiempo. **B:** En presencia de cantidades crecientes de NPT, 0.15 μ s después del pulso del láser.

Para poder asignar la naturaleza de esta banda negativa a 340 nm, consideramos los procesos fotofísicos que podían tener lugar tras excitar selectivamente BZP en presencia de NPT (Esquema 3.1)



Esquema 3.1. Principales procesos fotofísicos tras la excitación selectiva de BZP en presencia de NPT.

Como se observa en el esquema, tras irradiación a 355 nm se alcanza el primer estado excitado singlete de BZP (i), seguido de un cruce intersistemas muy eficiente (ii) para alcanzar $^3\text{BZP}^*$ ($\lambda_{\text{máx}} = 530$ nm). Mediante transferencia de energía triplete-triplete desde $^3\text{BZP}^*$ a NPT se obtiene el triplete de NPT (iii), detectado a 420 nm. La desactivación de $^3\text{NPT}^*$ puede tener lugar a través de un exciplexo con BZP (iv + v); también puede ocurrir que la colisión de dos tripletes dé lugar a $^1\text{NPT}^*$ (vi). Por lo tanto, según el esquema, $^1\text{NPT}^*$ puede ser generado a partir de un precursor triplete y su desactivación radiativa al estado fundamental ocurre como fluorescencia retardada tipo P (vii).

Para comprobar la asignación de la banda negativa centrada a 340 nm a la emisión de fluorescencia retardada generada por aniquilación triplete-triplete, se realizaron dos experimentos. Por un lado, se estudió la dependencia de la intensidad de emisión con la potencia del láser (Figura 3.3), donde, como era de esperar, se observó una disminución de la misma al aumentar la potencia del equipo.

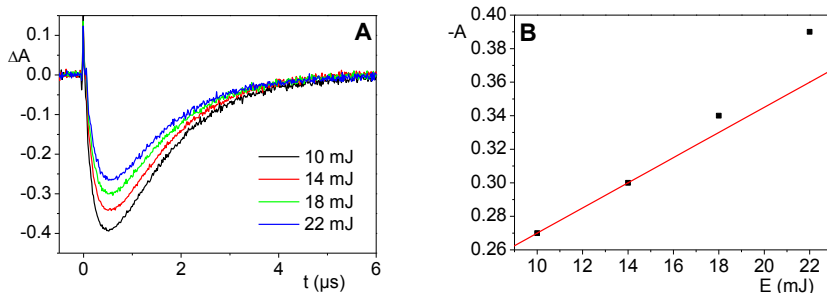


Figura 3.3. Variaciones de la banda negativa centrada a 340 nm en función de la energía del pulso del láser. FDL de la BZP 2.6×10^{-3} M ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, N_2 , MeCN) en presencia de NPT 2.6×10^{-4} M. **A:** Curvas de desaparición. **B:** Máximo de las intensidades vs. energía del láser.

Por otro lado, excitando directamente al cromóforo NPT a 266 nm, se observó de nuevo la banda centrada a 340 nm y al monitorizar las curvas de desaparición a esta longitud de onda, se observó claramente la presencia de dos componentes, correspondientes a la fluorescencia inmediata y retardada. También se pudo apreciar como la contribución de la fluorescencia retardada aumentaba con la potencia del láser (Figura 3.4.)

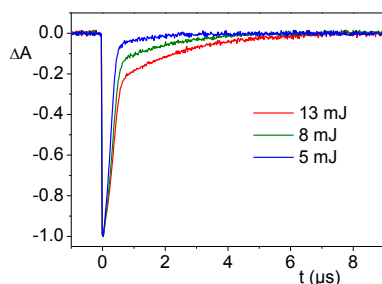


Figura 3.4. Curvas de desaparición normalizadas a $\lambda = 340$ nm después de fotólisis de destello láser del NPT (4.4×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, N_2 , MeCN) a diferentes energías del láser, mostrando la contribución relativa de la fluorescencia inmediata y retardada del NPT.

En la Tabla 3.1 se recogen los tiempos de vida obtenidos para cada una de las especies transitorias detectadas en los fotoprocesos ocurridos en el sistema BZP/NPT. Se indican los tiempos de vida del triplete de la benzofenona ($^3\text{BZP}^*$, $\lambda_{\text{máx}} = 530$ nm), del triplete del naftaleno ($^3\text{NPT}^*$, $\lambda_{\text{máx}} = 420$ nm) y de su singlete ($^1\text{NPT}^*$, $\lambda_{\text{máx}} = 340$ nm).

[NPT]	$\tau (^3\text{BZP}^*) / \mu\text{s}$	$\tau (^3\text{NPT}^*) / \mu\text{s}$	$\tau (^1\text{NPT}^*) / \mu\text{s}$
0	1.7	---	---
1.0×10^{-4} M	0.4	2.4	1.4
2.6×10^{-4} M	0.3	2.2	1.2
4.0×10^{-4} M	0.2	1.8	0.9

Tabla 3.1. Tiempos de vida de las especies transitorias detectadas en los fotoprocesos tras FDL de la BZP ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, MeCN, N_2 , 2.6×10^{-3} M) en presencia de NPT a diferentes concentraciones.

3.2.2. Sistemas ketoprofeno/(1-naftil)etilamina

Con la finalidad de investigar la posible estereodiferenciación en los fotoprocesos observados anteriormente, se estudiaron sistemas utilizando como sensibilizador (*R*)-ketoprofeno (*R*)-KTP) y como aceptor de energía de triplete cada uno de los enantiómeros de (1-naftil)etilamina (*R*)- o (*S*)- NEA). Las propiedades fotofísicas de KTP y NEA fueron muy similares a las de BZP y NPT respectivamente; para comprobarlo se realizaron experimentos control de absorción (Figura 3.5.), emisión de fluorescencia (Figura 3.6.), fosforescencia (Figura 3.7.) y fotólisis de destello láser (Figura 3.8.) donde se compararon los dos cromóforos tipo benzofenona por un lado, y los dos cromóforos tipo naftaleno por otro.

Se observó cómo los espectros de absorción de BZP y KTP eran prácticamente iguales; del mismo modo los espectros de absorción de NPT y NEA resultaron ser muy parecidos. En las Figuras 3.5.B y 3.5.D se aprecia como únicamente los cromóforos tipo benzofenona absorben a 355 nm (Figura 3.5).

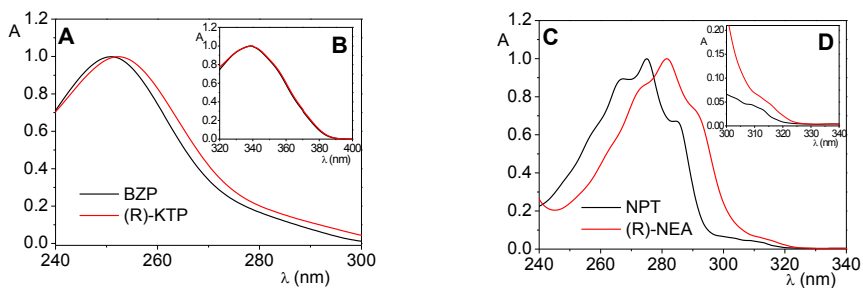


Figura 3.5. Espectro de absorción normalizado en acetonitrilo de **A:** BZP vs. KTP (5×10^{-5} M). **B:** BZP vs. KTP (2.6×10^{-3} M). **C:** NPT vs. NEA (2.6×10^{-4} M). **D:** Ampliación del espectro.

Se observó que tanto NPT como NEA presentaban el mismo máximo de emisión de fluorescencia (Figura 3.6).

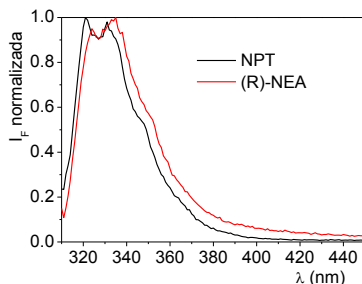


Figura 3.6. Espectro de fluorescencia normalizado de NPT vs. NEA a $\lambda_{exc} = 308$ nm, MeCN, N_2 .

Las emisiones de fosforescencia de los cromóforos tipo benzofenona resultaron prácticamente idénticas, del mismo modo que los espectros de NPT y NEA, (Figura 3.7).

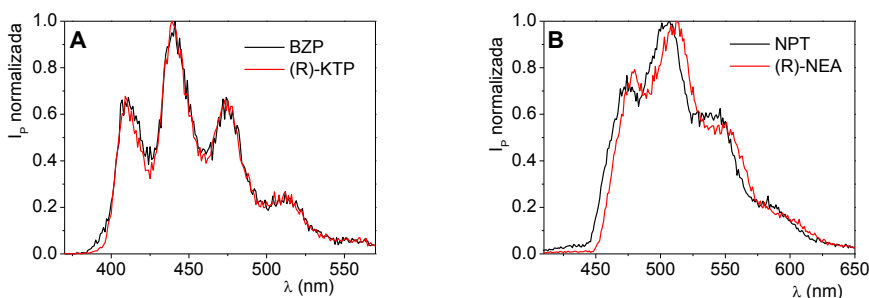


Figura 3.7. Espectro de fosforescencia normalizado de **A:** BZP vs. KTP ($\lambda_{exc} = 295$ nm) y **B:** NPT vs. NEA ($\lambda_{exc} = 308$ nm) en matriz de EtOH a 77 K.

Los espectros de absorción transitoria de BZP y KTP resultaron ser similares, al igual que las cinéticas monitorizadas a 530 nm. Del mismo modo, los espectros de absorción transitoria de NPT y NEA fueron iguales, (máximo a 420 nm) y también las cinéticas monitorizadas a esta longitud de onda (Figura 3.8).

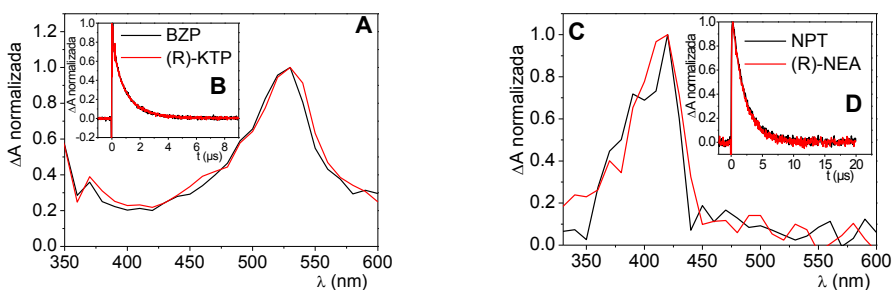


Figura 3.8. Espectro de absorción transitoria normalizado de **A:** BZP vs. KTP ($\lambda_{exc} = 355$ nm) en MeCN, N_2 , 0.15 μs después del pulso del láser. **B:** Cinéticas monitorizadas a 530 nm. **C:** NPT vs. NEA ($\lambda_{exc} = 308$ nm) en MeCN, N_2 , 0.15 μs después del pulso del láser. **D:** Cinéticas monitorizadas a 420 nm.

Al igual que en el caso de los sistemas BZP/NPT, al irradiar KTP a 355 nm en MeCN/N₂ se obtuvo la señal típica del triplete, con un máximo de absorción a 530 nm. En presencia de NEA, se observó una rápida desactivación de esta señal y la aparición de otra a 420 nm, correspondiente al triplete de NEA. Esta transferencia de energía triplete-triplete desde ³KTP* a NEA para generar ³NEA* resultó ser estereoselectiva (Figura 3.9).

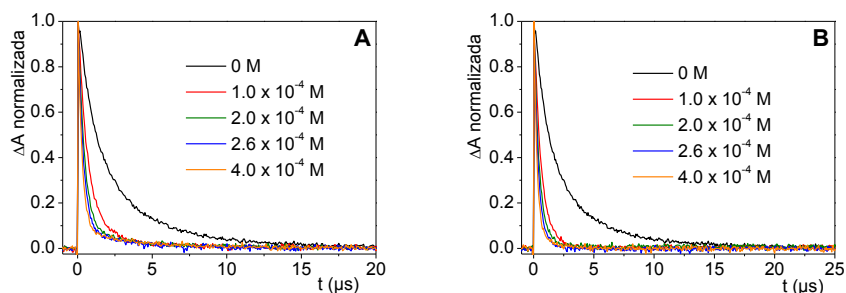


Figura 3.9. Cinéticas de desaparición ($\lambda_{\text{máx}} = 420 \text{ nm}$) para la desactivación del (*R*)-KTP ($2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) en acetonitrilo y atmósfera de N₂ a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ en presencia de cantidades crecientes de **A:** (*S*)-NEA o **B:** (*R*)-NEA.

Para este proceso se obtuvieron constantes de desactivación $k_D = (8.8 \pm 0.6) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_D = (10.4 \pm 0.8) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la desactivación del (*R*)-KTP en presencia de (*S*)-NEA o (*R*)-NEA, respectivamente, como se observa en la Figura 3.10.

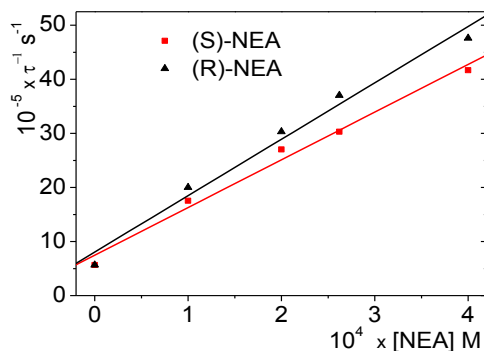


Figura 3.10. Representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de desactivación de (*R*)-KTP en presencia de (*S*)-NEA o (*R*)-NEA.

Del mismo modo se realizaron los experimentos utilizando el enantiómero (*S*) del ketoprofeno como dador de energía y se obtuvo el valor más alto de la constante para la desactivación del triplete del cromóforo tipo BZP para la mezcla (*S*)-KTP/(*S*)-NEA, confirmando la tendencia anteriormente descrita.

Respecto al triplete de NPT, en el espectro de absorción transitoria se observó una banda centrada a 430 nm; la desaparición de estas especies tuvo lugar mediante cinéticas diferentes (Figura 3.11) para cada enantiómero de NEA. La estereodiferenciación en la desactivación de $^3\text{NEA}^*$ se atribuyó a la formación del excíplejo ($iv + v$)²⁷, de modo que el reconocimiento estereoquímico por parte de (*R*)-KTP daba lugar a la discriminación quiral.

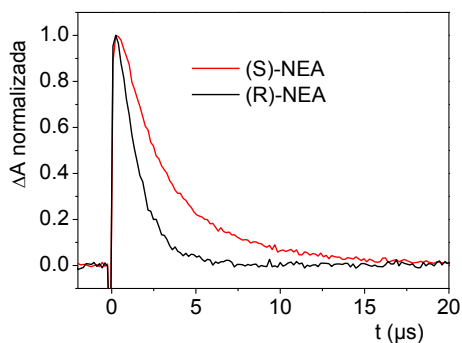


Figura 3.11. Fotólisis de destello láser de (*R*)-KTP ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2 , $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) en presencia de (*S*)-NEA y (*R*)-NEA $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cinéticas monitorizadas a 430 nm.

La fluorescencia retardada de tipo P también se observó en las combinaciones KTP/NEA como una banda negativa centrada a 340 nm. La formación y desaparición de esta especie transitoria se muestra en la Figura 3.12. Del mismo modo que anteriormente, las cinéticas dependieron de la configuración de KTP y NEA utilizados, resultando ser más rápido en el caso de (*R*)-NEA. La fluorescencia retardada implica la colisión entre dos tripletes, por lo que debería ser intrínsecamente insensible a la naturaleza (*R*)- o (*S*)- del carbono asimétrico de NEA, de modo que la estereodiferenciación observada es un reflejo de las diferencias entre los correspondientes tripletes precursores. Todo esto estaba de acuerdo con el tiempo de vida esperado para este proceso, que resultó ser la mitad del valor encontrado para los tripletes precursores.

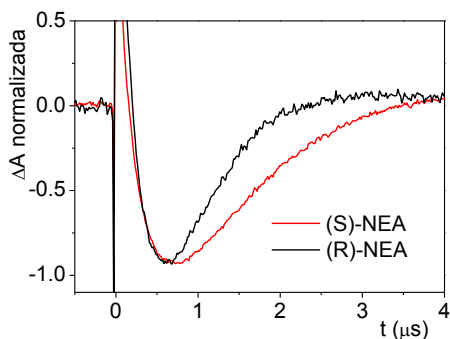


Figura 3.12. Fotólisis de destello láser de (*R*)-KTP ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2 , $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) en presencia de (*S*)-NEA y (*R*)-NEA $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cinéticas monitorizadas a 340 nm.

En la Tabla 3.2. se muestran los tiempos de vida obtenidos de los estados excitados singlete y triplete de (*R*)- o (*S*)-NEA tras FDL de (*R*)-KTP a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

	$\tau (^3\text{NPT}^*) / \mu\text{s}$	$\tau (^1\text{NPT}^*) / \mu\text{s}$
(<i>R</i>)-NEA	1.4	0.8
(<i>S</i>)-NEA	3.0	1.5

Tabla 3.2. Tiempos de vida obtenidos tras FDL de (*R*)-KTP ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2 , $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) en presencia de (*S*)-NEA y (*R*)-NEA $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$.

3.3. Conclusiones

La espectroscopía de absorción transitoria ha mostrado ser una herramienta muy útil para investigar la formación y desaparición de estados excitados singlete generados por aniquilación triplete-triplete, que se forman tras una transferencia de energía T-T desde un sensibilizador excitado selectivamente.

La emisión de la fluorescencia retardada se ha observado en forma de banda negativa en la escala de los microsegundos en el espectro de absorción transitoria.

En el caso de sistemas formados por benzofenona y naftaleno quirales, se ha observado estereodiferenciación en las cinéticas obtenidas tras la transferencia de energía T-T, tanto para la desaparición del triplete del cromóforo de naftaleno a través de la formación de excíplejos, como para la emisión de fluorescencia del estado excitado singlete del naftaleno.

3.4. Parte experimental

3.4.1. Reactivos y disolventes

Benzofenona, (*R*)- o (*S*)-ketoprofeno, naftaleno y (*R*)- o (*S*)-(1-naftil)etilamina son comerciales y fueron adquiridos de Aldrich. El acetonitrilo utilizado como disolvente fue grado HPLC y adquirido de Merck. El etanol absoluto fue adquirido de Scharlau.

3.4.2. Medidas de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se realizaron purgando la disolución durante 20 minutos con N₂. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 × 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C).

3.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser

Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 355 nm, con una potencia de 19 mJ por pulso de láser (excepto en algunos experimentos en los que se seleccionaron diversas potencias), a una longitud de onda de excitación de 308 nm (potencia de 10 mJ) y a una longitud de onda de excitación de 266 nm a varias

potencias. Las disoluciones fueron purgadas durante 20 minutos con N₂ antes de la realización del experimento. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.2. Las cinéticas se obtuvieron por acumulación de las señales tras 10 pulsos del láser, mientras que los espectros de las especies transitorias se obtuvieron por acumulación de señales cada 10 nm tras 2 pulsos del láser para cada longitud de onda. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 × 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22 °C).

3.4.4. Medidas de fosforescencia

Las medidas se realizaron en tubos de cuarzo que se introdujeron en nitrógeno líquido antes de medir. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.3. las disoluciones se prepararon en etanol.

3.5. Referencias bibliográficas

1. A. Gilbert, J. Baggott, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1991**.
2. N. J. Turro, J. C. Scaiano, V. Ramamurthy, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books, Sausalito, **2009**.
3. Y. Kanda, H. Kaseda, T. Matumura, *Spectrochim. Acta* **1964**, 20, 1387.
4. R. M. Hochstrasser, H. Lutz, G. W. Scott, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 24, 162.
5. K. Sandros, *Acta Chem. Scand.* **1969**, 23, 2815.
6. M. W. Wolf, R. E. Brown, L. A. Singer, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 526.
7. S. K. Chattopadhyay, S. K. Kumar, P. K. Das, *J. Photochem* **1985**, 30, 81.
8. W. J. Leigh, D. R. Arnold, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 406.
9. W. L. Wallace, R. P. Van Duyne, F. D. Luis, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 5319.
10. H. H. Perkampues, I. Sandeman, C. J. Timons, *DMS UV Atlas of Organic Compounds*, Verlag Chemie, Weinheim, Butterworths, London, England, **1966-1971**, Vol I-V.
11. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence of Aromatic Molecules*, Academic Press, New York, **1971**, Second Edition.

12. J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Interscience, New York, **1970**.
13. B. Armand, R. Bensasson, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, 34, 44;
14. D. F. Evans, *J. Chem. Soc.* **1957**, 1351.
15. M. Z. Hoffman, G. Porter, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1962**, 268, 46.
16. E. Clar, *Spectrochim. Acta* **1950**, 4, 116.
17. B. Stevens, M. F. Thomaz, *Chem. Phys. Lett.* **1968**, 549.
18. C. A. Parker, T. A. Joyce, *Trans. Faraday Soc.* **1966**, 62, 2785.
19. A. R. Horrocks, F. Wilkinson, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1968**, 7, 421.
20. G. N. Lewis, M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 2100.
21. D. N. Dempster, T. Morrow, M. F. Quinn, *J. Photochem.* **1974**, 2, 329.
22. M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, M. T. *Handbook of Photochemistry*. CRC/Taylor & Francis: Boca Ratón, **2006**.
23. I. Carmichael, G. L. Hugh, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, 15, 1.
24. X. Cai, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 9319.
25. A. D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1997**;
<http://old.iupac.org/goldbook/D01579.pdf>.
26. M. Yamaji, T. Tanaka, H. Shizuka, *Chem. Lett.* **1997**, 19.
27. H. Shizuka, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 825.

28. M. C. Jiménez, S. E. Stiriba, R. Tormos, J. Pérez-Prieto, M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 36.

Capítulo 4

Pseudopéptidos
basados en naftaleno

4.1. Introducción

Los compuestos pseudopeptídicos o pseudopéptidos (PSP) son sensores apropiados para una gran variedad de especies. Ello está en el origen del fenómeno de reconocimiento molecular, que ha sido aplicado en campos como medicina,¹ química analítica² o supramolecular.³ Los pseudopéptidos son modelos sintéticos empleados para facilitar el estudio de procesos biológicos de elevada complejidad.^{4,5} Una estrategia consiste en el diseño de modelos capaces de incorporar un cromóforo activo en la estructura química del PSP, que podría informar sobre las interacciones supramoleculares con un huésped determinado, a través de las propiedades de absorción y emisión de sus estados excitados.

En cuanto a los parámetros fotofísicos para obtener información relevante acerca de las interacciones de unión entre PSP y huésped, la mayoría de los trabajos previos descritos en la bibliografía examinan el comportamiento del estado excitado singlete mediante técnicas de fluorescencia en estado estacionario o resuelta en el tiempo.⁶ En cambio, el comportamiento del estado excitado triplete ha sido poco explotado,⁷ aunque la técnica de fotólisis de destello láser sea una buena herramienta en el estudio de este tipo de investigaciones.⁸⁻¹⁶

Uno de los requisitos que debe tener un cromóforo para ser incorporado en la estructura pseudopeptídica es que sus propiedades fotofísicas hayan sido bien definidas o que puedan ser fácilmente caracterizadas. Por este motivo, naftaleno (NPT) es una buena elección.

Tal y como aparece en la introducción de la presente tesis, se encuentran descritas en la bibliografía las propiedades fotofísicas del cromóforo NPT.^{17,18} Con toda esta información, podríamos anticipar, que la incorporación de un cromóforo NPT en la estructura pseudopeptídica podría ser una herramienta para investigar las interacciones de los estados excitados de los PSP con los huéspedes complejados.

En este contexto, las propiedades de fluorescencia de los pseudopéptidos conteniendo subunidades de NPT han sido aplicadas a la detección de derivados de aminoácidos N-protectados.¹⁹ Sin embargo, el comportamiento del estado excitado triplete todavía no ha sido explotado. La utilización de derivados de benzofenona como fotosensibilizadores de triplete permite generar directamente $^3\text{NPT}^*$ sin pasar por su estado excitado singlete, en base a la posibilidad de excitar selectivamente BZP a $\lambda > 320$ nm, su valor de ϕ_{CIS} cercano a la unidad y de E_T superior a la de NPT.

El objetivo de este capítulo es investigar el comportamiento del estado excitado triplete de los pseudopéptidos conteniendo cromóforo NPT (PSP-1 y PSP-2) en presencia de BZP o BPN, utilizando 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) como modelo simple de referencia. Para el estudio en presencia de BZP, se ha utilizado (*S*)-ketoprofeno (*(S)*-KTP). En el caso de BPN, es imposible su excitación selectiva en presencia de NPT, por lo que, para poder generar selectivamente $^3\text{BPN}^*$ se sintetizarán diadas modelo conteniendo (*R*)- o (*S*)- 2-(2-fluorobifenil-4-il)propan-1-ol), (*(R)*- o (*S*)- 2-(FBPOH)) unido covalentemente a (*S*)-KTP.

De este modo, la excitación selectiva de BZP ($E_T = 69 \text{ kcal mol}^{-1}$), seguida de transferencia de energía triplete-triplete a BPN ($E_T = 65 \text{ kcal mol}^{-1}$), daría lugar a $^3\text{BPN}^*$, que podría ser desactivado en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN. El comportamiento del estado excitado triplete de NPT revelaría características interesantes de las interacciones entre pseudopéptidos / benzofenona o bifenilo.

En la Figura 4.1 se muestran las estructuras químicas de los compuestos estudiados en el presente capítulo.

Capítulo 4. Pseudopéptidos basados en naftaleno

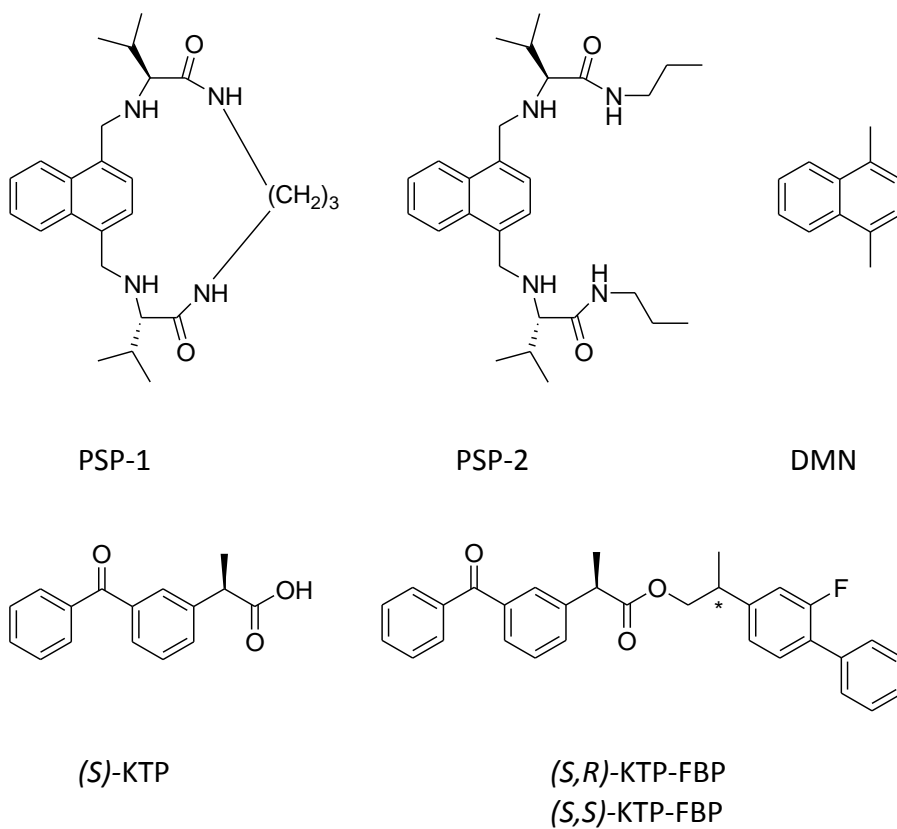


Figura 4.1. Estructura química de los compuestos estudiados en este capítulo.

4.2. Resultados y discusión

La síntesis de los derivados de naftaleno pseudopeptídicos PSP-1 y PSP-2 se encuentra descrita en la literatura.²⁰ Está basada en el acoplamiento de 1,4-bis(bromometilnaftaleno) con valina; mientras que PSP-1 presenta una estructura macrocíclica, PSP-2 conserva la cadena abierta a ambos lados de NPT.

4.2.1. Sistemas BZP/NPT

El espectro de absorción UV (Figura 4.2) de (*S*)-KTP (MeCN, 1×10^{-3} M) mostró la banda característica de la transición $S_0 \longrightarrow S_1$ (320-390 nm). En presencia de cantidades crecientes de PSP-1, PSP-2 o DMN (desde 1×10^{-4} a 4×10^{-4} M), esta región del espectro no presentó ningún cambio, indicando que es posible la excitación selectiva del cromóforo BZP a 355 nm.

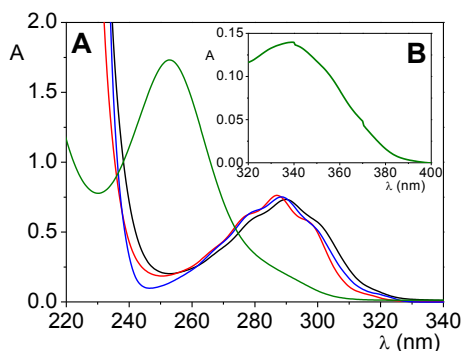


Figura 4.2. Espectro de absorción UV de **A:** PSP-1 (negro), PSP-2 (rojo), DMN (azul) y (*S*)-KTP (verde) en MeCN 1×10^{-4} M. **B:** (*S*)-KTP en MeCN 1×10^{-3} M.

Al irradiar (*S*)-KTP a 355 nm mediante FDL en MeCN/N₂, (2.6×10^{-3} M) se obtuvo la señal típica del triplete de BZP, con un máximo de absorción a 530 nm ($\tau_T = 1.6 \mu\text{s}$). En presencia de NPT (PSP-1, PSP-2 o DMN), se observó una rápida desactivación de esta señal y la aparición de otra a 420 nm, correspondiente al triplete de NPT (tanto en ausencia como en presencia de HOAc), Figura 4.3.A,B.

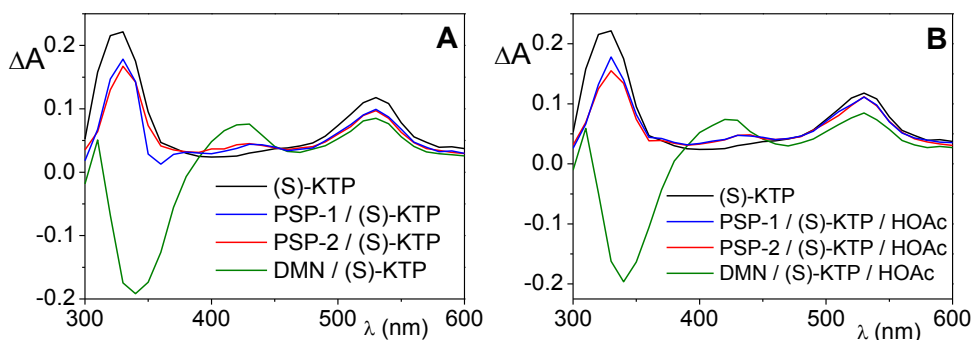


Figura 4.3. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, N₂, MeCN) de (*S*)-KTP 2.6×10^{-3} M en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN 2.6×10^{-4} M. Espectros registrados 0.15 μs después del pulso del láser. **A:** En ausencia de ácido acético. **B:** En presencia de ácido acético.

La rápida desactivación de la señal de ³BZP* y la aparición de la señal correspondiente al triplete de NPT indicó transferencia de energía triplete-triplete desde ³BZP* a NPT. Como era de esperar, este proceso resultó ser más rápido en presencia de concentraciones mayores de NPT (Figura 4.4).

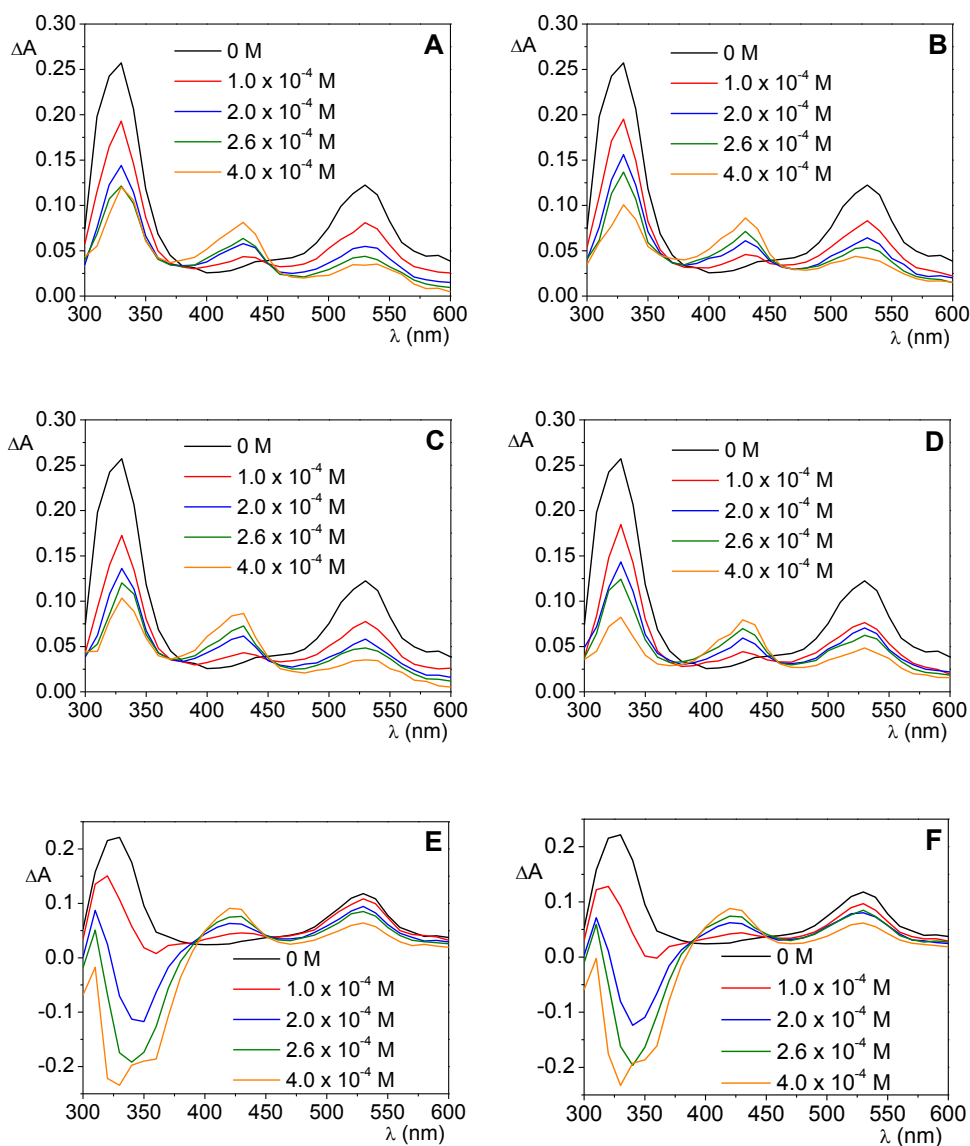
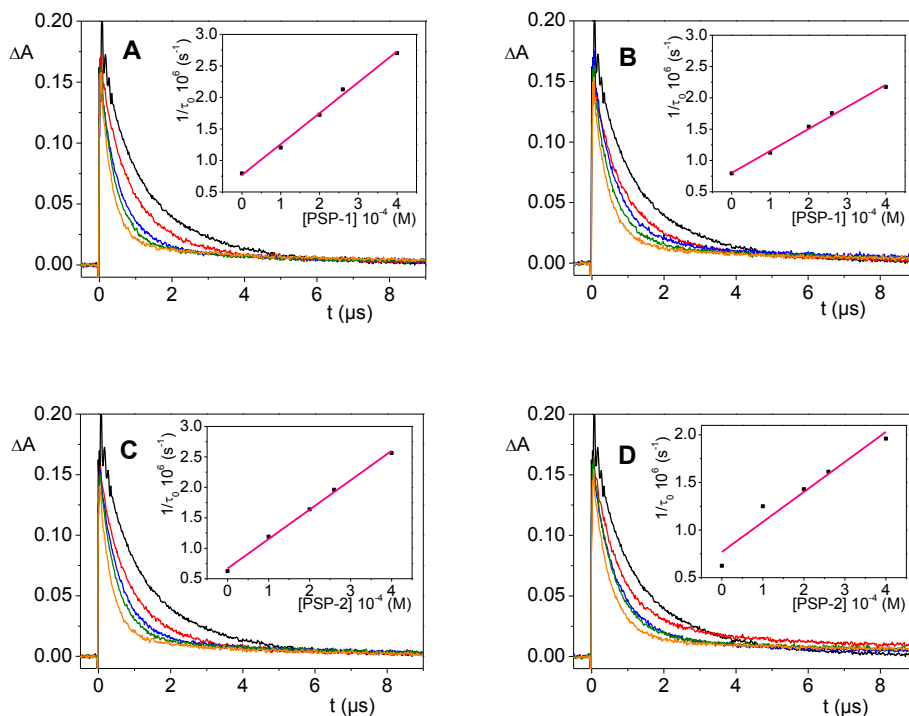


Figura 4.4. Fotólisis de destello láser de (*S*)-KTP ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, N_2 , MeCN) en presencia de cantidades crecientes de: **A:** PSP-1, $0.69 \mu\text{s}$ después del pulso del láser, **B:** PSP-1 / HOAc, $0.69 \mu\text{s}$ después del pulso del láser, **C:** PSP-2, $0.69 \mu\text{s}$ después del pulso del láser, **D:** PSP-2 / HOAc, $0.69 \mu\text{s}$ después del pulso del láser, **E:** DMN, $0.15 \mu\text{s}$ después del pulso del láser, **F:** DMN / HOAc, $0.15 \mu\text{s}$ después del pulso del láser.

De la pendiente de la recta de las representaciones Stern-Volmer (Figura 4.5) se obtuvieron los valores de las constantes de desactivación (k_D) de (*S*)-KTP por los derivados de naftaleno (Tabla 4.1). Se observó como esta desactivación es similar en el caso de los PSP y más rápida para DMN. En medio ácido se obtuvo la misma tendencia, aunque el proceso tuvo lugar a escalas de tiempo mayores.



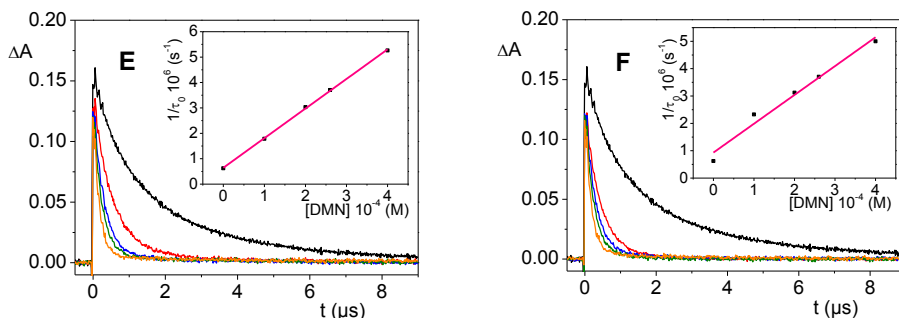


Figura 4.5. Fotólisis de destello láser de (*S*)-KTP ($\lambda_{exc} = 355$ nm, 2.6×10^{-3} M, N_2 , MeCN) en presencia de cantidades crecientes de derivados de NPT: 0 M (negro), 1.0×10^{-4} M (rojo), 2.0×10^{-4} M (azul), 2.6×10^{-4} M (verde), 4.0×10^{-4} M (naranja). Cinéticas de desaparición monitorizadas a 530 nm en presencia de: **A:** PSP-1, **B:** PSP-1 / HOAc, **C:** PSP-2, **D:** PSP-2 / HOAc, **E:** DMN, **F:** DMN / HOAc. Las gráficas interiores muestran las representaciones Stern-Volmer para cada desactivación de $^3BZP^*$.

Otro punto a destacar es la formación y desaparición de $^3NPT^*$, que resultó ser mucho más lenta en el caso de los PSP que para DMN (Figura 4.6.A). La tendencia fue similar para relaciones molares de BZP/NPT amplias (26:1 a 6:1); a una relación molar de 10:1 se observó que los tripletes de PSP-1 y PSP-2 se formaban mucho más lentamente (480 ns $< \tau_{formación} < 620$ ns) que en caso de $^3DMN^*$ ($\tau_{formación} = 271$ ns), como se pudo apreciar en el aumento inicial de las cinéticas monitorizadas a $\lambda = 430$ nm. Además, en medio ácido (Figura 4.6.B), el máximo fue alcanzado por los pseudopéptidos *ca* 100 ns después que en el caso de DMN (ver columna $\tau_{formación}$ en Tabla 4.1).

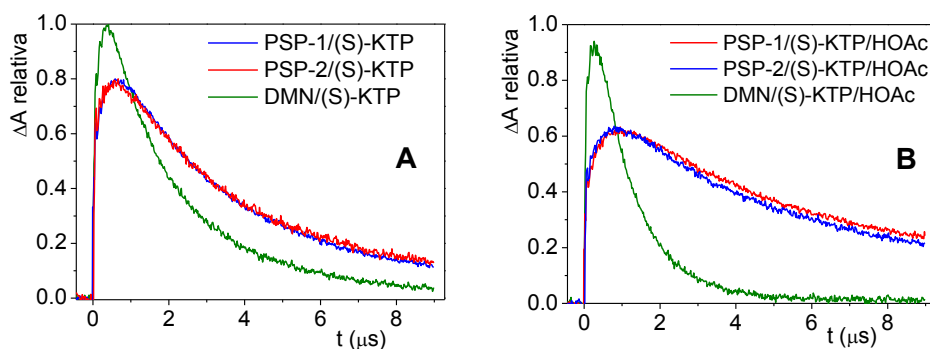


Figura 4.6. Fotólisis de destello láser de (S)-KTP ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, N_2 , MeCN) en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cinéticas monitorizadas a 430 nm. **A:** En ausencia de HOAc y **B:** en presencia de HOAc.

Comparando los valores de máximo de absorbancia a 430 nm (ver columna A rel.(%) en Tabla 4.1), se apreció cómo la transferencia de energía triplete-triplete resultó ser más efectiva en medio no ácido y mayor en el caso de $^3\text{DMN}^*$ que para $^3\text{PSP-1}^*$ ó $^3\text{PSP-2}^*$. Estas observaciones estuvieron de acuerdo con los valores de constantes de velocidad (ver columna k_D en Tabla 4.1) encontrados para la desactivación del estado excitado precursor ($^3(S)\text{-KTP}^*$). Estos datos podrían indicar que la geometría de aproximación entre dador (BZP) y aceptor (NPT) se encuentra influenciada por la forma del entorno del cromóforo poliaromático tanto en PSP-1 como en PSP-2. En lo referido a la desaparición de $^3\text{NPT}^*$ (asociado a la formación de exciplejos triplete entre BZP y $^3\text{NPT}^*$), se encontraron tiempos de vida de triplete idénticos para $^3\text{PSP-1}^*$ y $^3\text{PSP-2}^*$, mientras que para $^3\text{DMN}^*$ el tiempo de vida fue mucho menor, es decir, que la desaparición de los complejos formados

entre BZP y $^3\text{PSP-1}^*$ ó $^3\text{PSP-2}^*$ resultó ser más lenta debido a la estructura de los pseudopéptidos siendo este hecho más pronunciado en medio ácido (ver columna τ_T en Tabla 4.1).

La diferencia más importante que se observó entre los espectros de absorción transitoria de los pseudopéptidos PSP-1 y PSP-2 y el modelo DMN fue la ausencia de la banda negativa centrada a 340 nm, atribuida a la fluorescencia retardada de tipo P desde $^1\text{NPT}^*$, a través de la aniquilación de $^3\text{NPT}^*$ en la escala de microsegundos (ver capítulo 3).²¹ De nuevo, este hecho puede ser debido al impedimento estérico entre los tripletes del cromóforo NPT por la estructura de los pseudopéptidos.

En la Tabla 4.1 se recogen las propiedades fotofísicas de los estados excitados triplete en los sistemas estudiados.

	Cdc. ^a	$k_D/10^{10}$ ($M^{-1} s^{-1}$) ^b	$\tau_{\text{formación}}$ (ns) ^c	A rel. (%) ^d	τ_T (μs) ^e
PSP-1	A	0.49 ± 0.02	477 ± 4	84	3.25 ± 0.02
	B	0.34 ± 0.01	571 ± 5	63	6.05 ± 0.03
PSP-2	A	0.48 ± 0.01	513 ± 4	84	3.15 ± 0.02
	B	0.32 ± 0.04	616 ± 4	63	6.53 ± 0.03
DMN	A	1.16 ± 0.02	271 ± 3	100	1.79 ± 0.01
	B	1.05 ± 0.01	271 ± 2	94	1.11 ± 0.02

Tabla 4.1. Propiedades fotofísicas de los estados excitados triplete en los sistemas (S)-KTP/PSP-1, (S)-KTP/PSP-2 y (S)-KTP/DMN.

^a Condiciones: A: MeCN, B: MeCN/HOAc 0.6 M. ^b Constantes de desactivación para ³(S)-KTP* ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) monitorizadas a 530 nm en presencia de cantidades crecientes de derivados de NPT (desde 1.0×10^{-4} a $4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$). ^c Crecimiento de la señal de ³NPT* a 430 nm. ^d Máximo de la señal a 430 nm dividido por el máximo de la señal a 430 nm para el sistema DMN/(S)-KTP (valor dado como porcentaje). ^e Tiempo de vida de triplete de NPT, obtenido a partir de la señal a 430 nm.

4.2.2. Sistemas BZP-BPN/NPT

Para poder generar selectivamente ${}^3\text{BPN}^*$ en presencia de cromóforos de tipo NPT se sintetizaron diadas modelo conteniendo (*S*)-KTP unido covalentemente a (*R*)- o (*S*)- 2-(2-fluorobifenil-4-il)propan-1-ol), ((*R*)- o (*S*)- 2-(FBPOH)) (obtenido por reducción del flurbiprofeno).²²

Antes de estudiar los sistemas formados por las diadas (*S,R*)- o (*S,S*)- KTP-FBP en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN, se estudiaron las propiedades fotofísicas de las diadas aisladas.

El espectro de absorción UV (Figura 4.7) de las diadas resultó ser idéntico al que correspondería a la suma de los espectros de (*S*)-KTP y (*S*)- FBPOH aislados a la misma concentración, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

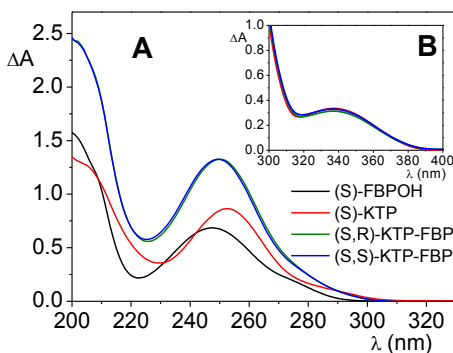


Figura 4.7. Espectro de absorción UV de **A:** (*S*)-FBPOH, (*S*)-KTP y diadas (*S,R*)- o (*S,S*)-KTP-FBP en acetonitrilo 5.0×10^{-5} M. **B:** (*S*)-KTP y diadas (*S,R*)- o (*S,S*)-KTP-FBP en acetonitrilo 2.6×10^{-3} M.

Cuando se realizaron los ensayos de FDL a la longitud de onda de excitación de 355 nm para las diadas (*S,R*)-KTP-FBP y (*S,S*)-KTP-FBP, se observó la típica banda de absorción triplete-triplete de FBP (máximo a 360 nm,²³ Figura 4.8) debido a un transferencia de energía triplete-triplete intramolecular desde ³BZP* a BPN muy rápida, junto con trazas residuales correspondientes a ³BZP* ($\lambda_{\text{máx}} = 500\text{-}550\text{ nm}$).

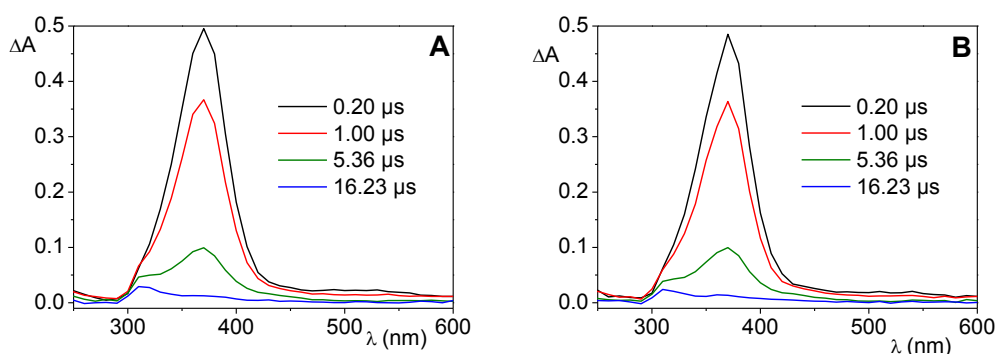


Figura 4.8. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355\text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3}\text{ M}$, N_2 , MeCN) a diferentes ventanas de tiempo de diadas **A:** (*S,S*)-KTP-FBP y **B:** (*S,R*)-KTP-FBP.

Por otro lado, cuando las diadas KTP-FBP se encontraron en presencia de derivados de NPT (Figura 4.9), el comportamiento reflejado en el espectro de absorción transitoria resultó ser distinto según el derivado de NPT que estuvo presente. En el caso de los PSPs, a escalas de tiempo cortas se siguió observando la banda correspondiente a ³BPN*; en cambio, a escalas de tiempo más largas comenzó a observarse la aparición de una nueva banda a $\lambda = 430\text{ nm}$

correspondiente a $^3\text{NPT}^*$. Cuando las diadas KTP-FBP se encontraron en presencia del compuesto modelo DMN, en las mismas condiciones experimentales que las correspondientes a los PSP, únicamente se observaron las bandas a $\lambda = 430$ ($^3\text{NPT}^*$) y 330 nm ($^1\text{NPT}^*$).

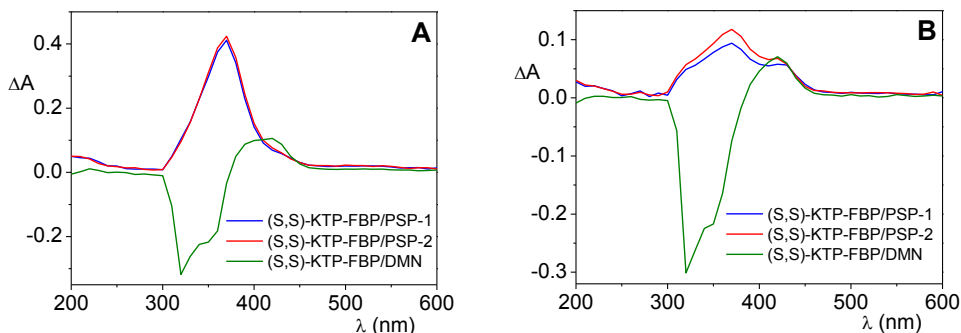


Figura 4.9. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, 2.6×10^{-3} M, N_2 , MeCN) de (S,S)-KTP-FBP en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN 2.6×10^{-4} M. Espectros registrados **A**: 0.20 μs y **B**: 1.00 μs después del pulso del láser.

En la Figura 4.10 se muestran los espectros de absorción transitoria de cada una de las diadas (S,R)-KTP-FBP y (S,S)-KTP-FBP en presencia de cada derivado de NPT. El comportamiento de ambas diadas resultó ser similar.

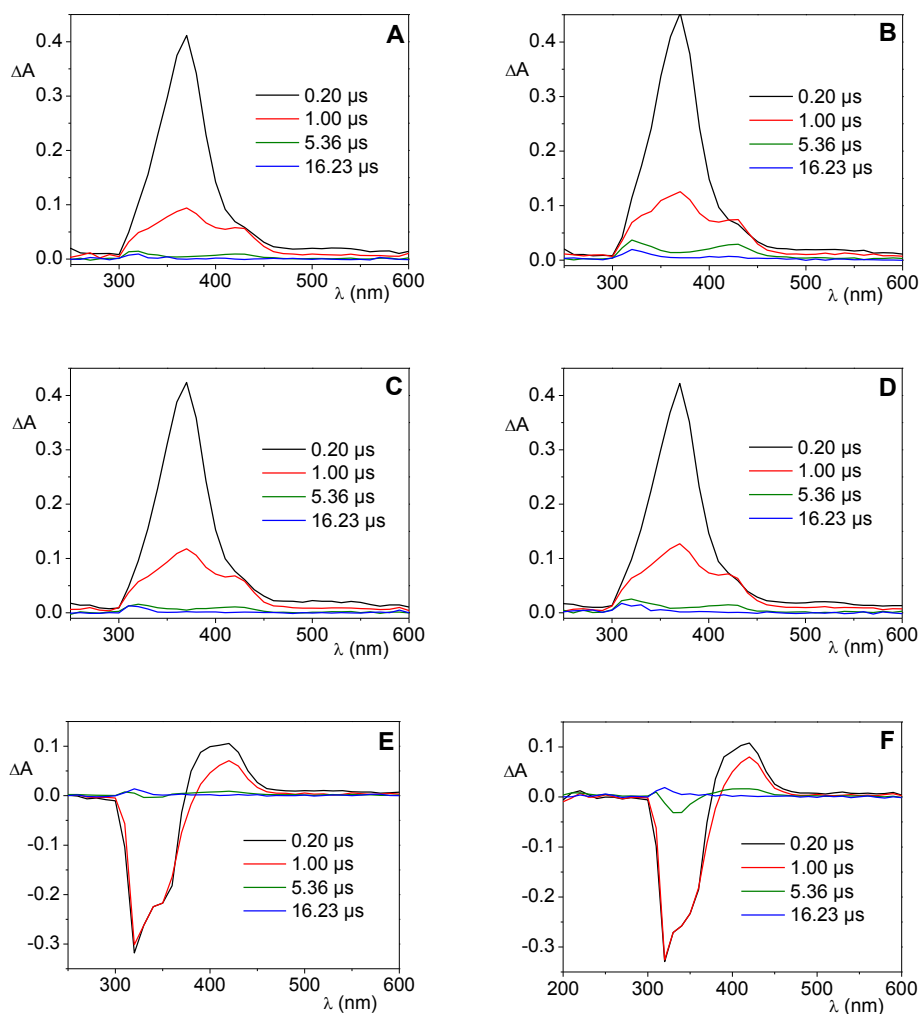


Figura 4.10. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, N_2 , MeCN) de (*S,S*)-KTP-FBP en presencia de **A**: PSP-1, **C**: PSP-2 y **E**: DMN $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ y de (*S,R*)-KTP-FBP en presencia de **B**: PSP-1, **D**: PSP-2 y **F**: DMN $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ Espectros registrados a diferentes ventanas de tiempo después del pulso del láser.

Las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete de bifenilo ($^3\text{BPN}^*$, $\lambda_{\text{máx.}} = 360 \text{ nm}$) para las diadas (*S,R*)-KTP-FBP y (*S,S*)-KTP-FBP en presencia de derivados de NPT se muestran en la Figura 4.11. Se observó cómo las desapariciones resultaron ser más lentas en el caso de los PSP que para el compuesto modelo DMN. También se observó una ligera diastereodiferenciación entre las diadas. Los tiempos de vida de $^3\text{BPN}^*$ se muestran en la Tabla 4.2.

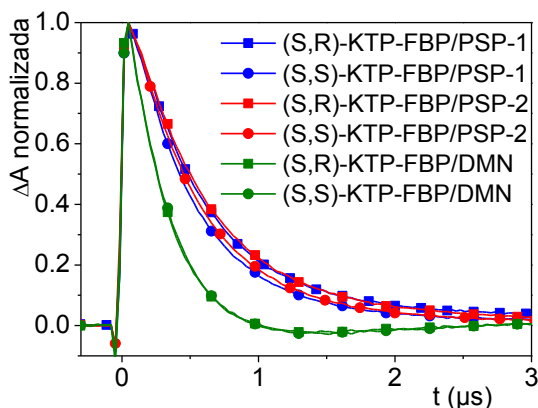


Figura 4.11. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, N_2 , MeCN) de (*S,S*)- o (*S,R*)-KTP-FBP en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cinéticas de desaparición monitorizadas a 360 nm y normalizadas.

Las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete de naftaleno ($^3\text{NPT}^*$, $\lambda_{\text{máx.}} = 430 \text{ nm}$) para las diadas (*S,R*)-KTP-FBP y (*S,S*)-KTP-FBP en presencia de derivados de NPT se muestran en la Figura 4.12. Se observó que las desapariciones resultaron ser más lentas en el caso de los PSP que para el compuesto modelo DMN. Además se

observó diastereodiferenciación entre las diadas, siendo la desaparición más rápida en el caso del diastereoisómero (*S,S*)-. Con el derivado de NPT de cadena abierta (PSP-2), el tiempo de vida de $^3\text{NPT}^*$ resultó ser mayor para la diada (*S,R*)- que para la (*S,S*)- (2.50 vs. 1.89 μs respectivamente). Además, para el derivado de NPT de cadena cerrada, esta diastereodiferenciación resultó ser mayor (tiempos de vida de $^3\text{NPT}^*$ de 3.52 vs. 1.92 μs para (*S,R*)- y (*S,S*)- respectivamente). Los resultados observados estarían de acuerdo con la desactivación de las especies transitorias a través de complejos en el estado excitado entre diadas KTP-FBP y derivados de NPT. En caso del compuesto modelo no quiral DMN no se encontraron diferencias asociadas a la diastereodiferenciación.

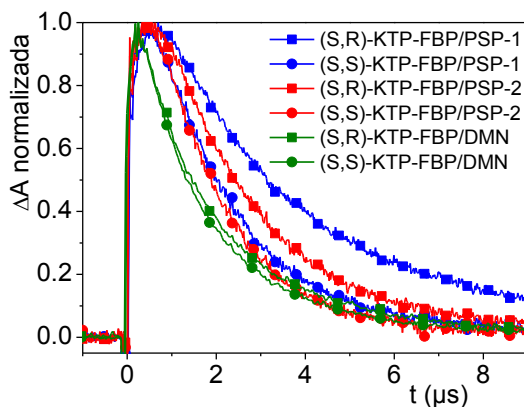


Figura 4.12. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, N_2 , MeCN) de (*S,S*)- o (*S,R*)- KTP-FBP en presencia de PSP-1, PSP-2 y DMN $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cinéticas de desaparición monitorizadas a 430 nm y normalizadas.

Los tiempos de vida de los estados excitados triplete de bifenilo ($^3\text{BPN}^*$) y naftaleno ($^3\text{NPT}^*$) se muestran en la Tabla 4.2. Como la transferencia de energía desde BZP a BPN resultó ser un proceso muy eficiente, tanto en presencia de derivados de NPT como en caso de las diadas KTP-FBP aisladas, no se pudieron monitorizar las cinéticas de desaparición para $^3\text{BZP}^*$ a escalas de tiempo cortas y por lo tanto no se presentan los datos correspondientes.

derivado de NPT	diada	τ ($^3\text{BPN}^*$)	τ ($^3\text{NPT}^*$)
	KTP-FBP	(μs)	(μs)
---	(<i>S,S</i>)-	1.45 ± 0.01	---
---	(<i>S,R</i>)-	2.20 ± 0.01	---
PSP-1	(<i>S,S</i>)-	0.52 ± 0.01	1.92 ± 0.02
PSP-1	(<i>S,R</i>)-	0.62 ± 0.01	3.52 ± 0.03
PSP-2	(<i>S,S</i>)-	0.59 ± 0.01	1.89 ± 0.05
PSP-2	(<i>S,R</i>)-	0.66 ± 0.01	2.50 ± 0.06
DMN	(<i>S,S</i>)-	0.30 ± 0.01	1.75 ± 0.01
DMN	(<i>S,R</i>)-	0.30 ± 0.01	1.65 ± 0.01

Tabla 4.2. Tiempos de vida de los estados excitados triplete de BPN y NPT en los sistemas BZP-BPN/NPT ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, N_2 , MeCN).

4.3. Conclusiones

El estado excitado triplete del cromóforo NPT en PSP-1 y PSP-2 resultó ser una sonda apropiada para las interacciones entre estos pseudopéptidos y sistemas mono- o bicromofóricos conteniendo unidades dadoras de energía como BZP y/o BPN. La presencia del macrociclo o las subestructuras de cadena lateral en los pseudopéptidos tuvieron una gran influencia en las desactivaciones dinámicas de los diversos tripletes estudiados, retardando tanto los procesos de transferencia de energía como las desactivaciones de triplete de NPT mediante la formación de excíplejo.

Por otro lado, únicamente se observó la fluorescencia retardada resultado de la aniquilación triplete-triplete en el caso de los sistemas BZP-BPN/DMN.

4.4. Parte experimental

4.4.1. Reactivos y disolventes

(*S*)- y (*R*)-flurbiprofeno, (*S*)-ketoprofeno, LiAlH_4 1 M en éter dietílico, DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), DMAP (4-dimetilaminopiridina), fueron adquiridos de Aldrich. Los disolventes utilizados para la síntesis y la purificación de las diadas (éter dietílico, hexano, acetato de etilo y diclorometano) fueron de grado analítico y adquiridos de Scharlau. El acetonitrilo utilizado para los experimentos de fotólisis de destello láser fue grado HPLC y adquirido de Merck.

4.4.2. General

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) se realizaron usando cloroformo deuterado.

La purificación de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía preparativa de gel de sílice 60 F₂₅₄ 2 mm de Merck, usando una mezcla acetato de etilo/hexano como eluyente.

4.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser

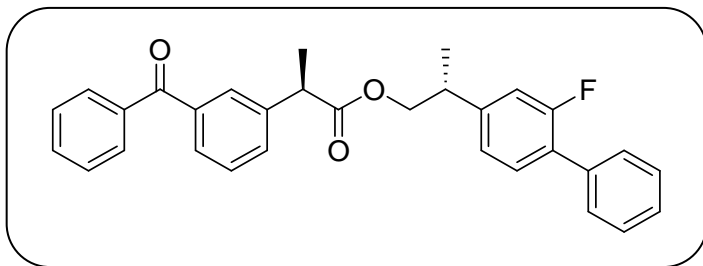
Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 355 nm, con una potencia de 23 mJ por pulso de láser. Las disoluciones fueron purgadas durante 20 minutos con N₂ antes de la realización del experimento. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.2. Las cinéticas se obtuvieron por acumulación de las señales tras 10 pulsos de láser; mientras que los espectros de las especies transitorias se obtuvieron por acumulación de señales cada 10 nm tras 2 pulsos de láser para cada longitud de onda. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 × 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22 °C).

4.4.4. Síntesis de las diadas

La síntesis se llevó a cabo en dos etapas. En la primera de ellas se redujo el grupo carboxilo de flurbiprofeno (FBP) a alcohol (FBPOH). Para ello, sobre una disolución de (*S*) o (*R*)- flurbiprofeno (1.23 mmol) disueltos en 12 mL de éter dietílico a 0 °C, se añadió gota a gota LiAlH₄ 1 M en éter dietílico (5 mL, 1.9 mmol), manteniéndose la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con agua y se secó con MgSO₄. El disolvente orgánico fue rotavaporado. En la segunda etapa, sobre una disolución fría de (*S*) o (*R*)- FBPOH (0.87 mmol) disueltos en 25 mL de

éter dietílico se añadió poco a poco DCC (1.30 mmoles, 1 mL) en éter dietílico. La mezcla se mantuvo en agitación, y sobre esta se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-ketoprofeno (0.87 mmoles, 25 mL) en éter dietílico y una cantidad catalítica de DMAP. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió salmuera y se extrajo con agua. El disolvente orgánico se secó con MgSO_4 y fue eliminado en un rotavapor. Finalmente, se realizó una purificación por cromatografía en capa preparativa de gel de sílice usando una mezcla hexano/acetato de etilo 25% como eluyente.

4.4.5. Caracterización de las diadas



Propanoato de (R)-[2-fluoro(1,1'-bifenil)-4-il]-propilo] (S)-2-(3-benzoilfenil), (S,R)-KTP-FBP.

Rendimiento: 45%.

Aspecto físico: aceite incoloro.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 200 (4.7), 250 (4.4), 340 (2.1).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (d, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$), 1.51 (d, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.03-3.13 (m, 1H), 3.78 (q, 1H, $J = 7.2\text{Hz}$), 4.10-4.16 (m, 1H), 4.23-4.31 (m, 1H), 6.89-6.99 (m, 2H), 7.28-7.77 (m, 15H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 17.7, 18.2, 38.4, 45.4, 69.3, 114.7+115.0, 123.2+123.3, 127.0+127.1, 127.6, 128.3, 128.4, 128.7,

128.9, 129.0, 129.2, 130.0, 130.6, 131.5, 132.5, 135.6, 137.5, 137.8,
140.7, 144.6+144.7, 158.0+161.3, 173.9, 196.4.

HRMS para $C_{31}H_{27}FO_3$ (MH^+): calculada 467.2022, encontrada: 467.2020.

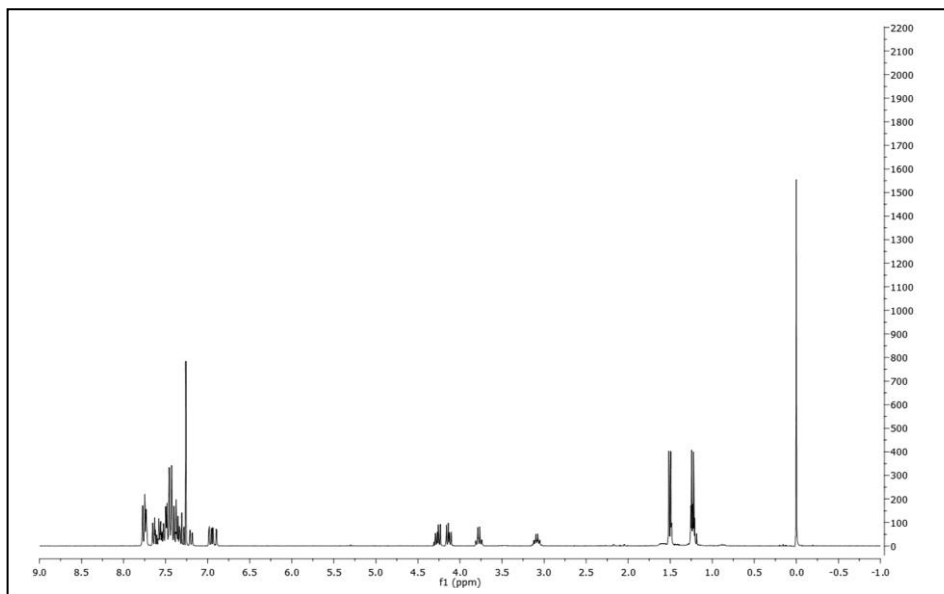


Figura 4.13. Espectro de RMN- ^1H de la diada (*S,R*)-KTP-FBP, (CDCl_3).

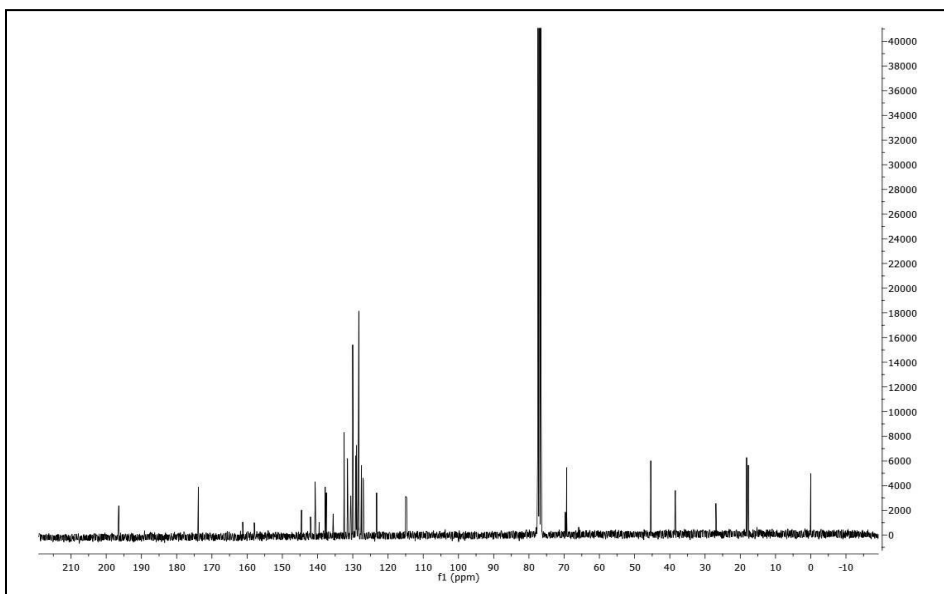
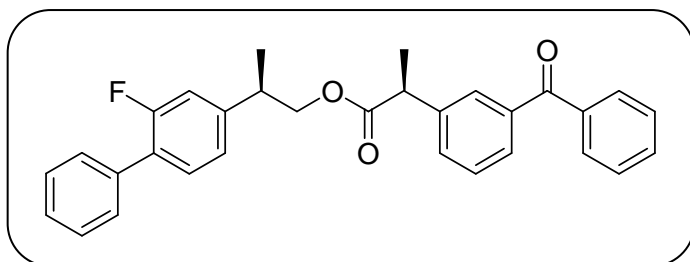


Figura 4.14. Espectro de RMN- ^{13}C de la diada (*S,R*)-KTP-FBP, (CDCl_3).



Propanoato de (S)-[2-fluoro(1,1'-bifenil)-4-il]-propilo] (S)-2-(3-benzoilfenil), (S,S)-KTP-FBP.

Rendimiento: 42%.

Aspecto físico: aceite incoloro.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ (log ϵ): 200 (4.7), 250 (4.4), 340 (2.1).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.24 (d, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$), 1.50 (d, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.01-3.13 (m, 1H), 3.77 (q, 1H, $J = 7.2\text{Hz}$), 4.14-4.24 (m, 2H), 6.88-6.96 (m, 2H), 7.27-7.78 (m, 15H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 17.7, 18.2, 38.5, 45.4, 69.3, 114.7+115.0, 123.2+123.3, 127.0+127.1, 127.6, 128.3, 128.4, 128.5, 128.9, 129.0, 129.2, 130.0, 130.6, 131.5, 132.5, 135.6, 137.5, 137.9, 140.7, 144.6+144.7, 157.9+161.2, 173.8, 196.4.

HRMS para C₃₁H₂₇FO₃ (MH⁺): calculada 467.2022, encontrada: 467.2017.

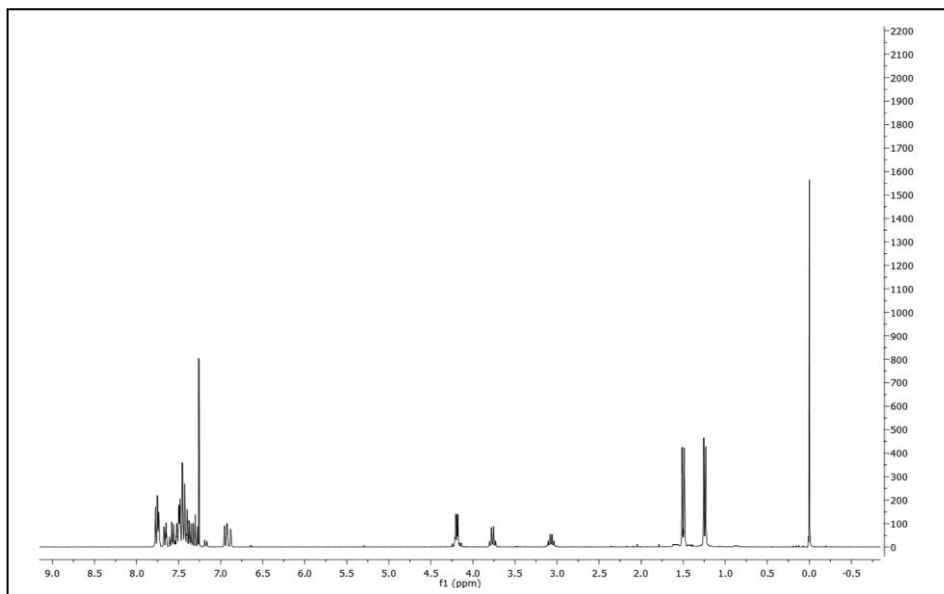


Figura 4.15. Espectro de RMN-¹H de la diada (*S,S*)-KTP-FBP, (CDCl₃).

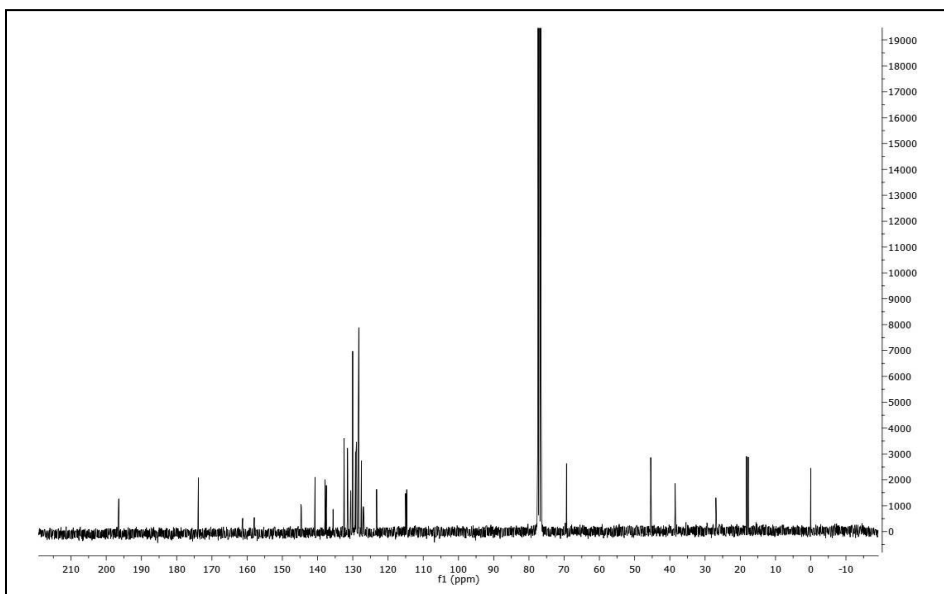


Figura 4.16. Espectro de RMN-¹³C de la diada (*S,S*)-KTP-FBP, (CDCl₃).

4.5. Referencias bibliográficas

1. T. Neffe, M. Bilang, I. Grüneberg, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3482.
2. F. Galindo, M. I. Burguete, L. Vigarra, S. V. Luis, N. Kabir, J. Gavrilovic, D. A. Russell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6504.
3. J. L. Clark, J. Peinado, J. J. Stezowski, R. L. Vold, Y. Huang, G. L. Hoatson, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 26375.
4. J. Eichler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 707.
5. J. A. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1278.
6. F. Galindo, J. Becerril, M. I. Burguete, S. V. Luis, L. Vigarra, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 1659.
7. X. J. Salom-Roig, J. Martinez, M. I. Burguete, F. Galindo, S. V. Luis, M. A. Miranda, M. C. Morant-Miñana, J. Pérez-Prieto, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4859.
8. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, 1, 1015.
9. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10134.
10. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2694.
11. V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, F. Boscá, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 423.
12. V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Boscá, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9538.

13. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11284.
14. C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6861.
15. R. Pérez-Ruiz, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 829.
16. R. Pérez-Ruiz, R. Alonso, E. Nuin, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 4460.
17. S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, **1993**.
18. I. Carmichael, G. L. Hugh, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, 15, 1.
19. I. Alfonso, M. I. Burguete, F. Galindo, S. V. Luis, L. Vigara, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6130.
20. F. Galindo, M. A. Izquierdo, S. V. Luis, L. Vigara, *Tetrahedron* **2007**, 63, 9493.
21. P. Bonancía, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.* **2011**, 515, 194.
22. B. Asins-Fabra, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, 207, 52.
23. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 1038.

Capítulo 5

Diadas
bifenilo-timidina

5.1. Introducción

La radiación ultravioleta (UV) induce reacciones químicas en el ADN conduciendo a mutaciones carcinogénicas; por ello, numerosas investigaciones se dedican al estudio de los estados electrónicos excitados del ADN.¹⁻⁵ La radiación solar UV que llega hasta la superficie de la Tierra está comprendida entre 400 y 320 nm (UVA) y desde 320 a 290 nm (UVB). Tanto la radiación UVA como UVB son capaces de inducir daño al ADN, responsable de algunos tipos de cáncer.⁶⁻⁹ La radiación UVB causa fotorreacciones directas del ADN debido a que es eficientemente absorbida por las nucleobases. También es posible causar la degradación del ADN por medio de fotosensibilización, llevada a cabo tanto por agentes endógenos (p. ej. metabolitos) como exógenos (fármacos, cosméticos, etc.).¹⁰ Se ha comprobado que los fármacos de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuando interaccionan con nucleobases o nucleósidos libres, aumentan la formación de dímeros de timina de tipo ciclobutano.^{11,12} En este contexto, es esencial comprender los canales de desactivación de los estados excitados de los fármacos en presencia de biomoléculas para predecir un posible riesgo fotobiológico en pacientes, generalmente asociado a la fototoxicidad.

Los AINES son agentes terapéuticos frecuentemente prescritos para una gran variedad de condiciones incluido el dolor y la fiebre.¹³ Un grupo importante son los derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos. Entre ellos se encuentran ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno o

flurbiprofeno, que su mayoría son comercializados como mezclas racémicas (con algunas excepciones como el naproxeno). Sin embargo, su actividad antiinflamatoria está principalmente atribuida al enantiómero (*S*).¹⁴ Los estados excitados singlete y triplete más bajos de flurbiprofeno (FBP) se han caracterizado recientemente,¹⁵ y sus propiedades fotofísicas se han empleado para obtener información relevante en diferente campos, desde un punto de vista biológico (grado de unión a proteínas transportadoras, actividad enzimática de la ASH, etc.)¹⁶⁻²⁰ o con fines analíticos (determinación de composiciones enantioméricas).²¹ Además, FBP se ha utilizado como sensibilizador de quinolonas para la determinación de la energía de triplete de la timina en el ADN.^{22,23}

En el pasado se han diseñado sistemas modelo (diadas) conteniendo un fármaco fotoactivo covalentemente unido a un fragmento de una biomolécula, con el propósito de proporcionar una visión mecanística sobre los procesos básicos como transferencia de energía, transferencia de electrón o formación de exciplexo.²⁴⁻²⁷ Mediante esta estrategia, hemos sintetizado dos diadas estereoisoméricas (*S*)-FBP-dThd y (*R*)-FBP-dThd (Figura 5.1) conteniendo (*S*)- o (*R*)- FBP unido covalentemente a la posición 5' del azúcar de la timidina. Estas diadas son, *a priori*, modelos adecuados para la investigación de las interacciones de los estados excitados en los complejos con ADN.

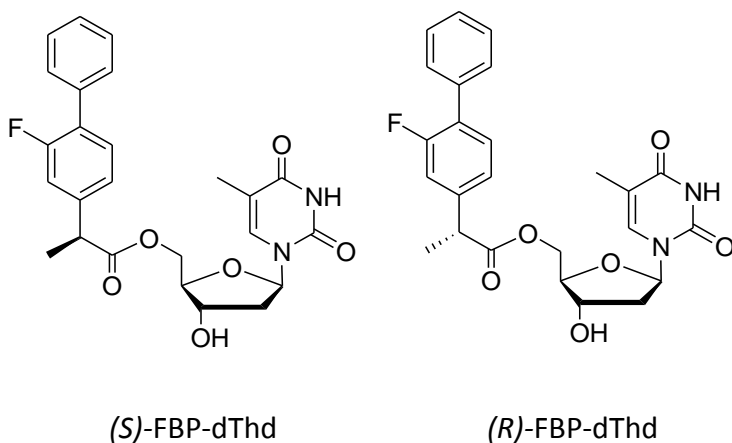


Figura 5.1. Estructura química de las diadas conteniendo FBP y dThd.

Con la finalidad de caracterizar las propiedades de los estados excitados de los sistemas FBP-dThd se han realizado medidas espectroscópicas en estado estacionario y resueltas en el tiempo. Para interpretar correctamente los resultados obtenidos en las diadas, se han comparado con los resultados obtenidos del estudio de mezclas equimolares de los cromóforos aislados (FBP y dThd).

Finalmente, se podría extrapolar el comportamiento de las diadas a los complejos no covalentes FBP/ADN, ya que la excitación en el UVC podría dar lugar a la inyección de carga desde el $^1\text{FBP}^*$ a una timina cercana, y el exceso de electrones podría ser transportado a lo largo de la doble hebra del ADN.²⁸

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Sistemas intermoleculares FBP/dThd

Los espectros de absorción y emisión del FBP están descritos en la bibliografía,¹⁵ aunque también se muestran más adelante. Con respecto a la dThd, sólo están descritos los espectros de absorción y emisión en disolución acuosa;³⁰ por ello se registraron sus espectros de absorción UV (Figura 5.2.A) y de fluorescencia (Figura 5.2.B) en acetonitrilo y agua.

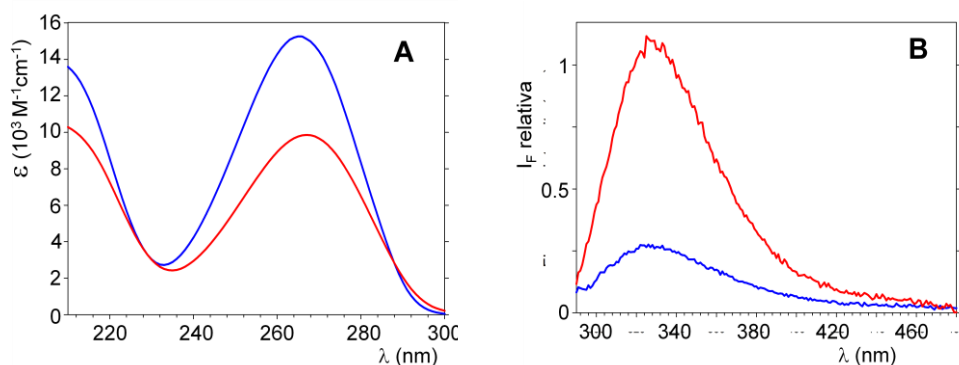


Figura 5.2. A: Espectro de absorción de dThd en MeCN (azul) y agua (rojo). **B:** Espectro de fluorescencia de dThd en MeCN (azul) y de Thy en agua (rojo).

Se obtuvo un valor de coeficiente de absorción molar de la timidina mucho mayor en acetonitrilo que en agua (15.3×10^3 a 265 nm en MeCN comparado con 9.9×10^3 a 267 nm en agua).³⁰ El rendimiento cuántico de fluorescencia de la timidina resultó ser sustancialmente más

bajo en acetonitrilo que en agua (3.0×10^{-5} y 1.5×10^{-4} , respectivamente).

En el espectro de absorción (Figura 5.3.A) se observó como la banda correspondiente a la mezcla equimolar (S)-FBP/dThd correspondió a la suma de los espectros de los cromóforos aislados ((S)-FBP/dThd calc.), lo que indica que no hay interacción en el estado fundamental.

El espectro de fluorescencia (Figura 5.3.B) fue casi idéntico al calculado a partir de la emisión de los cromóforos aislados, teniendo en cuenta los fotones absorbidos por cada cromóforo. Como era de esperar, el rendimiento cuántico de fluorescencia de dThd (3.0×10^{-5}) fue varios órdenes de magnitud más bajo que el de (S)-FBP (0.17). La emisión de la mezcla equimolar (S)-FBP y dThd fue únicamente debida a los fotones absorbidos por FBP, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los estados excitados.

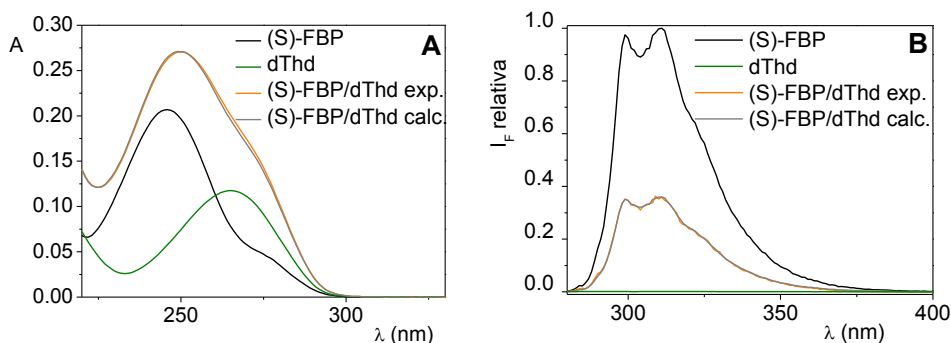


Figura 5.3.A: Espectro de absorción UV en MeCN 2.5×10^{-5} M y **B:** Espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 267$ nm, N_2 , MeCN) de (S)-FBP, dThd, mezcla equimolar (S)-FBP/dThd y la banda calculada teóricamente a partir de los cromóforos aislados.

Se realizaron medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo en las escalas de pico- y nano- segundos de dThd, FBP y la mezcla equimolar en MeCN (22 °C, $\lambda_{exc} = 267$ nm); las medidas se registraron a 310 nm ya que es el máximo de emisión de fluorescencia del FBP.

Las cinéticas de desaparición de dThd en disolución acuosa están descritas en la bibliografía,²⁹ siendo muy rápidas (tiempo de vida inferior a 1 picosegundo) y dependientes de la longitud de onda de emisión; esto es debido a una fuerte desactivación intramolecular no radiativa. La cinética de desaparición de dThd en MeCN registrada mediante FU a escala de femtosegundos fue, del mismo modo, ultrarrápida, y pudo ser descrita como una función biexponencial con tiempos de vida de 0.25 y 1.65 ps. El tiempo de vida del singlete de FBP resultó ser mucho más largo, de acuerdo con el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia. Se encontró que las cinéticas de desaparición dependían de la longitud de onda de emisión (Figura 5.4).

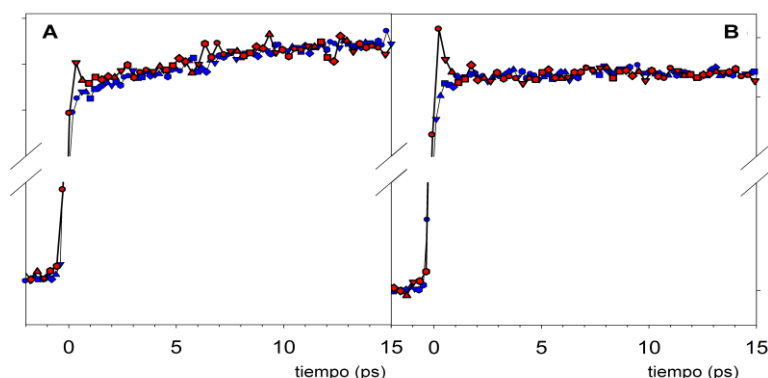


Figura 5.4. Cinéticas de desaparición de fluorescencia de (*S*)-FBP (azul) y (*S*)-FBP/dThd en MeCN (20 °C, $\lambda_{exc} = 257$ nm) a **A:** $\lambda_{em} = 310$ nm y **B:** $\lambda_{em} = 330$ nm.

Se observó como la curva correspondiente a la mezcla equimolar a 310 nm aumentaba instantáneamente antes de experimentar una desaparición ultrarrápida a un valor constante (Figura 5.4.A). Esto está de acuerdo con la superposición de la fluorescencia de dThd y (*S*)-FBP. Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de interacción entre los cromóforos en el estado excitado singlete en la mezcla equimolar.

5.2.2. Comportamiento fotofísico de las diadas FBP-dThd

En la Figura 5.5 se muestra el espectro de absorción UV de las diadas junto con (*S*)-FBP y dThd a la misma concentración. El espectro de las diadas coincidió con la suma de los espectros de (*S*)-FBP y dThd, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

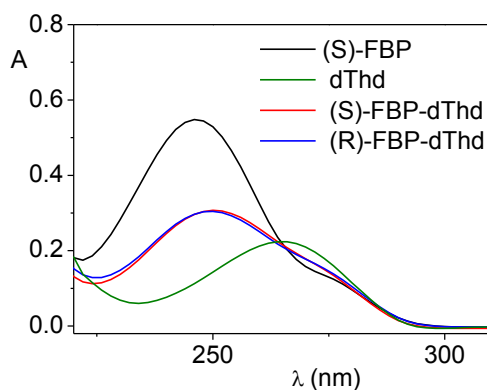


Figura 5.5. Espectro de absorción UV de disoluciones isoabsortivas a 267 nm de (*S*)-FBP, dThd y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd en acetonitrilo.

Los espectros de fluorescencia de las diadas y de (*S*)-FBP registrados a temperatura ambiente (22 °C) se muestran en la Figura 5.6.A. Cabe destacar la desactivación en la emisión de las diadas respecto a la emisión del FBP, siendo éste el cromóforo emisor en ambos casos ($\lambda_{em} = 310 \text{ nm}$)¹⁵ El rendimiento cuántico de fluorescencia de las diadas resultó mayor en dioxano que en acetonitrilo (Tabla 5.1).

En matriz rígida de etanol a 77 K los rendimientos cuánticos de fluorescencia correspondieron a los esperados según la absorbancia relativa del FBP en las diadas (Figura 5.6.B). Este valor resultó mucho mayor que el observado a 22 °C, debido a la ausencia de desactivación de la fluorescencia en las diadas a baja temperatura por la limitación de los grados de libertad que tiene lugar en matriz rígida y que impide la población de las conformaciones requeridas para las interacciones intramoleculares en el estado excitado.

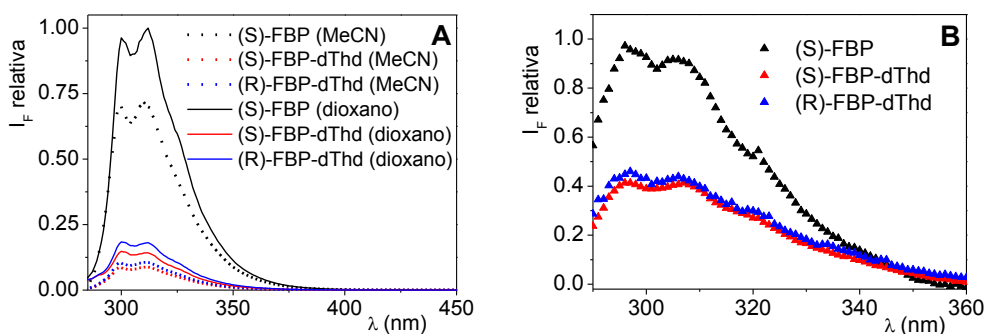


Figura 5.6. Espectro de fluorescencia de disoluciones isoabsortivas a $\lambda_{exc} = 267 \text{ nm}$ de (*S*)-FBP y diadas (*R*)- y (*S*)-FBP-dThd. **A:** A 22 °C en acetonitrilo (línea discontinua) y dioxano (línea continua). **B:** En matriz rígida de etanol a 77 K.

Las cinéticas de desaparición en la escala de femtosegundos fueron registradas a 310 nm mediante la técnica de FU a 22 °C y a $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm (Figura 5.7). En acetonitrilo y observando la zona 0-0.1 ps, las diadas dieron resultados muy similares a los de la mezcla equimolar, caracterizadas por un aumento instantáneo seguido de una desaparición ultrarrápida hasta un valor constante ($\sim 80\%$). La componente ultrarrápida fue característica de la cinética de desaparición de dThd (<1 ps), tanto en el caso de las diadas como de la mezcla equimolar. El posterior nivel constante de emisión fue atribuido a $^1\text{FBP}^*$. Estas observaciones demuestran claramente dos fenómenos diferenciados: (i) la no existencia de una transferencia de energía singlete-singlete desde $^1\text{dThd}^*$ a FBP y (ii) el estado singlete de FBP (bifenilo) como única especie responsable de la emisión residual observada en la fluorescencia en estado estacionario. No se encontraron diferencias entre las dos diadas en la escala de tiempo utilizada.

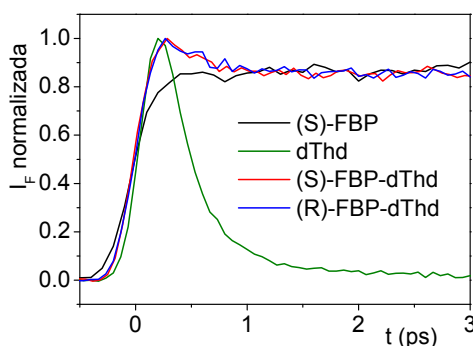


Figura 5.7. Cinéticas de desaparición de fluorescencia a 310 nm de (S)-FBP, dThd y diadas (S)- o (R)- FBP-dThd en acetonitrilo/aire a 22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm en la escala de los picosegundos (FU).

Sin embargo, en la escala de nanosegundos, mediante la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC), ambas diadas mostraron un comportamiento más complejo, tanto en acetonitrilo como en dioxano (Figura 5.8). Mientras que la cinética de desaparición de (*S*)-FBP se ajustó con un único término monoexponencial (1.70 ns en MeCN y 1.80 ns en dioxano), en el caso de las diadas fueron necesarios tres términos monoexponenciales, obteniéndose componentes de ~100 ps, ~300 ps y minoritariamente nanosegundos. La cinética de desaparición del diastereómero (*S*)- resultó más rápida que la correspondiente al (*R*)-, siendo los tiempos de vida promedio ($\langle \tau \rangle = a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2$) de 0.27 y 0.31 ns para (*S*)- y (*R*)- respectivamente (Tabla 5.1), donde $\tau_1 = 0.14$ ns ($a_1 = 0.50$) y $\tau_2 = 0.47$ ns ($a_1 = 0.50$) para el diastereómero (*S*)- y $\tau_1 = 0.18$ ns ($a_1 = 0.84$) y $\tau_2 = 0.70$ ns ($a_1 = 0.16$) para el diastereómero (*R*)-. Las dos componentes rápidas indicaron la presencia de dos tipos de conformaciones con diferentes eficiencias en el mecanismo de desactivación. Se observaron resultados similares en dioxano, aunque con tiempos de vida menores.

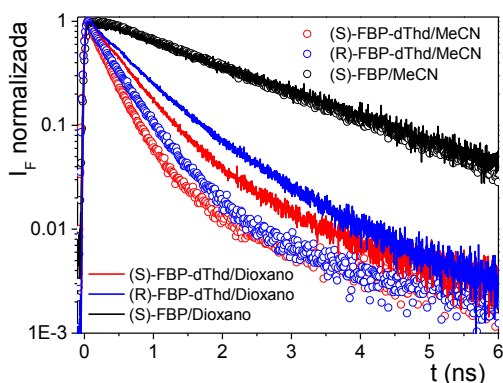


Figura 5.8. Cinéticas de desaparición de fluorescencia a 310 nm de (*S*)-FBP, dThd y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd en acetonitrilo y dioxano/aire a 22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm en la escala de los nanosegundos (TCSPC).

Por otro lado, se compararon las cinéticas de anisotropía de fluorescencia de las diadas (registradas mediante FU) con la de FBP libre (Figura 5.9). Para este último, se observó que la anisotropía desaparecía con un tiempo de alrededor de 30 ps, mientras que en las diadas lo hacía con un tiempo de aproximadamente 45 ps. FBP tiene un volumen molecular de *ca.* 300 Å³, calculado a partir de los incrementos de van der Waals.³¹ Mediante la ecuación de Stokes-Einstein-Debye³² se obtuvo un tiempo de rotación de alrededor de 27 ps, ligeramente más rápido que el observado experimentalmente (30 ps, con $r_0 = 0.32$). Esta desviación pudo ser entendida en términos de la forma no esférica del cromóforo. El volumen total de las diadas FBP-dThd resultó ser de alrededor de 492 Å³, con un tiempo rotacional de aproximadamente 44 ps, valores muy próximos a los obtenidos experimentalmente (45 ps y r_0

= 0.31). El comportamiento monoexponencial y en particular la ausencia de cinéticas de desaparición rápidas a tiempos cortos mostraron que no existía rotación interna entre los dos residuos.

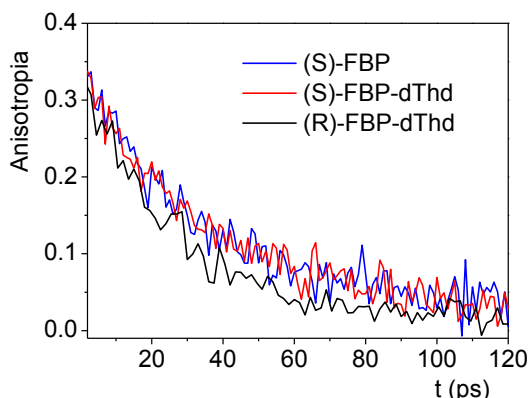


Figura 5.9. Anisotropías de fluorescencia de (*S*)-FBP y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd en acetonitrilo /aire a 22 °C, $\lambda_{exc} = 267$ nm, 1.0×10^{-5} M.

Cuando se realizaron los ensayos de FDL a la longitud de onda de excitación de 266 nm para las diadas (*S*)-FBP-dThd y (*R*)-FBP-dThd, se observó la típica banda de absorción triplete-triplete del FBP (máximo a 360 nm, Figura 5.10). Las señales fueron menos intensas que cuando se irradió el FBP en las mismas condiciones; sin embargo esta intensidad resultó ser mayor que la esperada según los resultados obtenidos de la fluorescencia, lo cual indicó que el estado excitado singlete no era el único precursor del estado excitado triplete de las diadas. Además, el rendimiento cuántico de triplete del estereoisómero (*S*)- resultó ser mayor que el del (*R*)-.

El tiempo de vida de triplete en ambas diadas fue el mismo que el de FBP aislado ($24 \mu\text{s}$)¹⁵, lo que indicó la ausencia de una interacción intramolecular en el estado excitado triplete.

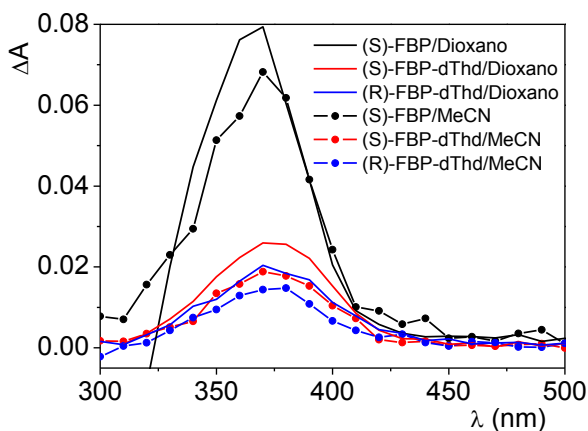


Figura 5.10. Espectro de absorción transitoria triplete-triplete de (*S*)-FBP y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd en acetoneitrilo o dioxano, a 22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, 1.0×10^{-5} M, 1 μs después del pulso del láser.

En cambio, los espectros de fosforescencia de las diadas, obtenidos en matriz rígida de etanol a 77 K (Figura 5.11), mostraron que la emisión correspondía únicamente a la fracción de fotones absorbidos por el cromóforo FBP.

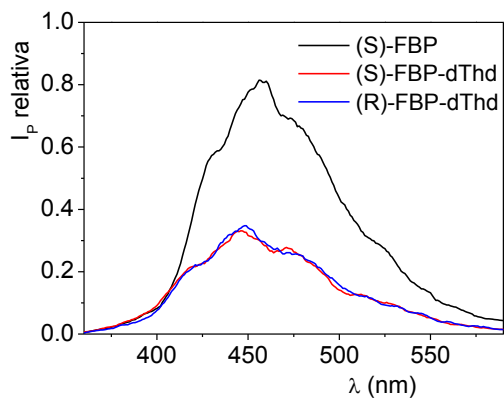


Figura 5.11. Espectro de fosforescencia de (*S*)-FBP y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) en matriz rígida de etanol a 77 K.

En la Tabla 5.1 se recogen las propiedades fotofísicas de (*S*)-FBP y de diadas relacionadas.

	(<i>S</i>)-FBP	(<i>S</i>)-FBP-dThd	(<i>R</i>)-FBP-dThd
Acetonitrilo			
ϕ_F	0.17	0.015	0.018
τ_F^b (ns)	1.70	0.27	0.31
k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	1.00	1.16	1.21
k_D ($\times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$)	---	3.11	2.64
ϕ_D	---	0.402	0.393
ϕ_{CIS}	0.71	0.063	0.075
ϕ_T^c	0.71	0.167	0.126
$\phi_T\phi_{\text{CIS}}$	---	0.104	0.051
Dioxano			
ϕ_F	0.24	0.035	0.044
τ_F^b (ns)	1.80	0.51	0.62
k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	1.33	1.49	1.54
k_D ($\times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$)	---	1.40	1.06
ϕ_D	---	0.329	0.303
ϕ_{CIS}	0.70	0.102	0.127
ϕ_T^c	0.70	0.219	0.167
$\phi_T\phi_{\text{CIS}}$	---	0.117	0.040

Tabla 5.1. Propiedades fotofísicas de (*S*)-FBP y diadas (*S*)- o (*R*)- FBP-dThd a $\lambda_{\text{exc}} = 267 \text{ nm}$.^a

^a En general, los errores fueron menores que la última cifra significativa de los valores indicados. ^b Medidos a 310 nm; para las diadas, los ajustes se realizaron mediante una función triexponencial, los valores indicados corresponden a una media de los tres valores obtenidos. ^c En atmósfera inerte y $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las diadas se determinaron usando (S)-FBP como referencia ($\phi_F = 0.21$ en MeCN/N₂ ó 0.17 en MeCN/aire).¹⁵ El cálculo de ϕ_F se realizó haciendo uso de la ecuación 5.1:

$$\phi_F = \phi_{F(\text{referencia})} \frac{A}{A_{\text{referencia}}} \frac{Abs_{\text{referencia}}}{Abs} \frac{\eta^2}{\eta_{\text{referencia}}^2} \quad (5.1)$$

donde $\phi_{F(\text{referencia})}$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia de (S)-FBP, A es el área bajo la curva de fluorescencia de las diadas, $A_{\text{referencia}}$ es el área bajo la curva de fluorescencia de (S)-FBP, $Abs_{\text{referencia}}$ es la absorbancia de (S)-FBP a la longitud de onda de excitación, Abs es la absorbancia de las diadas a la longitud de onda de excitación y $\eta_{\text{referencia}}$ y η son, respectivamente, los índices de refracción de los disolventes empleados.

En todos los casos, la fluorescencia se desactivó más del 80 %. Se observó diastereodiferenciación en los tiempos de vida de fluorescencia, siendo mucho menores en el caso de las diadas que en el del FBP, indicando una desactivación dinámica.

Los valores de las constantes de fluorescencia (k_F) de las diadas se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 5.2:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \psi \quad (5.2)$$

donde ϕ_F y τ_F corresponden a los valores de rendimiento cuántico y de tiempo de vida de fluorescencia respectivamente y Ψ corresponde a la fracción de fotones absorbida por el FBP ($\Psi = 0.48$ en acetonitrilo y 0.46 en dioxano).

Las constantes de desactivación (k_D) de las diadas se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 5.3:

$$k_D = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(\text{referencia})}} \quad (5.3)$$

donde τ_F y $\tau_{F(\text{referencia})}$ corresponden al valor de tiempo de vida de fluorescencia de diadas y (S)-FBP respectivamente.

Los rendimientos cuánticos de desactivación (ϕ_D) de las diadas se calcularon mediante la ecuación 5.4:

$$\phi_D = \phi_F \frac{k_D}{k_F} \quad (5.4)$$

donde ϕ_F corresponde al valor de rendimiento de fluorescencia, k_D a la constante de desactivación y k_F a la constante de fluorescencia de las diadas.

Los valores de rendimiento cuántico de cruce intersistemas (ϕ_{CIS}) de las diadas se determinaron según la ecuación 5.5:

$$\phi_{CIS} = \phi_F \frac{\phi_{CIS(\text{referencia})}}{\phi_{F(\text{referencia})}} \quad (5.5)$$

donde ϕ_F corresponde al valor de rendimiento de fluorescencia de las diadas y $\phi_{CIS(referencia)}$ y $\phi_{F(referencia)}$ corresponden a los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas y de fluorescencia del (S)-FBP, respectivamente.

Mediante la ecuación 5.6 se obtuvieron los valores de rendimiento cuántico de triplete (ϕ_T) de las diadas:

$$\phi_T = \phi_{T(referencia)} \frac{\Delta A}{\Delta A_{referencia}} \frac{\epsilon_{T(referencia)}}{\epsilon_T} \quad (5.6)$$

donde $\phi_{T(referencia)}$ corresponde al rendimiento cuántico de triplete del (S)-FBP, ΔA y $\Delta A_{referencia}$ corresponden a los máximos de absorción de diadas y (S)-FBP, respectivamente, en el espectro de absorción transitoria a 360 nm. Se asumió que los valores de ϵ fueron iguales para un determinado disolvente al tratarse del mismo cromóforo.

Los valores obtenidos mediante las ecuaciones 5.1 a 5.6 se muestran en la Tabla 5.1.

En principio, el mecanismo de desactivación de la fluorescencia de $^1\text{FBP}^*$ se puede deber a una transferencia de energía, de electrón o formación de un exciplexo. La posibilidad de una transferencia de energía tipo Förster puede ser razonablemente descartada en vista de la sensibilidad de ϕ_D frente a la rigidez del medio (no se encontró desactivación en matriz sólida) y a la polaridad del disolvente (menor eficacia de la desactivación en dioxano que en acetonitrilo).³³ Además, de la estereodiferenciación observada en los valores de ϕ_F y ϕ_T

apoyaban la necesidad de un contacto cercano entre los cromóforos en los procesos implicados.

En cuanto a la viabilidad de la formación de pares de iones radicales o exciplejos desde los estados singlete o triplete, puede ser estimada aplicando las ecuaciones 5.7 y 5.8³⁵

$$\Delta G_{TEI}(\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{dador} - E_{RED}^{acceptor} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \right] - E^* \quad (5.7)$$

$$\Delta G_{EX}(\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{dador} - E_{RED}^{acceptor} - 0.75 \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon-1} - 0.19 \right) + 0.38 \right] - E^* \quad (5.8)$$

teniendo en cuenta los correspondientes potenciales de oxidación (E_{OX}) y reducción (E_{RED}),³⁵⁻³⁸ las constantes dieléctricas apropiadas (ϵ)³⁹ y las energías de singlete o triplete de FBP (E^*),¹⁵ los valores obtenidos de energía libre para la transferencia electrónica (ΔG_{TEI}) o formación de exciplejo (ΔG_{EX}) se muestran en la Tabla 5.2.

Dador/Aceptor	ΔG_{TEI}		ΔG_{EX}	
	S_1	T_1	S_1	T_1
Acetonitrilo				
FBP/dThd	-30.0	+4.0	-25.1	+8.9
dThd/FBP	-2.4	+31.6	+2.5	+36.5
Dioxano				
FBP/dThd	-5.0	+29.0	-22.7	+11.2
dThd/FBP	+22.7	+56.7	+4.9	+38.9

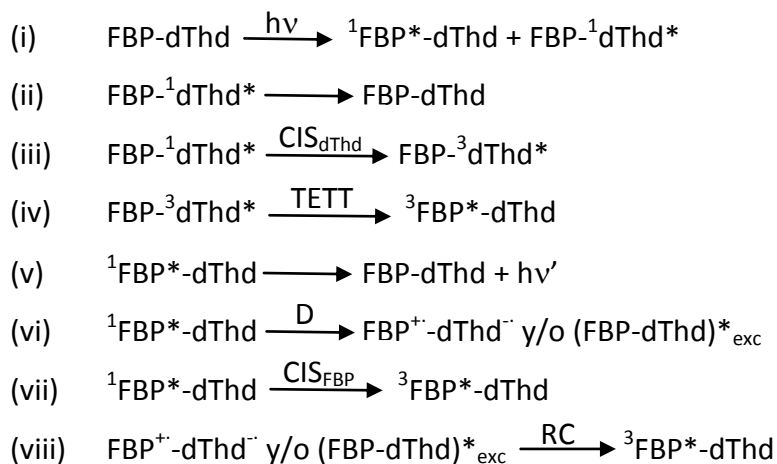
Tabla 5.2. Variación de energía libre de Gibbs (en kcal mol⁻¹) asociadas con la transferencia electrónica o formación de excíplejos en sistemas FBP*/dThd.

En general, la transferencia de carga sólo se encontró favorecida desde el estado excitado singlete de FBP como dador, y la desactivación de la fluorescencia podía ser debida tanto a transferencia electrónica como formación de excíplejo, estando favorecida la formación de excíplejo en dioxano. Por el contrario, ³FBP* no reacciona en ningún disolvente, según indica la carencia de desactivación dinámica observada en los experimentos de FDL. Este hecho estuvo de acuerdo con los cálculos termodinámicos, donde se obtuvieron valores de ΔG positivo para la transferencia electrónica o formación de excíplejo desde el estado excitado triplete (Tabla 5.2).

Otro punto de interés fue el origen del triplete de FBP. Su rendimiento cuántico (ϕ_T), determinado a partir de los experimentos de FDL, resultó ser significativamente mayor que ϕ_{CIS} . La generación del triplete podría ocurrir a través de varios caminos: a) cruce intersistemas

desde S_1 , b) transferencia de energía triplete-triplete desde $^3dThd^*$ o c) recombinación de carga de los pares de iones radicales o exciplejos posiblemente resultantes de la desactivación del estado excitado singlete. Como ϕ_T resultó ser mayor que ϕ_{CIS} , el camino a) no podía ser la única ruta operativa. La contribución del camino b) era posible ya que E_T ($dThd$) era *ca.* 9 kcal mol^{-1} mayor que la E_T (FBP); sin embargo, conociendo los valores de ϕ_{CIS} de la $dThd$ (del orden de 10^{-2}) este proceso no explicaría los valores de ϕ_T observados, al menos para la diada (*S*)-FBP- $dThd$. Por lo tanto, el camino c) parecía ser más probable, y su contribución fue claramente más importante para el isómero (*S*)- que para el (*R*)-.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las medidas fotofísicas y de los cálculos descritos, las principales vías de desactivación que podían tener lugar tras excitación de una diada conteniendo covalentemente unidos FBP y $dThd$ se recogen en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1. Principales vías de desactivación de las diadas FBP-dThd.

Como se observa en el esquema, tras irradiación a 267 nm (i) se alcanza el primer estado excitado singlete, bien del FBP o de la dThd, ya que ambas especies absorben luz a esa longitud de onda, según sus espectros UV-vis (Figura 5.3). A continuación puede producirse una transferencia de energía singlete-singlete (TESS) desde ${}^1\text{dThd}^*$ ($E_S = 100 \text{ kcal mol}^{-1}$)³⁸ a FBP ($E_S = 99 \text{ kcal mol}^{-1}$),¹⁵ la cual está termodinámicamente favorecida pero cinéticamente descartada, en vista de las cinéticas ultrarrápidas observadas en la Figura 5.7. La desactivación desde ${}^1\text{dThd}^*$ tiene lugar mediante un proceso intramolecular no radiante de alta eficacia⁴⁰ y está representada en (ii) o, en menor medida, cruce intersistemas⁴¹ (iii). La transferencia de energía triplete-triplete (TETT) desde ${}^3\text{dThd}^*$ ($E_T = 74 \text{ kcal mol}^{-1}$)^{22,23} a FBP ($E_T = 65 \text{ kcal mol}^{-1}$),¹⁵ que es termodinámicamente posible, queda

indicada en la ruta (iv). La emisión de fluorescencia desde $^1\text{FBP}^*$ está representada en (v) y la desactivación intramolecular (D) desde el primer estado excitado singlete del FBP para dar lugar a la formación de exciplejos o a un par de iones radicales, queda reflejado en (vi). La ruta (vii) corresponde al cruce intersistemas de FBP. Finalmente, la recombinación de carga (RC) desde el par de iones radicales o exciplejos permite alcanzar así el primer estado excitado triplete de FBP (ruta (viii)).

5.3. Conclusiones

Las interacciones entre los estados excitados de los cromóforos FBP y dThd se observan sólo cuando ambos se encuentran covalentemente unidos. No tiene lugar interacciones intermoleculares en la mezcla equimolar, ni en el estado fundamental ni en los estados excitados. En las diadas FBP-dThd, la única especie que emite es $^1\text{FBP}^*$, con un rendimiento cuántico y un tiempo de vida menores que los de FBP aislado. Las variaciones de energía libre, calculadas mediante las ecuaciones de Rhem-Weller, indican que la desactivación dinámica puede ocurrir por transferencia electrónica o formación de exciplexo, siendo FBP la especie dadora de carga. En acetonitrilo, ambos mecanismos están favorecidos, mientras que en dioxano predomina la formación de exciplexo. En todos los casos, la desactivación requiere interacción a distancias cortas, por lo que la organización espacial relativa de los cromóforos juega un papel importante. El isómero (*S*)- exhibe valores más bajos de ϕ_F y τ_T que el isómero (*R*)-. Como observación general, el rendimiento cuántico de triplete (ϕ_T) determinado en las diadas es mayor que el esperado para el rendimiento cuántico de cruce intersistemas (ϕ_{CIS}) de $^1\text{FBP}^*\text{-dThd}$ teniendo en cuenta la fracción de luz absorbida por FBP. Este hecho se puede explicar mediante la recombinación de carga intramolecular desde el par de iones radicales y/o exciplejos. De nuevo este proceso es mucho más importante en el caso del isómero (*S*)- que en caso del isómero (*R*)-. Los tiempos de vida de triplete (τ_T) de las diadas son

similares al de FBP libre, indicando la ausencia de una interacción entre los cromóforos en el estado excitado triplete. Este hecho está de acuerdo con los cálculos termodinámicos, donde se obtiene un valor de ΔG positivo para la transferencia electrónica o formación de exciplejos desde el estado excitado triplete.

En principio, las diadas FBP-dThd podrían ser modelos apropiados para anticipar la naturaleza de las interacciones entre los estados excitados de FBP y ADN en complejos no covalentes. Así, tras excitación en el UVC, $^1\text{FBP}^*$ resultante podría inyectar carga negativa a una timina cercana, y el exceso de electrones podría viajar a través de la doble hélice de ADN, alcanzando una base distante o eventualmente reparando lesiones de tipo bipyrimidina.⁴²⁻⁴⁵

5.4. Parte experimental

5.4.1. Reactivos y disolventes

(*S*)- y (*R*)-flurbiprofeno, timidina, EDC (hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y piridina fueron adquiridos de Aldrich. Los disolventes utilizados (hexano, diclorometano y metanol) fueron de grado analítico y adquiridos de Scharlau. El acetonitrilo, dioxano y el etanol absoluto utilizados fueron de grado HPLC y adquiridos de Scharlau.

5.4.2. General

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) se realizaron usando metanol deuterado (CD₃OD) tomando como referencia la señal correspondiente al metanol a 3.3 ppm (quintuplete).

La purificación de los productos se llevó a cabo por columna cromatográfica de gel de sílice 60 con tamaño de partícula entre 0.063 y 0.200 mm de Merck, usando una mezcla hexano/metanol como eluyente.

5.4.3. Medidas de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario a temperatura ambiente (22 °C) se realizaron purgando la disolución durante 20 minutos con N₂. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario a 77 K se realizaron en tubos de cuarzo que se introdujeron en nitrógeno líquido antes de medir. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.3.

Para determinar el valor de los rendimientos cuánticos de fluorescencia se utilizó FBP en MeCN como referencia, con valores de ϕ_F = 0.17 en aire y 0.21 en nitrógeno.

Los espectros de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron en el Laboratoire Francis Perrin (CNRS/IRAMIS/SPAM) CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette, Francia. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas de FU se realizaron en una celda de cuarzo 0.4 mm y las de TCSPC en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C) y en condiciones aeróbicas.

5.4.4. Medidas de fotólisis de destello láser

Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm, con una potencia de 10 mJ por pulso de láser. Las disoluciones fueron purgadas durante 30 minutos con N₂ antes de la realización del experimento. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.2. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

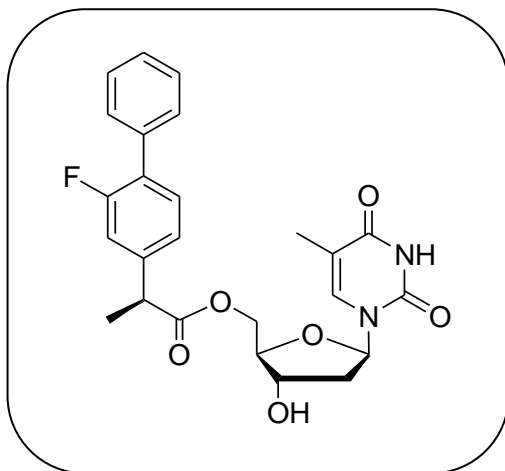
5.4.5. Medidas de fosforescencia

Las medidas se realizaron en tubos de cuarzo que se introdujeron en nitrógeno líquido antes de medir. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.3. Las disoluciones se prepararon en etanol.

5.4.6. Síntesis de las diadas

Sobre una mezcla de (*S*) o (*R*)- flurbiprofeno (1.19 mmol) y timidina (1.23 mmol) disueltos en piridina anhidra (2 mL) a 0 °C, se añadió poco a poco EDC (1.19 mmol). Se dejó agitar a esa temperatura durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la piridina fue eliminada en bomba de vacío. El crudo resultante fue disuelto en diclorometano (DCM) (20 mL), lavado con NaHCO₃ (1 M) y secado con MgSO₄. El disolvente orgánico fue eliminado en un rotavapor y, finalmente, se realizó una purificación por columna cromatográfica usando una mezcla hexano/metanol 10%.

5.4.7. Caracterización de las diadas



5'-(S)-[(2-fluoro[1,1'-bifenil]-4-yl)propanoate]-timidina, (S)-FBP-dThd.

Rendimiento: 70%.

Aspecto físico: polvo blanco.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 250 (4.1).

Espectro de IRTF ν (cm^{-1}): 3420 (br), 1721, 1655, 1480, 1418, 1267, 1174, 767, 697.

Espectro de RMN-¹H (CD_3OD) δ (ppm): 1.43 (d, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.72 (d, 3H, $J = 1.2\text{Hz}$), 1.81-1.90 (m, 1H), 2.09-2.17 (m, 1H), 3.80 (q, 1H, $J = 7.1$

Hz), 3.97-4.01 (m, 1H), 4.16-4.21 (m, 2H), 4.32 (dd, 1H, $J = 12.0$, $J = 6.0$ Hz), 6.08 (dd, 1H, $J = 8.1$, $J = 6.0$ Hz), 7.02-7.11 (m, 2H), 7.23-7.41 (m, 7H).

Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) δ (ppm): 11.5, 17.6, 39.5, 45.0, 64.4, 71.4, 85.0, 85.5, 110.3, 114.9+115.2, 123.6+123.7, 127.6, 128.0+128.1, 128.3, 128.6, 128.7, 130.9, 135.4, 136.1, 142.3+142.4, 150.9, 158.1+161.4, 165.1, 173.9.

HRMS para C₂₅H₂₆FN₂O₆ (MH⁺): calculada 469.1775, encontrada: 469.1773.

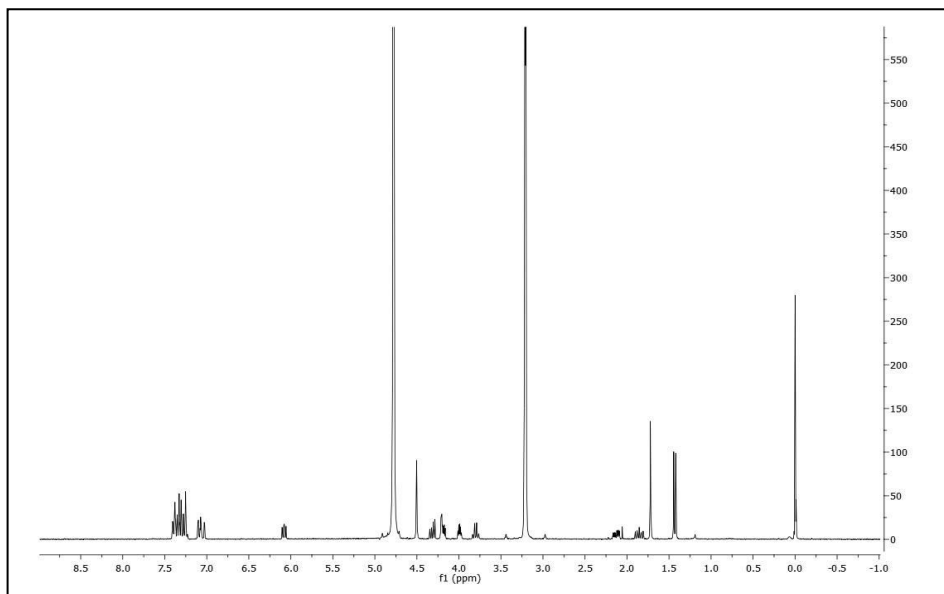


Figura 5.12. Espectro de RMN- ^1H de la diada (S) -FBP-dThd, (CD_3OD).

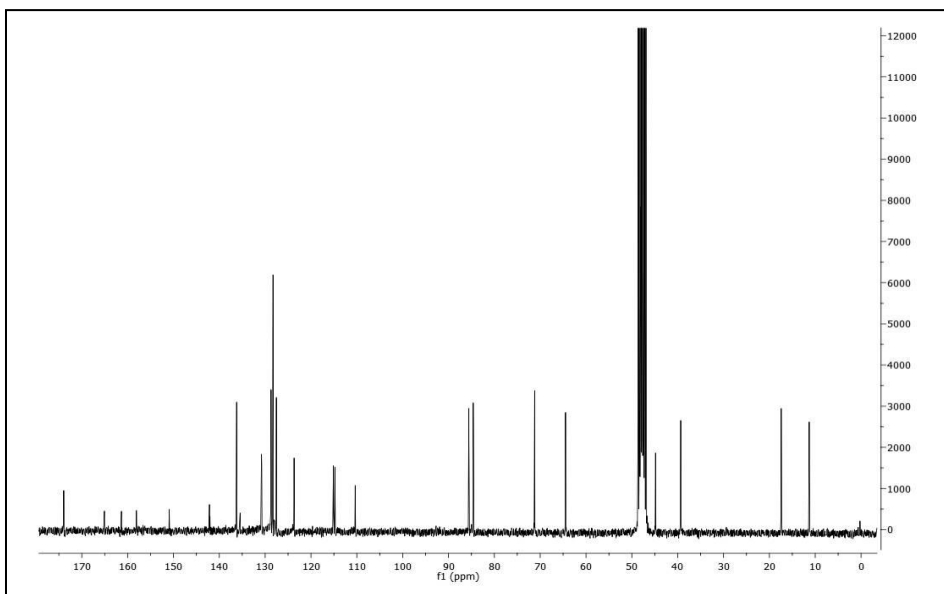
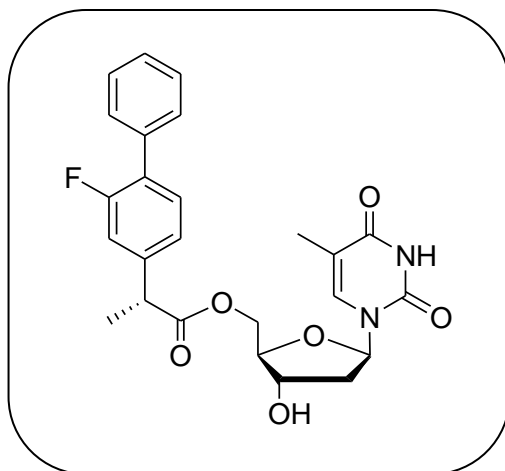


Figura 5.13. Espectro de RMN- ^{13}C de la diada (S) -FBP-dThd, (CD_3OD).



5'-(R)-[(2-fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)propanoil]-timidina, (R)-FBP-dThd.

Rendimiento: 70%.

Aspecto físico: polvo blanco.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}$ /nm (log ϵ): 250 (4.1).

Espectro de IRTF ν (cm^{-1}): 3422 (br), 1720, 1656, 1475, 1418, 1272, 1172, 768, 698.

Espectro de RMN- ^1H (CD_3OD) δ (ppm): 1.43 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.55-1.64 (m, 1H), 1.81 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.97-2.05 (m, 1H), 3.77 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.96-3.99 (m, 1H), 4.05-4.09 (m, 1H), 4.14 (dd, 1H, $J = 12.2$, $J =$

3.1Hz), 4.39 (dd, 1H, $J = 12.2$, $J = 5.1$ Hz), 6.06 (dd, 1H, $J = 8.1$, $J = 6.0$ Hz), 7.00-7.08 (m, 2H), 7.23-7.40 (m, 7H).

Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) δ (ppm): 11.3, 17.4, 39.3, 44.8, 64.5, 71.2, 84.6, 85.6, 110.4, 114.8+115.1, 123.6+123.7, 127.6, 127.9+128.1, 128.3, 128.6, 128.7, 130.8, 135.4, 136.2, 142.1+142.2, 151.0, 158.1+161.4, 165.1, 173.9.

HRMS para C₂₅H₂₆FN₂O₆ (MH⁺): calculada 469.1775, encontrada: 469.1766.

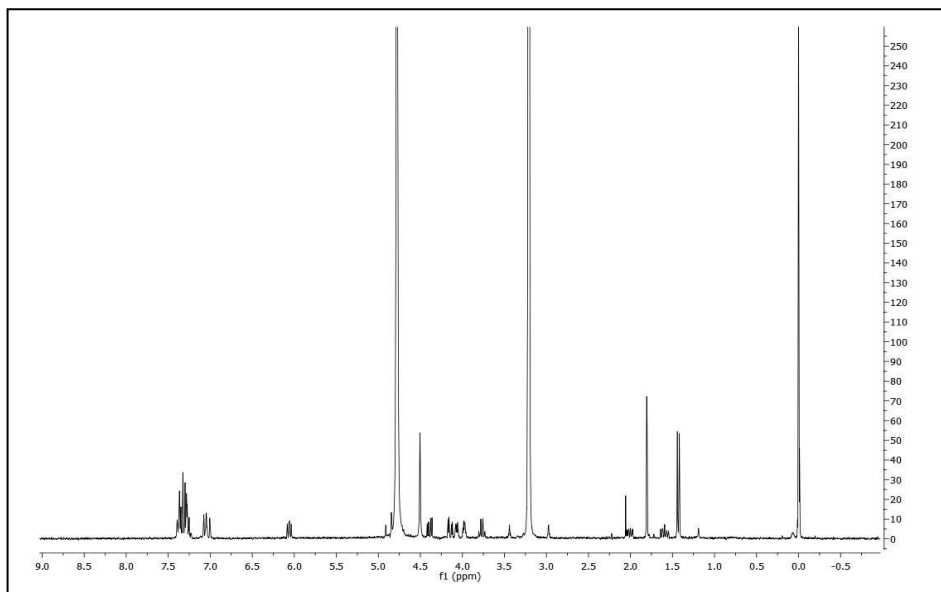


Figura 5.14. Espectro de RMN- ^1H de la diada (*R*)-FBP-dThd, (CD_3OD).

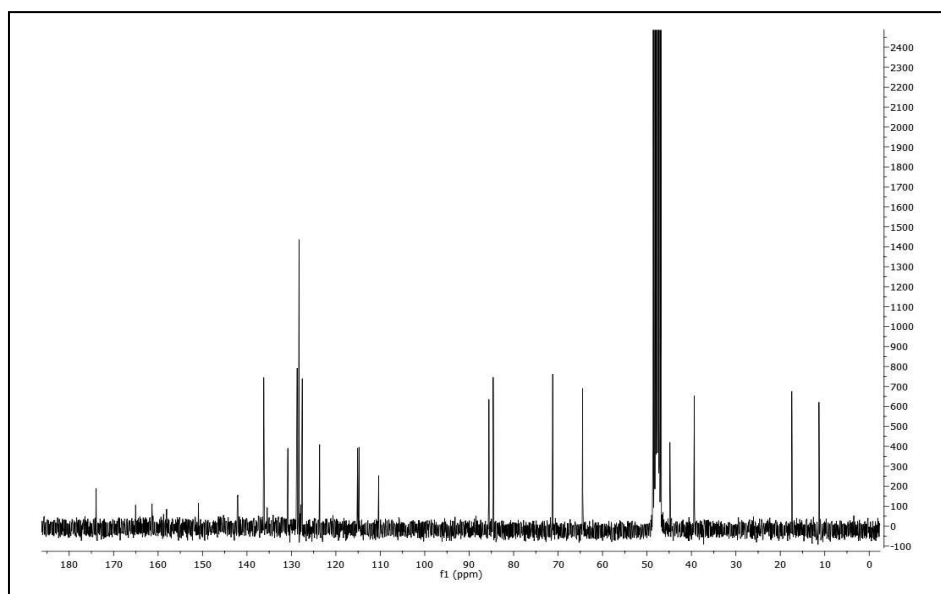


Figura 5.15. Espectro de RMN- ^{13}C de la diada (*R*)-FBP-dThd, (CD_3OD).

5.5. Referencias bibliográficas

1. C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977.
2. C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernandez, B. Kohler, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217.
3. T. Gustavsson, R. Improta, D. Markovitsi, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025.
4. D. Markovitsi, T. Gustavsson, I. Vaya, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3271.
5. M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, F. Boscá, M. A. Miranda, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1219.
6. A. Osterlind, *Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *72*, 67.
7. H. Soehnge, A. Ouhtit, H. N. Ananthaswamy, *Front. Biosci.* **1997**, *2*, 538.
8. S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13765.
9. A. Bayanz, I. Vayá, P. Changenet-Barret, T. Gustavsson, T. Douki, D. Markovitsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5163.
10. J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, P. Di Mascio, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 903.
11. N. Chouini-Lalanne, M. Defais, N. Paillous, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 441.
12. M. C. Marguery, N. Chouini-Lalanne, J. C. Ader, N. Paillous, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 679.

13. P. M. Brooks, R. O. Day, *N. Engl. J Med.* **1991**, 324, 1716.
14. A. M. Evans, *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, 36, 7S.
15. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 1038.
16. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, 1, 1015.
17. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10134.
18. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2694.
19. C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6861.
20. R. Pérez-Ruiz, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 829.
21. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11284.
22. F. Boscá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6318.
23. V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, F. Boscá, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 7409.
24. M. C. Jiménez, S. E. Stiriba, R. Tormos, J. Pérez-Prieto, M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 36.
25. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 9363.

26. M. C. Jiménez, U. Pischel, M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. C: Rev.* **2007**, 8, 128.
27. I. Vayá, R. Pérez-Ruiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, 486, 147.
28. H. A. Wagenknecht, Principles and Mechanisms of Photoinduced Charge Injection, Transport, and Trapping in DNA, in: Charge Transfer in DNA, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2005**, pp. 1.
29. T. Gustavsson, A. Sharonov, D. Markovitsi, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 351, 195.
30. D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, T. Gustavsson, *J. Phys. Chem. B.* **2002**, 106, 11367.
31. J. T. Edward, *J. Chem. Ed.* **1970**, 47, 261.
32. J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3d ed., Springer-Verlag, New York, **2006**.
33. S. Speiser, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1953.
34. A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93.
35. E_{OX} (bifenilo) = 1.95 V, tomado de: P. B. Merkel, P. Luo, J. P. Dinnocenzo, S. Farid, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5163.
36. E_{RED} (timidina) = -1.10 V, tomado de: S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4101.
37. E_{OX} (timidina) = 1.70, tomado de: D. A. Vivic, D. T. Odom, M. E. Núñez, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8603.

38. E_{RED} (bifenilo) = -2.55 V, tomado de: S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, **1993**.
39. Los valores de las constantes dieléctricas son 37.5 (MeCN) y 2.25 (dioxano), tomadas de: *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition; CRC Press: Boca Raton, FL, **2004**.
40. T. Gustavsson, A. Banyasz, E. Lazzarotto, D. Markovitsi, G. Scalmani, M. J. Frisch, V. Barone, R. Improta, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 607.
41. J. J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 11880.
42. D. Fazio, C. Trindler, K. Heil, C. Chatgialloglu, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 206.
43. M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 2056.
44. S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1302.
45. B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1848.

Capítulo 6

Sistemas modelo
bifenilo-triptófano

6.1. Introducción

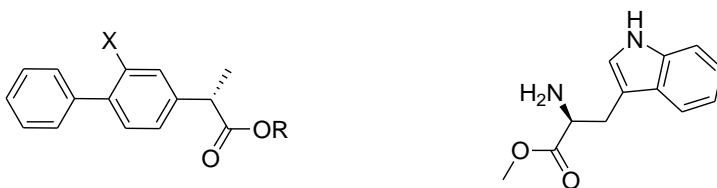
Flurbiprofeno (FBP) [ácido 2-(2-fluoro-1,1'-bifenil-4-il)propanoico] es un antiinflamatorio no esteroideo de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Posee actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Se utiliza para el tratamiento de diversos procesos, como son la inflamación y el dolor causado por la artritis reumatoide,¹ osteoartritis² y daños leves en los tejidos (tendinitis y bursitis),³ prevención de migrañas,⁴ tratamiento de quemaduras en la piel,⁵ etc. Desde el punto de vista fotoquímico, FBP presenta dos características importantes: contiene un cromóforo bifenilo, cuyas propiedades fotofísicas vienen descritas en la literatura⁶ y posee un carbono asimétrico en la parte α -arilpropiónica, que resulta apropiado para el estudio de una posible estereodiferenciación en los procesos de los estados excitados.

BPOH [ácido 2-(2-hidroxi-1,1'-bifenil-4-il)propanoico] es el principal fotoproducto del flurbiprofeno en medio acuoso, y se puede considerar estructuralmente relacionado con el principal metabolito de FBP [ácido 2-(2-fluoro-4'-hidroxi-4-bifenil)propanoico].⁷ Contiene un cromóforo bifenilo y la presencia de un sustituyente hidroxilo produce un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción (por encima de 300 nm), con posibles implicaciones fotobiológicas. Además, siendo un fenol, es de esperar que presente una mayor acidez en su primer estado excitado singlete (S_1) que en el estado fundamental ($pK_a^* > pK_a$).⁸ Otro aspecto interesante es que presenta un centro quiral que

permite estudiar una posible estereodiferenciación en los procesos en que participa.

Los compuestos bicromofóricos que incorporan dos residuos fotoactivos son modelos útiles para investigar en profundidad los aspectos mecanísticos de los procesos inducidos por la luz. En este contexto, son muy útiles para el estudio de la transferencia de energía, de electrón o de protón intramolecular, así como de la formación de exciplexo y la reactividad fotoquímica. En el pasado, estos procesos han sido estudiados en una gran variedad de sistemas, incluyendo diadas conteniendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) unidos covalentemente a subestructuras de proteínas o ADN (como aminoácidos o nucleósidos).⁹ En concreto, como se describe en la introducción general, se han utilizado diadas conteniendo AINES y Trp, como herramientas para proporcionar información relevante en las interacciones fármaco/proteína.^{10,11,12}

El objetivo del presente capítulo es investigar los procesos fotofísicos que ocurren en diadas conteniendo un derivado del bifenilo y triptófano covalentemente unidos. En la Figura 6.1 se muestran las estructuras de los compuestos estudiados.

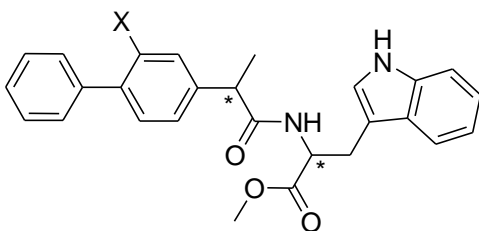


X = F, R = H \longrightarrow (*S*)-FBP

X = OH, R = H \longrightarrow (*S*)-BPOH

X = OH, R = CH₃ \longrightarrow (*S*)-BPOHMe

(*S*)-TrpMe



X = F \longrightarrow (*S,S*)- o (*R,S*)-FBP-Trp

X = OH \longrightarrow (*S,S*)- o (*S,R*)-BPOH-Trp

Figura 6.1. Estructura química de los compuestos estudiados conteniendo cromóforos bifenilo y triptófano.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Diadas FBP-Trp

Como se ha visto en la introducción general, el fenómeno más importante observado en los espectros de fluorescencia de las diadas FBP-Trp fue que en ambas se produjo una desactivación casi total de la emisión, que consistió en una banda de baja intensidad atribuida al $^1\text{Trp}^*$, con rendimientos cuánticos de 0.028 y 0.015 para las diadas (*S,S*)- y (*R,S*)-FBP-Trp, respectivamente (Figura 1.21 de la introducción general). Además, al normalizar los espectros, se detectó la aparición de una nueva banda centrada a 450 nm, especialmente para la diada (*R,S*)-FBP-Trp, asignada a la formación de un exciplexo.¹⁰

Para investigar las cinéticas de transferencia de energía singlete-singlete desde $^1\text{FBP}^*$ a Trp, se registraron las cinéticas de desaparición mediante FU a 310 nm (emisión de FBP), tras excitación a 267 nm (Figura 6.2). Se observó una notable desactivación en las diadas, con tiempos de vida de fluorescencia de 53.4 y 29.6 ps para (*S,S*)- y (*R,S*)-FBP-Trp, respectivamente, comparados con τ_f (FBP) = 1.67 ns. Estos datos reflejaban una TESS intramolecular desde $^1\text{FBP}^*$ a Trp.

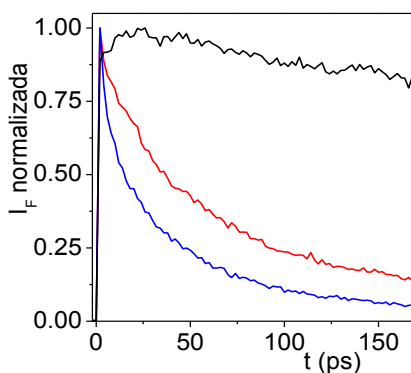


Figura 6.2: Cinéticas de desaparición de fluorescencia a 310 nm de (*S*)-FBP y de las diadas (*S,S*)- y (*R,S*)-FBP-Trp en acetonitrilo/aire a $\lambda_{exc} = 267$ nm en la escala de los picosegundos (FU).

También se registraron las cinéticas de desaparición mediante TCSPC a 340 nm (emisión de TrpMe), tras excitación a 267 nm (Figura 6.3). Se observó, del mismo modo que en el caso anterior, una marcada desactivación en las diadas, atribuida a transferencia electrónica y/o formación de exciplexo, estando ambos procesos termodinámicamente permitidos según la ecuación de Rhem-Weller.

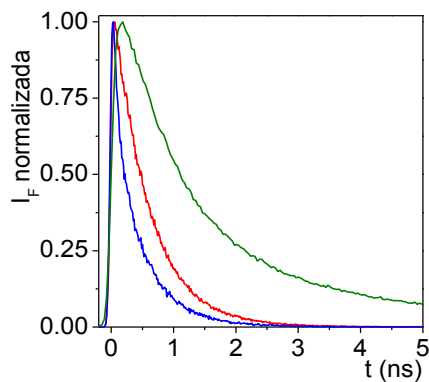


Figura 6.3: Cinéticas de desaparición de fluorescencia a 340 nm de (*S*)-TrpMe, y de las diadas (*S,S*)- y (*R,S*)-FBP-Trp en acetonitrilo/aire a $\lambda_{exc} = 267$ nm en la escala de los nanosegundos (TCSPC).

A partir de los tiempos de vida de fluorescencia se calcularon las correspondientes constantes (Tabla 6.1) para los procesos de transferencia de energía singlete-singlete intramoleculares y de desactivación en las diadas FBP-Trp.

	τ_F (ps) ^a	$k_{TESS} \times 10^{10}$	τ_F (ps) ^{b,c}	$k_D \times 10^9$
(S)-FBP	1670 ^c	-	-	
(S)-TrpMe	2100 ^c	-	1350	
(S,S)-FBP-Trp	53.4 ^d	1.8	460	1.4
(R,S)-FBP-Trp	29.6 ^d	3.3	230	3.6

Tabla 6.1: Parámetros cinéticos de (S)-FBP, (S)-TrpMe, y de las diadas (S,S)- y (R,S)-FBP-Trp en acetonitrilo/aire a $\lambda_{exc} = 267$ nm.

^a $\lambda_{em} = 310$ nm; ^b $\lambda_{em} = 340$ nm; ^cTCSPC; ^dFU

Las constantes de desactivación (k_D) de las diadas se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 6.1:

$$k_D = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(referencia)}} \quad (6.1)$$

donde τ_F y $\tau_{F(referencia)}$ corresponden a los tiempos de vida de fluorescencia de diadas y (S)-TrpMe respectivamente.

Las constantes de transferencia de energía singlete-singlete (k_{TESS}) se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 6.2:

$$k_{TESS} = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(referencia)}} \quad (6.2)$$

donde τ_F y $\tau_{F(referencia)}$ corresponde al valor de tiempo de vida de fluorescencia de diadas y (S)-FBP respectivamente.

Estos valores reflejaron una estereoselectividad significativa en los procesos implicados.

6.2.2. Diadas BPOH-Trp

El espectro de absorción UV de la diada (*S,S*)-BPOH-Trp se muestra en la Figura 6.4 junto con (*S*)-FBP y (*S*)-BPOH como referencias. Se pudo observar como la sustitución del flúor por el grupo hidroxilo indujo un desplazamiento batocrómico. Los espectros de los dos diastereómeros, (*S,S*)- y (*S,R*)-BPOH-Trp, resultaron ser coincidentes e idénticos al que correspondería a la suma de los espectros de (*S*)-BPOH y TrpMe aislados a la misma concentración, indicando la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

A la longitud de onda de 267 nm se observó que cerca del 46% de la luz era absorbida por el cromóforo hidroxibifenilo, mientras que el 54% restante era absorbido por el cromóforo indol del triptófano.

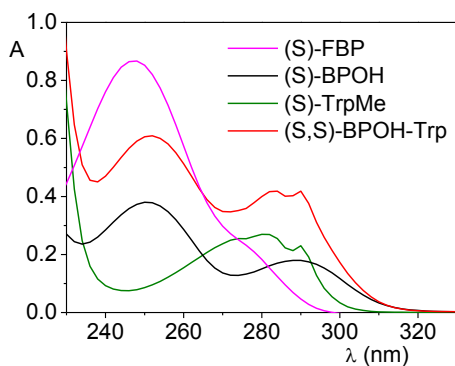


Figura 6.4. Espectro de absorción UV de disoluciones 5×10^{-5} M de (S)-FBP, (S)-BPOH, (S)-TrpMe y diada (S,S)-BPOH-Trp en acetonitrilo.

Los espectros de fluorescencia de las diadas BPOH-Trp y de (S)-BPOH se muestran en la Figura 6.5.

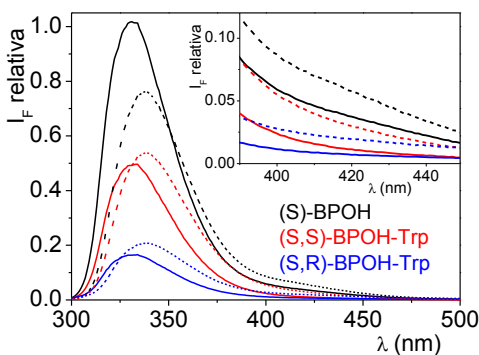


Figura 6.5. Espectros de fluorescencia de (S)-BPOH y de las diadas (S,S)- y (S,R)-BPOH-Trp en MeCN (líneas continuas) y MeCN/agua 4:1 (líneas discontinuas), en aire a $\lambda_{exc} = 267$ nm. La absorbancia de todas las disoluciones se mantuvo a 0.2 a la longitud de onda de excitación.

Los espectros de fluorescencia consistieron en una banda centrada a *ca.* 330 nm. En las diadas, aunque ambos cromóforos absorbían luz a la longitud de onda de excitación, no se observó contribución del residuo de Trp en los espectros de fluorescencia, éstos, fueron coincidentes en forma y posición que BPOH. A partir de la intersección entre los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 267$ nm) y excitación ($\lambda_{em} = 330$ nm) normalizados, se determinaron los valores de la energía de singlete de (*S*)-BPOH y de las diadas (*S,S*)- o (*S,R*)-BPOH-Trp a partir de la intersección entre los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 266$ nm) y excitación ($\lambda_{em} = 330$ nm) normalizados (Figura 6.6). En todos los casos se obtuvo una E_S de *ca.* 91 kcal mol⁻¹.

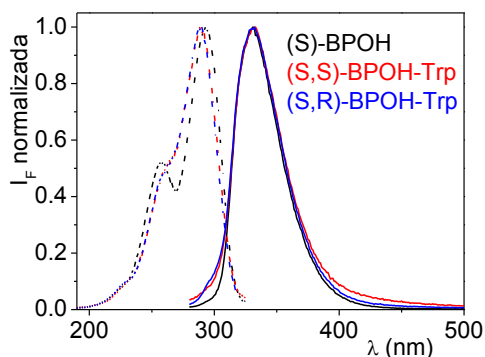


Figura 6.6. Espectros de fluorescencia (líneas continuas) y de excitación (líneas discontinuas) de (*S*)-BPOH y de las diadas (*S,S*)- y (*S,R*)-BPOH-Trp en MeCN. Las medidas se realizaron en aire a $\lambda_{exc} = 267$ nm y $\lambda_{em} = 330$ nm.

El fenómeno más importante observado en los espectros de fluorescencia fue que en ambas diadas se produjo una desactivación

casi total de la emisión que resultó ser estereoselectiva. Como la TESS desde (*S*)-BPOH ($E_S = 91 \text{ kcal mol}^{-1}$) a Trp ($E_S = 96 \text{ kcal mol}^{-1}$) estaba termodinámicamente prohibida, la desactivación observada fue atribuida a transferencia electrónica o formación de un posible exciplejo. Para estudiar la viabilidad de estos dos procesos, se aplicaron las ecuaciones 6.3 y 6.4:¹³

$$\Delta G_{TEI} (\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{dador} - E_{RED}^{aceptor} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \right] - E^* \quad (6.3)$$

$$\Delta G_{EX} (\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{dador} - E_{RED}^{aceptor} - 0.75 \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon-1} - 0.19 \right) + 0.38 \right] - E^* \quad (6.4)$$

Teniendo en cuenta los correspondientes potenciales de oxidación (E_{OX}) y reducción (E_{RED}),^{14,15,16,17} las constantes dieléctricas apropiadas (ϵ)¹⁸ y la energía de singlete de (*S*)-BPOH (E^*). Para ambos procesos se obtuvieron valores de energía libre negativos, que indicaron que tanto la transferencia electrónica como la formación de exciplejo podían tener lugar. Estos procesos son más probables en conformaciones plegadas, donde se requiere un estrecho contacto entre las moléculas de dador y aceptor. De hecho, el diastereómero (*S,R*)-mostró una conformación plegada en el estado sólido como se muestra en la estructura de rayos-X de la Figura 6.7. Además, la desactivación de la intensidad de fluorescencia resultó ser mayor para este diastereómero que para el (*S,S*)-.

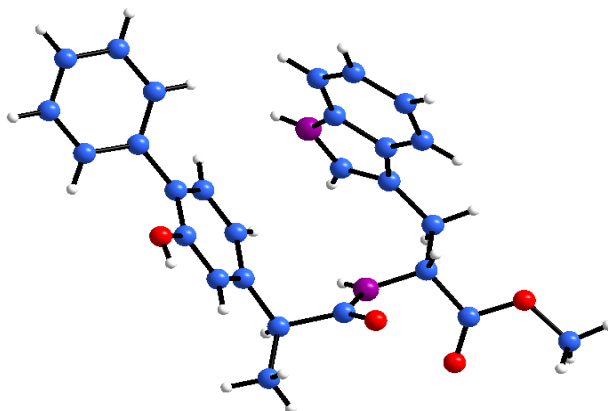


Figura 6.7. Estructura de rayos-X del compuesto *(S,R)*-BPOH-Trp.

Para comprobar si se producía la transferencia de protón intramolecular en el estado excitado (ESIPT) desde el hidroxilo fenólico al carbono 2' con hibridación sp^2 del anillo aromático vecino, en competencia con la desactivación por transferencia de carga, se añadió un 20% de agua (líneas discontinuas en la Figura 6.5). Esta cantidad de agua debería ser suficientemente baja para evitar la desprotonación intermolecular del estado excitado para generar el correspondiente fenolato.⁸

En esta mezcla de disolventes el máximo de emisión se encontró ligeramente desplazado hacia el rojo, debido al aumento de la polaridad del medio. Además, cabe destacar que el rendimiento cuántico de fluorescencia de *(S)*-BPOH resultó ser menor que en MeCN anhidro; sin embargo en las diadas, no se apreció tanta diferencia en los valores de

ϕ_F (Tabla 6.2) en presencia y ausencia de agua. En la bibliografía se encuentra descrito un comportamiento similar al de BPOH para el compuesto de referencia 2-hidroxibifenilo en las mismas condiciones. El efecto observado puede explicarse por un aumento de la acidez del fenol en el estado excitado, asociado a la formación de enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo e hidroxilo a través de una molécula de agua. Esta situación pudo ser observada claramente en la estructura de rayos-X de (*S*)-BPOH, que cristalizó con moléculas de agua (Figura 6.8.A) situadas entre el carboxilato de una molécula y el hidroxilato de otra. Este hecho podría ser, en principio, evitado impidiendo la formación de los puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo e hidroxilo. Para ello, se sintetizó el éster metílico (*S*)-BPOHMe. Se observó como los rendimientos cuánticos de fluorescencia del modelo fueron prácticamente iguales en presencia y ausencia de agua (Tabla 6.2). Como era de esperar, en la estructura de rayos-X de (*S*)-BPOHMe no se observaron moléculas de agua (Figura 6.8.B). En el caso de las diadas, la acidez del grupo fenólico no aumenta tanto como en el caso de (*S*)-BPOH debido a que el grupo carboxilo se emplea para formar el enlace de tipo amida, no quedando disponible para coordinarse con el agua. Además, en la estructura de rayos-X de las diadas no se observó la presencia de agua co-cristalizada.

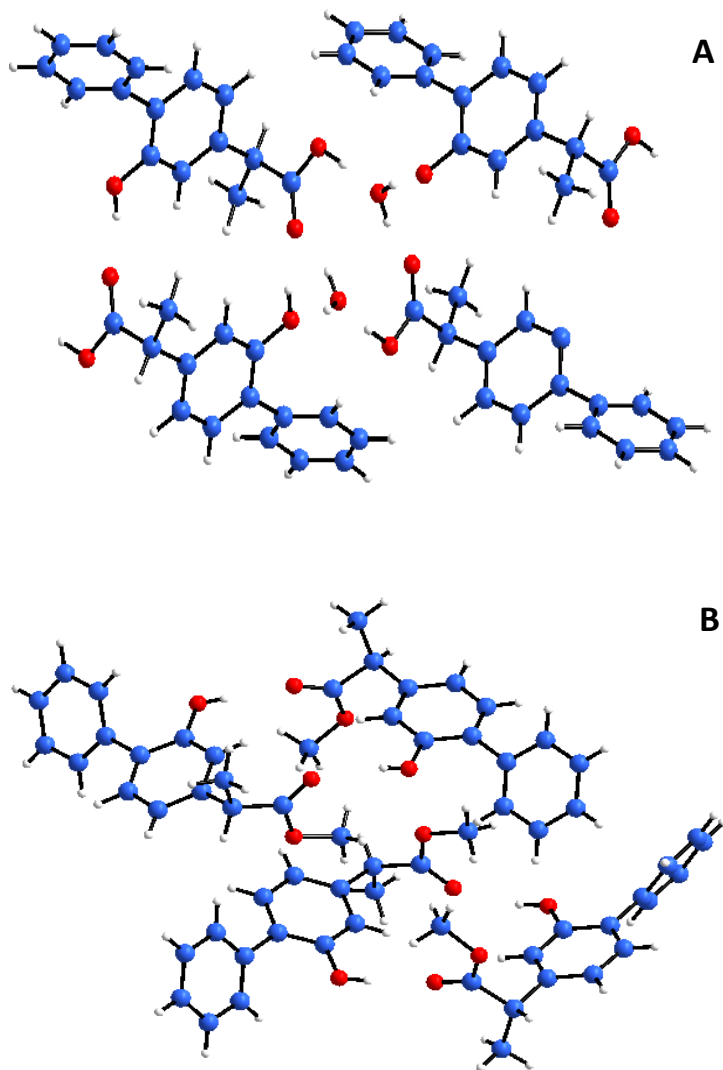


Figura 6.8. Fragmento de celda unidad para A: (*S*)-BPOH y B: (*S*)-BPOHMe

Los tiempos de vida de las diadas fueron determinados mediante TCSPC (Figura 6.9). En acetonitrilo anhidro se encontró un valor de τ_F de 1.67 ns para (*S*)-BPOH, mientras que en el caso las diadas se encontraron valores de 0.95 y 0.46 ns para (*S,S*)- y (*S,R*)-BPOH-Trp, respectivamente (Tabla 6.2). Estos datos indicaron que la mayor parte de la desactivación observada en los experimentos en estado estacionario era de naturaleza dinámica. En presencia de agua, el tiempo de vida de (*S*)-BPOH resultó ser menor, confirmando la desactivación dinámica fundamentalmente mediante ES IPT.

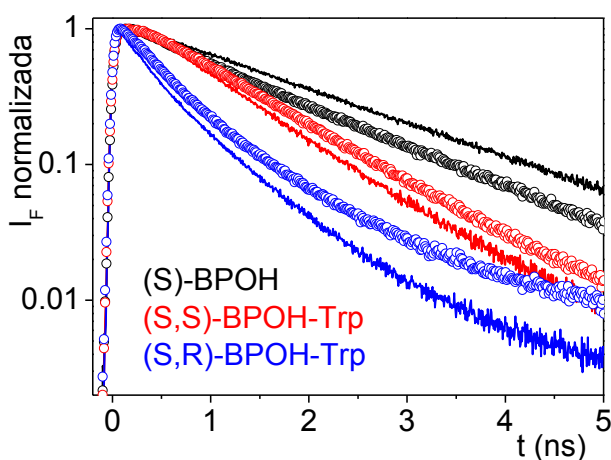


Figura 6.9. Cinéticas de desaparición de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 267$ nm y $\lambda_{em} = 330$ nm) de (*S*)-BPOH y de las diadas (*S,S*)- y (*S,R*)-BPOH-Trp en MeCN (línea continua) y MeCN/agua 4:1 (círculos). La absorbancia de todas las disoluciones se mantuvo a 0.2 a la longitud de onda de excitación.

A continuación se muestra la Tabla 6.2, donde se recogen todos los parámetros foto físicos de (*S*)-BPOH, (*S,S*)-BPOHMe y (*S,R*)-BPOH-Trp en los distintos medios estudiados.

	(<i>S</i>)-BPOH	(<i>S</i>)-BPOHMe	(<i>S,S</i>)-BPOH-Trp	(<i>S,R</i>)-BPOH-Trp
MeCN				
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	331	334	330	332
ϕ_F	0.241	0.290	0.116	0.042
τ_F (ns)	1.67	2.10	0.95	0.46
k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	1.43	1.38	1.22	0.91
k_D ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	---	---	4.5	15.8
ϕ_D (tot)	---	---	0.52	0.83
ϕ_D (din)	---	---	0.43	0.73

Tabla 6.2.A. Propiedades foto físicas de (*S*)-BPOH, (*S*)-BPOHMe y diadas (*S,S*)- o (*S,R*)- BPOH-Trp en MeCN a $\lambda_{\text{exc}} = 267 \text{ nm}$, aire.

	(S)-BPOH	(S)-BPOHMe	(S,S)-BPOH-Trp	(S,R)-BPOH-Trp
MeCN/agua 4:1				
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	338	340	339	339
ϕ_F	0.200	0.280	0.139	0.060
τ_F (ns)	1.27	1.80	1.07	0.57
k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	1.57	1.55	1.29	1.05
k_D ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	---	---	1.5	9.7
ϕ_D (tot)	---	---	0.31	0.70
ϕ_D (din)	---	---	0.16	0.55

Tabla 6.2.B. Propiedades fotofísicas de (S)-BPOH, (S)-BPOHMe y diadas (S,S)- o (S,R)- BPOH-Trp en MeCN/agua (4:1) a $\lambda_{\text{exc}} = 267 \text{ nm}$, aire.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron usando (S)-FBP como referencia ($\phi_F = 0.21$ en MeCN/N₂ ó 0.17 en MeCN/aire).⁶ El cálculo de ϕ_F se realizó haciendo uso de la ecuación 6.5:

$$\phi_F = \phi_{F(\text{referencia})} \frac{A}{A_{\text{referencia}}} \frac{Abs_{\text{referencia}}}{Abs} \frac{\eta^2}{\eta_{\text{referencia}}^2} \quad (6.5)$$

donde $\phi_{F(\text{referencia})}$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia de (S)-FBP, A es el área bajo la curva de fluorescencia de BPOH y/o las diadas, $A_{\text{referencia}}$ es el área bajo la curva de fluorescencia de (S)-FBP, $Abs_{\text{referencia}}$ es la absorbancia de (S)-FBP a la longitud de onda de excitación, Abs es la absorbancia de BPOH y/o las diadas a la longitud de onda de excitación y $\eta_{\text{referencia}}$ y η son, respectivamente, los índices de refracción de los disolventes empleados.

Los valores de las constantes de fluorescencia (k_F) de las diadas se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 6.6:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad (6.6)$$

donde ϕ_F y τ_F corresponden a los valores de rendimiento cuántico y de tiempo de vida de fluorescencia, respectivamente y

Las constantes de desactivación (k_D) de las diadas se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 6.7:

$$k_D = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(\text{referencia})}} \quad (6.7)$$

donde τ_F y $\tau_{F(\text{referencia})}$ corresponden al valor de tiempo de vida de fluorescencia de las diadas y de (S)-BPOH respectivamente.

Los rendimientos cuánticos de desactivación totales ($\phi_{D(\text{tot})}$) de las diadas se calcularon haciendo uso de la ecuación 6.8:

$$\phi_{D(\text{tot})} = 1 - \frac{\phi_F}{\phi_{F(\text{referencia})}} \quad (6.8)$$

donde ϕ_F y $\phi_{F(\text{referencia})}$ corresponden al valor de rendimiento de fluorescencia de las diadas y de (S)-BPOH, respectivamente.

Los rendimientos cuánticos de desactivación dinámicos ($\phi_{D(\text{din})}$) de las diadas se calcularon haciendo uso de la ecuación 6.9:

$$\phi_{D(\text{din})} = \phi_F \frac{k_D}{k_F} \quad (6.9)$$

donde ϕ_F corresponde al valor de rendimiento de fluorescencia de las diadas y k_D y k_F al valor de las constantes de desactivación y de fluorescencia de las diadas, respectivamente.

Con la finalidad de conocer la disposición geométrica de los dos cromóforos en las diadas, hecho relacionado con la desactivación de la fluorescencia por transferencia de carga, se realizaron modelos moleculares simples (PM3) de los dos diastereómeros (Figura 6.10)

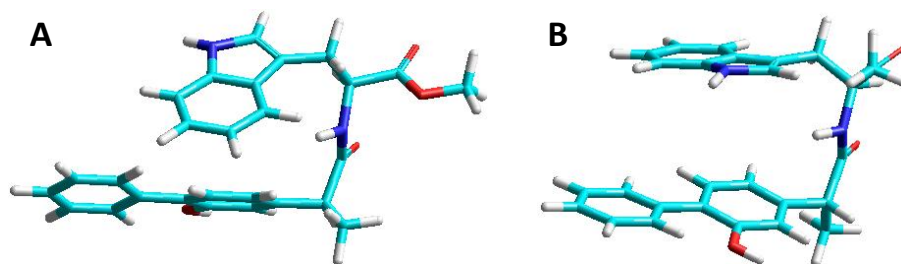


Figura 6.10. Estructuras geométricas optimizadas (HyperChem Release 8.0.3 para Windows Molecular Model System, PM3) de las diadas **A**: (*S,S*)- BPOH-Trp y **B**: (*S,R*)-BPOH-Trp.

De este modo, el diastereómero (*S,R*)-BPOH-Trp (Figura 6.10.B) presentó una disposición geométrica más favorable para la interacción entre los dos cromóforos que el diastereómero (*S,S*)-BPOH-Trp (Figura 6.10.A), cuya geometría resultó ser más distorsionada, ya que el cromóforo indol se encontraba casi ortogonal al bifenilo; ello dificulta la interacción entre los dos cromóforos. Este hecho estuvo de acuerdo con los valores obtenidos de ϕ_F y τ_F en los experimentos de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo, que además resultaron ser menores para la diada (*S,R*)-BPOH-Trp.

6.3. Conclusiones

Para los sistemas **FBP-Trp**, las principales conclusiones son:

Se observa una notable desactivación de la fluorescencia en las diadas, cuya emisión se asigna al residuo de Trp. De acuerdo con el análisis realizado de las cinéticas de desaparición mediante la técnica de FU, esta desactivación es debida a una transferencia de energía singlete-singlete desde $^1\text{FBP}^*$ a Trp, rápida y estereoselectiva, con una constante de desactivación mayor para el diastereómero (*R,S*)-FBP-Trp. A escalas de tiempo mayores también se observa una desactivación estereoselectiva de la fluorescencia de $^1\text{Trp}^*$, la cual puede ser debida a un proceso de transferencia de electrón y/o formación de un exciplexo.

Para los sistemas **BPOH-Trp**, se puede concluir que:

La emisión de las diadas (*S,S*)- y (*S,R*)-BPOH-Trp en acetonitrilo está dominada preferentemente por el cromóforo BPOH. Se observa una marcada desactivación debido a un proceso de transferencia de carga intramolecular que además es estereoselectivo. En presencia de agua (20 %), el rendimiento cuántico de fluorescencia de BPOH disminuye, en cambio, para las diadas no se observa este efecto. En presencia de agua, BPOH en su estado excitado presenta mayor acidez. Además, en su estructura cristalina se observa moléculas de agua formando puentes de hidrógeno con los grupos carboxilo e hidroxilo. Este hecho está impedido en las diadas, cuyos rendimientos cuánticos de fluorescencia no dependen de la presencia o ausencia de agua. La naturaleza dinámica observada en la desactivación se pone de

manifiesto por la reducción de la dependencia de la configuración en los tiempos de vida de las diadas (S,S) - y (S,R) -BPOH-Trp comparadas con (S) -BPOH. La conformación plegada observada en el diastereómero (S,R) -, tanto en la estructura de rayos X como en la modelización, confirma los valores obtenidos de ϕ_F y τ_F , que son menores para la diada (S,R) - que para (S,S) -BPOH-Trp.

6.4. Parte experimental

6.4.1. Reactivos y disolventes

(*S*)- Flurbiprofeno, hidrocloreuro del éster metílico de (*S*)- o (*R*)- triptófano, (*S*)- y (*R*)- (1-naftil)etilamina, EDC (hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida), BtOH (1-hidroxibenzotriazol) y SOCl₂ (cloruro de tionilo) fueron adquiridos de Aldrich. Los disolventes utilizados para síntesis y purificación (acetonitrilo, metanol, hexano, acetato de etilo y diclorometano) fueron de grado analítico y adquiridos de Scharlau. El acetonitrilo utilizado fue grado HPLC y adquirido de Merck. La disolución de PBS 0.01 M (pH = 7.4) empleada se obtuvo por disolución de pastillas tampón fosfato adquiridas de Sigma, disueltas en agua desionizada Milli-Q.

6.4.2. General

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) se realizaron usando cloroformo deuterado.

La purificación de los productos se llevó a cabo por cromatografía en capa preparativa de gel de sílice 60 F₂₅₄ 2 mm de Merck usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo en el caso de BPOH y BPOHMe y diclorometano/acetato de etilo en el caso de las diadas BPOH-Trp.

6.4.3. Medidas de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en condiciones aeróbicas. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL, a temperatura ambiente (22 °C).

Para determinar el valor de los rendimientos cuánticos de fluorescencia se utilizó FBP en MeCN como referencia, con valores de ϕ_F = 0.17 en aire y 0.21 en nitrógeno.⁶

Los espectros de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron en el Laboratoire Francis Perrin (CNRS/IRAMIS/SPAM) CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette, Francia. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas de FU se realizaron en una celda de cuarzo 0.4 mm y las de TCSPC en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C) y en condiciones aeróbicas.

6.4.4. Síntesis de los compuestos estudiados

La síntesis y caracterización de las diadas FBP-Trp se encuentra descrita en la bibliografía.¹⁰

✓ ***Síntesis de BPOH***

(*S*) o (*R*)- Flurbiprofeno (100 mg) disuelto en 200 mL de disolución tampón fosfato a pH = 7.4 (PBS) fue irradiado en tubos de cuarzo y en atmósfera de nitrógeno en un fotorreactor Luzchem durante 9 horas y a una longitud de onda de excitación de 254 nm. La reacción fue seguida por RMN-¹H y por cromatografía de gases acoplada a detector de masas. La mezcla resultante fue acidificada con HCl y extraída con diclorometano (DCM) y se secó con MgSO₄. El disolvente orgánico fue eliminado en un rotavapor y, finalmente, se realizó una purificación por cromatografía en capa preparativa de gel de sílice usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 60%, y seguida de una recristalización con hexano.

✓ ***Síntesis de BPOHMe***

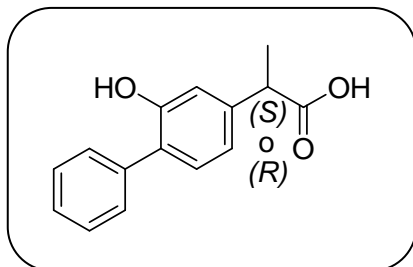
Sobre una disolución de (*S*)- BPOH (0.23 mmol) en metanol (10 mL), se añadió cloruro de tionilo (2.4 mL), manteniéndose la mezcla de reacción a reflujo durante 2 horas. El disolvente fue eliminado en un rotavapor. El aceite resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con NaHCO₃ diluido, HCl 1 M y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO₄. El disolvente orgánico fue eliminado en un rotavapor y, finalmente, se realizó una purificación por cromatografía en capa preparativa de gel de sílice usando como eluyente una mezcla

hexano/acetato de etilo 30%, y seguida de una recristalización con hexano.

✓ ***Síntesis de diadas BPOH-Trp***

Sobre una disolución de (*S*)-BPOH (0.234 mmol) en acetonitrilo (MeCN), 20 mL, se añadió poco a poco una disolución de EDC (0.234 mmol, 1 mL) y BtOH (0.234 mmol, 1 mL) en MeCN. La mezcla se mantuvo en agitación, y sobre la misma se añadió gota a gota una disolución de (*S*) o (*R*)-TrpMe (0.234 mmol, 2 mL) en MeCN. Pasadas 3 horas, el disolvente orgánico fue eliminado en un rotavapor. El crudo resultante fue disuelto en diclorometano (DCM) y lavado con NaHCO₃ diluido, HCl 1M, disolución saturada de NaCl y secado con MgSO₄. El disolvente orgánico fue eliminado en un rotavapor y, finalmente, se realizó una purificación por cromatografía en capa preparativa de gel de sílice usando como eluyente una mezcla diclorometano/acetato de etilo 40%, y seguido de una recristalización con hexano.

6.4.5. Caracterización de los compuestos estudiados



Ácido 2-(2-hidroxi-1,1'-bifenil-4-il) propanoico, (S)- o (R)-BPOH

Rendimiento: 60%.

Aspecto físico: polvo blanco.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 203 (4.4), 220 hombro (4.1), 250 (3.9), 290 (3.6).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.52 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 3.73 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.45-6.93 (m, 8H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.3, 45.4, 115.4, 120.4, 127.6, 128.1, 129.4, 129.5, 130.8, 137.1, 141.2, 152.9, 180.6.

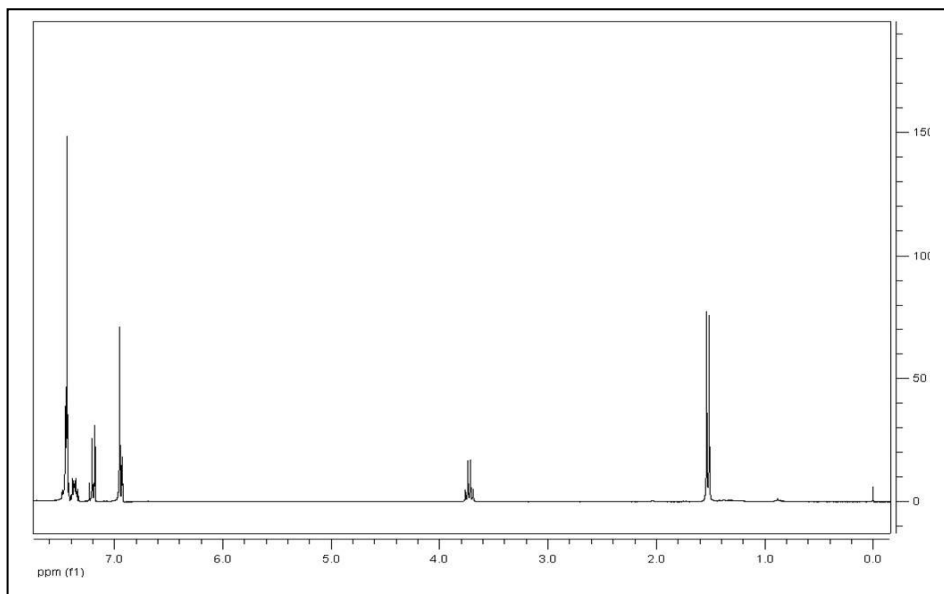


Figura 6.11. Espectro de RMN-¹H de (*S*)-BPOH, (CDCl₃).

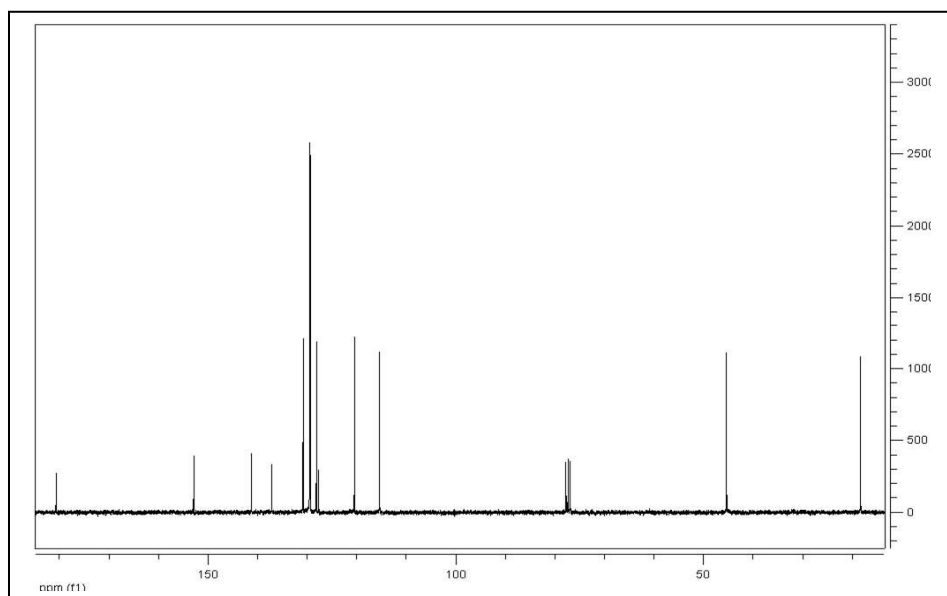
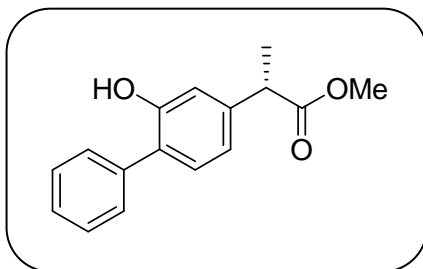


Figura 6.12. Espectro de RMN-¹³C de (*S*)-BPOH, (CDCl₃).



2-(2-hidroxi-1,1'-bifenil-4-il) propanoato de metilo, (S)-BPOHMe

Rendimiento: 75%.

Aspecto físico: agujas blancas.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 203 (4.4), 220 hombro (4.1), 250 (3.9), .290 (3.6).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.53 (d, 3H, $J = 8.0$ Hz), 3.70 (s, 3H), 3.73 (q, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.19 (s, 1H), 6.92-6.94 (m, 1H), 7.18-7.21 (m, 1H), 7.37-7.51 (m, 6H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.5, 45.2, 52.1, 114.9, 119.4, 127.0, 127.9, 129.0, 129.3, 130.8, 136.8, 141.8, 152.5, 174.7.

HRMS para C₁₆H₁₇O₃ (MH⁺): calculada 257.1172, encontrada: 257.1181.

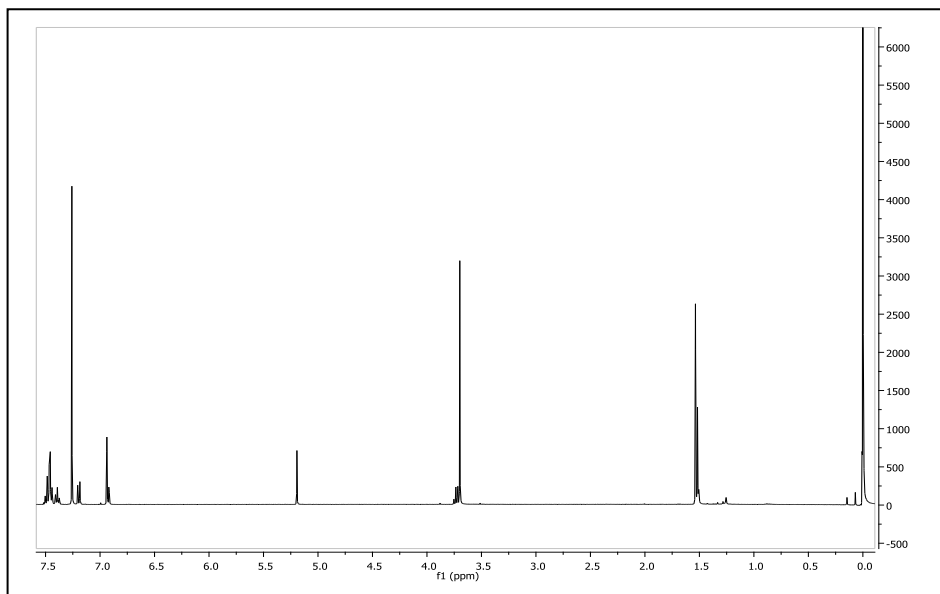


Figura 6.13. Espectro de RMN-¹H de (*S*)-BPOHMe, (CDCl₃).

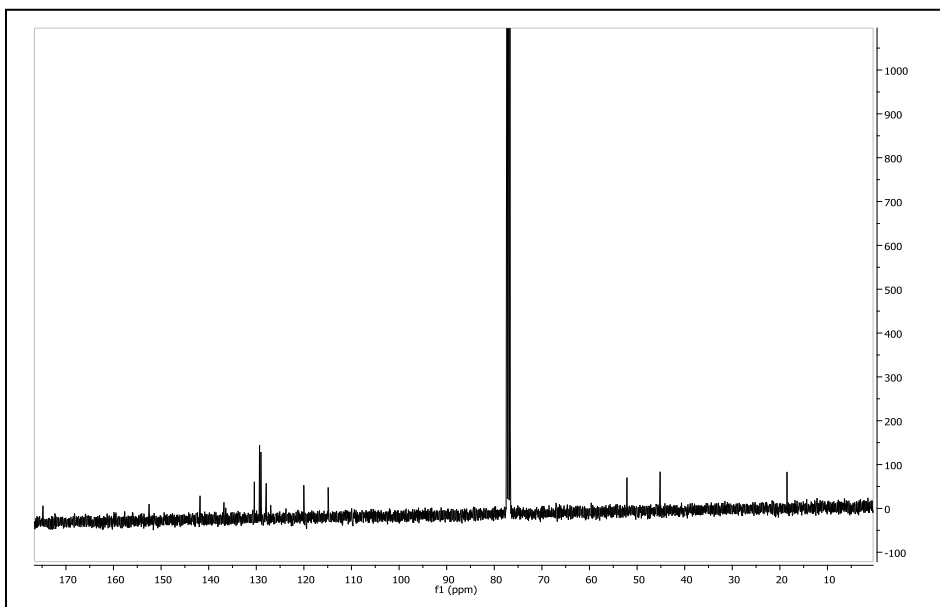
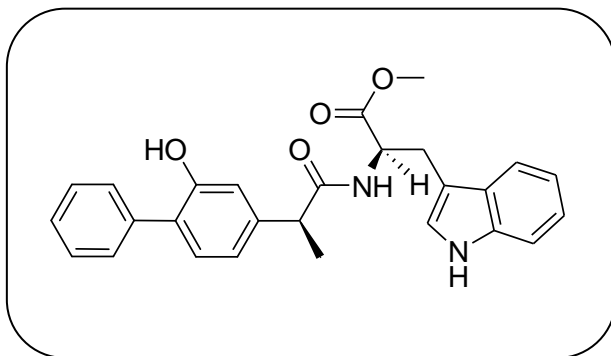


Figura 6.14. Espectro de RMN-¹³C de (*S*)-BPOHMe, (CDCl₃).



Éster metílico del *N*-[2-(*S*)-(2-hidroxi[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(*R*)-triptófano, (*S,R*)-BPOH-Trp

Rendimiento: 47%.

Aspecto físico: polvo blanco.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}$ /nm (log ϵ): 203 (4.6), 220 (4.6), 250 (4.1), 282 (3.9), 290 (3.9).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.46 (d, 3H, $J = 7.1\text{Hz}$), 3.13-3.26 (m, 2H), 3.45 (q, 1H, $J = 7.1\text{Hz}$), 3.64 (s, 3H), 4.90 (td, 1H, $J = 5.4\text{Hz}$, $J = 8.0\text{Hz}$), 6.05 (d, 1H, $J = 8.0\text{Hz}$), 6.28 (s, 1H), 6.50 (d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$), 6.80 (dd, 2H, $J = 1.7\text{Hz}$, $J = 6.3\text{Hz}$), 7.01-7.23 (m, 4H), 7.36-7.40 (m, 2H), 7.44-7.53 (m, 4H), 8.11 (s, 1H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.3, 27.5, 46.8, 52.6, 52.8, 109.5, 111.4, 115.1, 118.6, 119.73, 120.2, 122.2, 123.2, 127.5, 127.9, 129.0, 129.2, 130.9, 136.1, 137.5, 142.2, 153.3, 172.5, 174.0.

HRMS para C₂₇H₂₆N₂O₄ (M⁺): calculada 442.1893, encontrada: 442.1897.

.

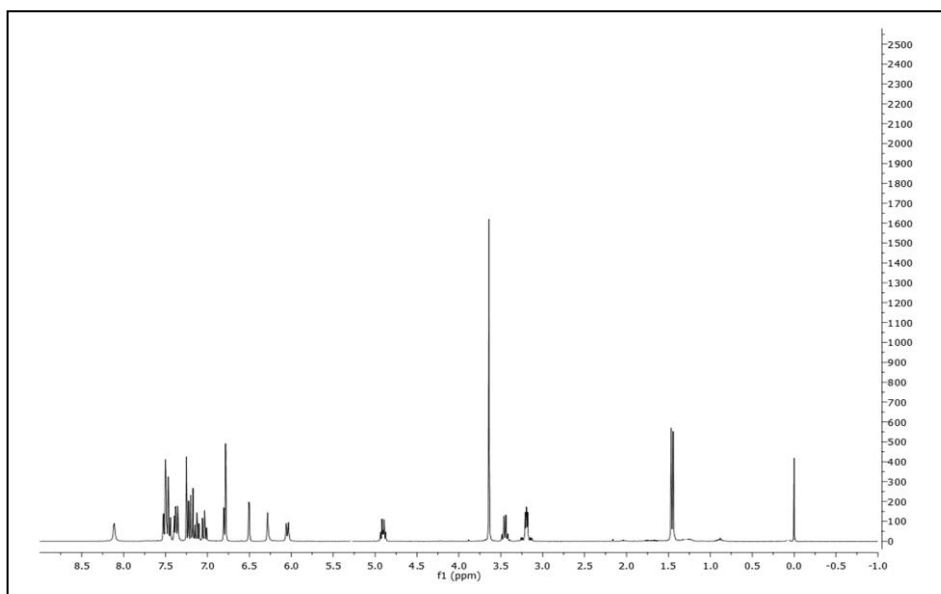


Figura 6.15. Espectro de RMN- ^1H de la diada (*S,R*)-BPOH-Trp, (CDCl_3).

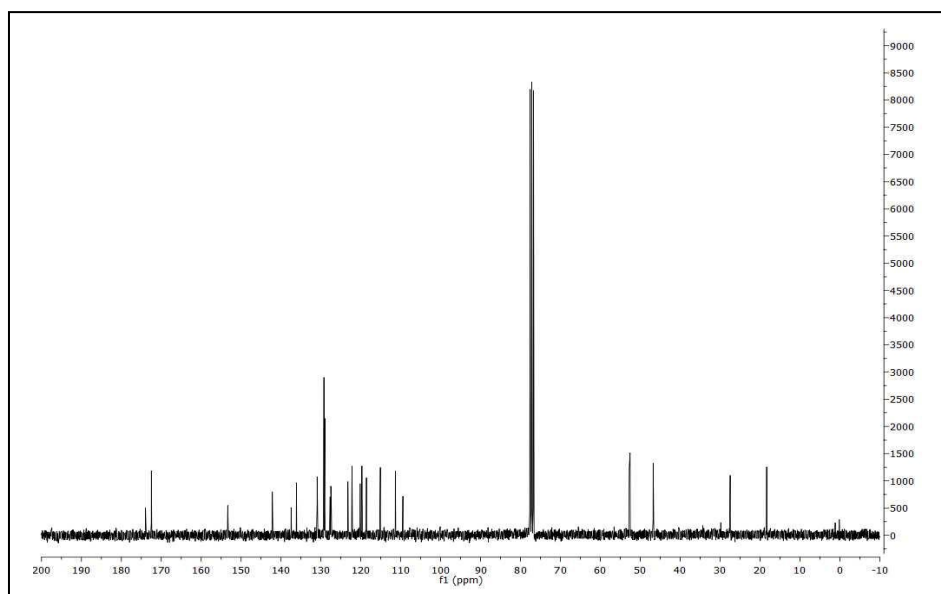
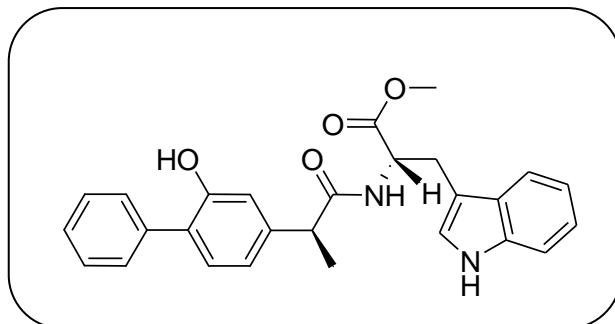


Figura 6.16. Espectro de RMN- ^{13}C de la diada (*S,R*)-BPOH-Trp, (CDCl_3).



Éster metílico del N-[2-(S)-(2-Hidroxi[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(S)-triptófano, (S,S)-BPOH-Trp

Rendimiento: 50%.

Aspecto físico: polvo blanco.

Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx.}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 203 (4.6), 220 (4.6), 250 (4.1), 282 (3.9), 290 (3.9).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.47 (d, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.19-3.32 (m, 2H), 3.47 (q, 1H, $J = 7.2\text{Hz}$), 3.61 (s, 3H), 4.85 (td, 1H, $J = 5.5\text{Hz}$, $J = 7.8\text{Hz}$), 6.05 (d, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$), 6.12 (s, 1H), 6.73-6.79(m, 3H), 7.05-7.17 (m, 3H), 7.27-7.30 (m, 1H), 7.44-7.47 (m, 4H), 8.13 (s, 1H).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.1, 27.4, 46.7, 52.4, 52.9, 109.9, 111.23, 115.14, 118.6, 119.7, 120.0, 122.2, 122.3, 127.2, 127.6, 127.7, 129.1, 130.7, 136.0, 137.1, 141.7, 152.9, 172.3, 173.3.

HRMS para $C_{27}H_{26}N_2O_4$ (M^+), calculada: 442.1893, encontrada: 442.1891.

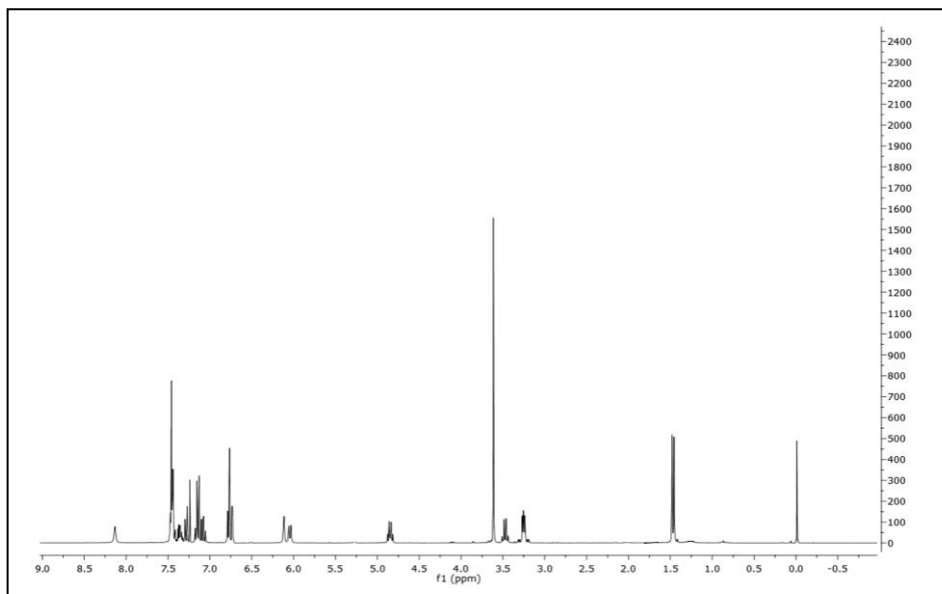


Figura 6.17. Espectro de RMN- ^1H de la diada (S,S) -BPOH-Trp, (CDCl_3).

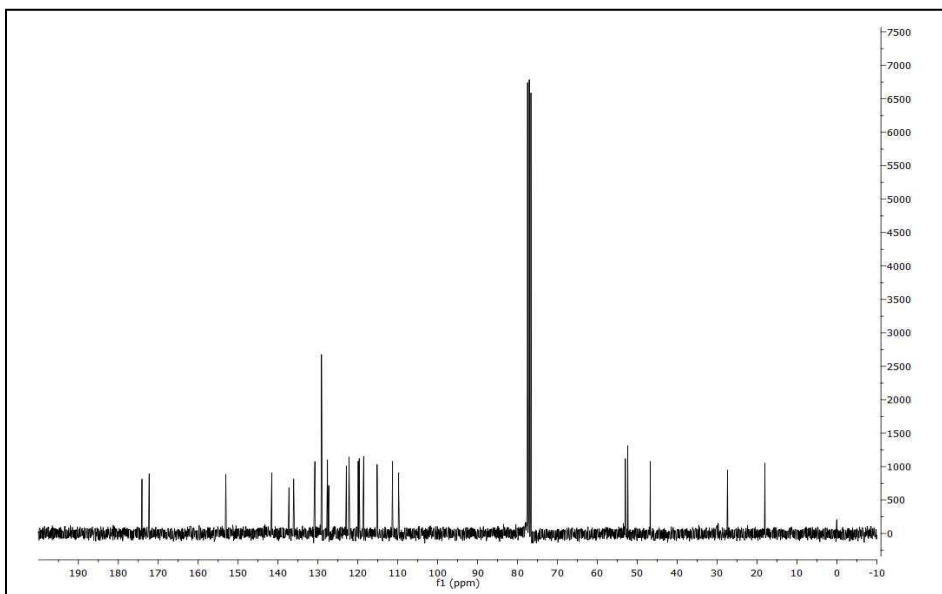


Figura 6.18. Espectro de RMN- ^{13}C de la diada (S,S) -BPOH-Trp, (CDCl_3).

6.5. Referencias bibliográficas

1. J. Rovensky, D. Micekova, *Drug. Exp. Clin. Res.* **2000**, 26, 19.
2. N Bellamy, W. G. Bensen, P. M. Ford, S. H. Huang, J. Y. Lang, *Clin. Invest. Med.* **1992**, 15, 427.
3. D. S. Muckle, *Am. J. Med.* **1986**, 80, 76.
4. G. D. Solomon, R. S. Kunkel, *Clev. Clin. J. Med.* **1993**, 60, 43.
5. P. Tan, F. P Flowers, O. E. Araujo, P. Doering, *Drug Intel. Clin. Pharm.* **1986**, 20, 496.
6. M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 1038.
7. D. G. Kaiser, C. D. Brooks, P. L. Lomen, *Am. J. Med.* **1986**, 8, 5.
8. M. Lukeman, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9458.
9. P. Bonancía, I. Vayá, M. J. Climent, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. A*, **2012**, 116, 8807.
10. I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 9363.
11. I. Vayá, R. Pérez-Ruiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.*, **2010**, 486, 147.
12. V. Lhiaubet-Vallet, F. Boscá, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 423.
13. A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93.
14. E_{Ox} (2-fenilfenol) = 0.831 V, valor tomado de: P. Winget, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *Theor Chem Acc* **2004**, 112, 217.

15. E_{RED} (Trp) = -1.55 V, valor tomado de: S. Cakir, E. Bicer, *J. Chil. Chem. Soc.* **2010**, 55, 236.
16. E_{OX} (indol) = 1.015 V, valor tomado de: S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, **1993**.
17. E_{RED} (bifenilo) = -2.55 V, valor tomado de: S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, **1993**.
18. Los valores de las constantes dieléctricas son de 37.5 (MeCN) y 80.4 (agua), valores tomados de: *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition; CRC Press: Boca Raton, FL, **2004**.
19. S. Speiser, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1953.
20. T. Förster en *Comprehensive Biochemistry*, M. Florin, E. H. Stolz Eds. Elsevier: Amsterdam, **1967**, Vol 22.

Capítulo 7

Estudios de derivados de
bifenilo en medio proteico

7.1. Introducción

Las propiedades y funciones principales de la albúmina sérica humana han sido descritas en el capítulo de *introducción*, sin embargo, se van a recordar algunos aspectos generales.

Como ya se comentó, los AINES se unen preferentemente, y en algunos casos de forma esterosselectiva, al sitio II de ASH.¹

Además, la unión a albúminas séricas proporciona un entorno excepcional que puede modificar las propiedades fisicoquímicas del ligando que se une a éstas. Esto incluye las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de sustratos de distinta naturaleza,²⁻⁷ entre los que se encuentran algunos fármacos.⁸

Así, las propiedades fotofísicas intrínsecas de un ligando encapsulado pueden ser utilizadas para obtener información relevante del microambiente proteico. De este modo, a partir de los rendimientos cuánticos y tiempos de vida de los estados excitados singlete o triplete de un ligando unido, se pueden determinar los parámetros tales como la estequiometría del complejo, la constante de asociación o el porcentaje de ocupación.⁹

En este contexto, el objetivo del presente capítulo es estudiar, mediante espectroscopía de absorción-UV y espectroscopía de fluorescencia tanto en estado estacionario como resuelta en el tiempo, las interacciones de sustratos derivados del cromóforo bifenilo (como FBP y BPOH) con albúmina sérica humana.

En la Figura 7.1 se muestra la estructura de los sustratos estudiados en presencia de ASH.

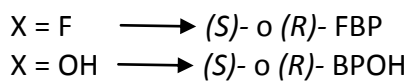
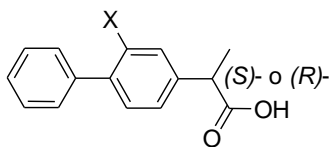


Figura 7.1. Estructura química de los derivados de bifenilo estudiados.

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Sistemas FBP/ASH

Se registraron los espectros de absorción y de fluorescencia de (S)-FBP, ASH y de las mezclas (S)-FBP/ASH (0.7:1). (Figura 7.2) Se escogió esta relación molar debido a que en estas condiciones todo el fármaco se encontraba en el interior de la proteína.¹⁰ En la bibliografía se encuentra descrito que la emisión de la ASH es debida al cromóforo indol del triptófano.¹¹ Comparando las bandas de la mezcla fármaco/proteína con las de FBP y ASH aislados se observó una contribución de ambos componentes, ya que ambos absorbían luz a la longitud de onda de excitación.

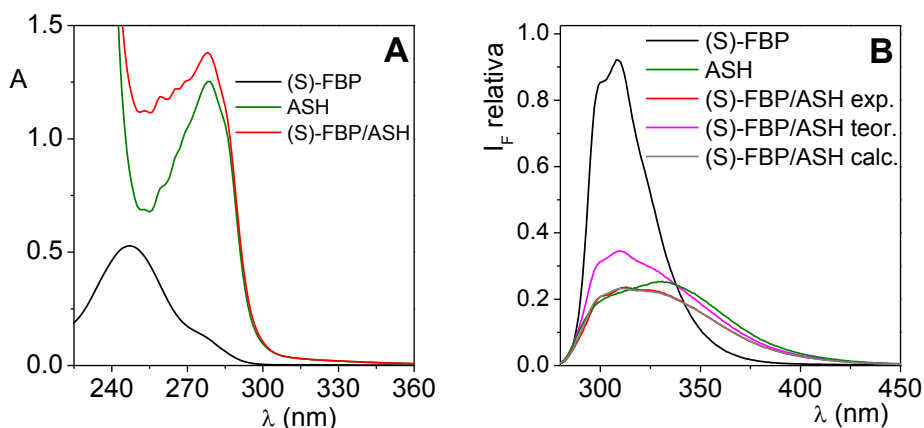


Figura 7.2: Espectro de **A:** absorción UV de (S)-FBP, ASH y mezcla (S)-FBP/ASH, donde $[FBP] = 2.5 \times 10^{-5}$ M y $[ASH] = 3.6 \times 10^{-5}$ M. **B:** Emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 267$ nm, aire, PBS) de (S)-FBP, ASH, mezcla (S)-FBP/ASH y las bandas calculadas teóricamente a partir de los cromóforos aislados. Disoluciones isoabsortivas a la longitud de onda de excitación.

Sin embargo, la curva simulada teniendo en cuenta la cantidad de fotones absorbidos por cada cromóforo a la longitud de onda de excitación (llamada (S)-FBP/ASH teor., donde el 18 % era absorbido por FBP y 82 % por ASH), no se correlacionó con la curva obtenida de la mezcla experimental (llamada (S)-FBP/ASH exp.). En cambio, se consiguió reproducir la curva experimental suponiendo que 7.4 % era absorbido por FBP y 74.6 % por ASH (llamada (S)-FBP/ASH calc.). Los resultados obtenidos apuntan a una posible transferencia de energía singlete-singlete desde $^1\text{FBP}^*$ a ASH combinada con una desactivación de $^1\text{ASH}^*$. Para el enantiómero (R)-FBP se observaron resultados similares.

Estas interacciones observadas en estado estacionario fueron confirmadas mediante experimentos de FU de las mezclas FBP/ASH registradas a 310 nm (Figura 7.3)

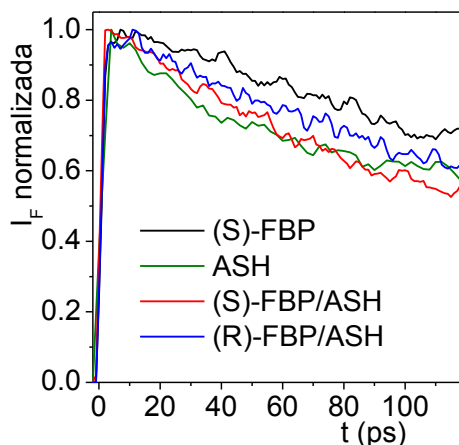


Figura 7.3: Cinéticas de desaparición de FU de (S)-FBP, ASH, (S)-FBP/ASH y (R)-FBP/ASH. ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, aire, PBS). Cinéticas monitorizadas a 310 nm excepto en el caso de la ASH aislada donde $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm.

Como se observa en la Figura 7.3, las cinéticas de desaparición (310 nm) de las mezclas FBP/ASH resultaron ser más rápidas que en el caso de FBP aislado. En particular, el aumento observado para FBP aislado, no tiene lugar en las mezclas FBP/ASH. Esta observación, se pudo explicar en términos de desactivación dinámica (debida a TESS) de la fluorescencia del FBP, que resultó ser dependiente de la configuración, siendo el enantiómero (*S*)- desactivado más rápido que el correspondiente enantiómero (*R*)-.

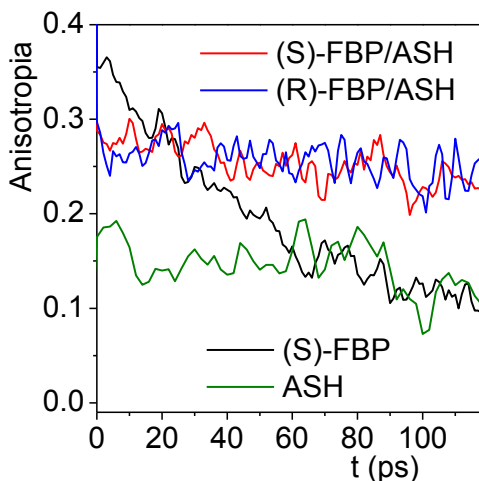


Figura 7.4: Anisotropías de desaparición de (*S*)-FBP, ASH, (*S*)-FBP/ASH y (*R*)-FBP/ASH, ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, aire, PBS). Cinéticas monitorizadas a 310 nm excepto en el caso de la ASH aislada donde $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm.

Como se puede ver en la Figura 7.4, se obtuvo un valor constante de anisotropía de fluorescencia de 0.18 para la ASH. Esta observación experimental estuvo de acuerdo con la pequeña difusión rotacional de

la proteína. En cambio, para FBP, la anisotropía de fluorescencia inicial a tiempo cero (r_0) resultó ser 0.36, desapareciendo con un tiempo característico de 65 ps. En el caso de las mezclas FBP/ASH, el valor de r_0 descendió hasta un valor de 0.29 y permaneció constante prácticamente durante los primeros 100 ps. En principio, esto pudo ser atribuido a la rotación restringida del fármaco en la cavidad de la proteína debido al microambiente confinado proporcionado por ésta.

Con el fin de lograr una mejor comprensión de la dinámica de los estados excitados de estos sistemas, se registraron las cinéticas de desaparición mediante TCSPC a 310 y 380 nm tras excitación a 267 nm (Figura 7.5). Los parámetros obtenidos tras el ajuste de estas curvas se muestran en la Tabla 7.1.

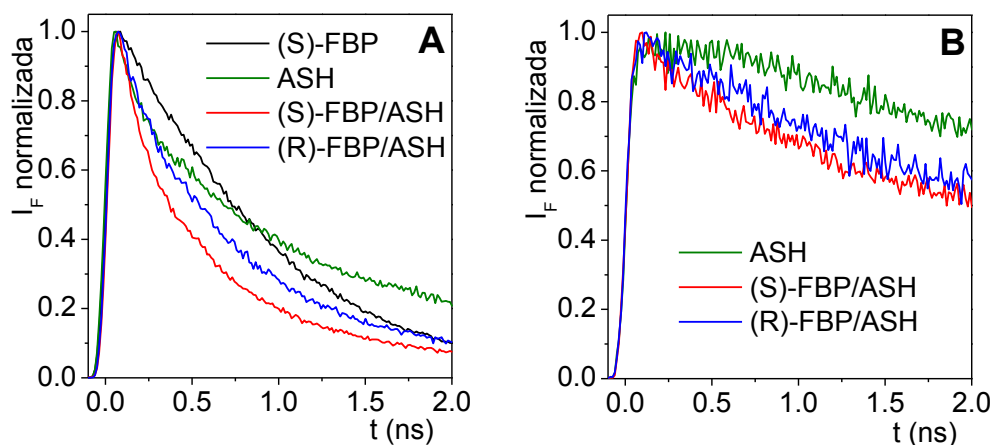


Figura 7.4: Cinéticas de desaparición en escala de ns (TCSPC) de (S)-FBP, ASH, (S)-FBP/ASH y (R)-FBP/ASH. ($\lambda_{exc} = 267$ nm, aire, PBS). **A:** $\lambda_{em} = 310$ nm y **B:** $\lambda_{em} = 380$ nm.

La cinética de desaparición correspondiente a $^1\text{FBP}^*$ en PBS a 310 nm resultó ser monoexponencial, con un tiempo de vida de 0.78 ns. En lo que respecta a ASH, está descrito en la bibliografía que se necesita más de una componente de tiempo de vida, debido a la heterogeneidad que rodea al Trp y las contribuciones residuales de aminoácidos aromáticos.^{11,12} En este contexto, se necesitaron tres funciones exponenciales para poder ajustar las cinéticas de desaparición cuando la proteína estaba presente en el medio. Debido a la complejidad del análisis de las cinéticas de desaparición en estos sistemas, se realizó una media de los tres tiempos de vida obtenidos ($\langle\tau\rangle$) para poder comparar el comportamiento del FBP en el interior de la proteína y como fármaco libre en PBS. A 310 nm, la cinética de ambos enantiómeros de FBP/ASH resultó ser más rápida que la observada para el fármaco libre (Figura 7.4.A), siendo distintas para cada enantiómero de FBP. Del mismo modo, a 380 nm (Figura 7.4.B) las cinéticas resultaron ser dependientes de la configuración de FBP, aunque en menor medida.

λ_{em} (nm)	Parámetros ^a	ASH	(S)-FBP/ASH	(R)-FBP/ASH
310	τ_1 (ns)/ p_1 (%)	0.16/5	0.17/17	0.17/9
	τ_2 (ns)/ p_2 (%)	1.00/36	0.69/51	0.72/60
	τ_3 (ns)/ p_3 (%)	4.36/59	3.48/32	3.51/31
	$\langle\tau\rangle$ (ns)	1.22	0.54	0.70
380	τ_1 (ns)/ p_1 (%)	2.94/18	0.36/3	0.53/3
	τ_2 (ns)/ p_2 (%)	6.93/71	2.59/25	3.08/30
	τ_3 (ns)/ p_3 (%)	12.8/11	7.68/72	7.95/67
	$\langle\tau\rangle$ (ns)	5.78	3.69	4.14

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el ajuste de las cinéticas de desaparición TCSPC tras excitación a 267 nm, en PBS y aire.

^a Obtenidos mediante un ajuste no lineal, utilizando tres funciones exponenciales $F(t) = \sum a_i \exp(-t/\tau_i)$; $p_i = 100a_i\tau_i / (a_1\tau_1 + a_2\tau_2 + a_3\tau_3)$; $\langle\tau\rangle$ es la media del tiempo de vida, determinado como $a_1\tau_1 + a_2\tau_2 + a_3\tau_3$. A 310 nm, τ_f (FBP) fue de 0.78 ns.

Como se observa en la Tabla 7.1, el tiempo de vida promedio $\langle\tau\rangle$ a 310 nm (máximo de emisión de FBP) resultó ser menor cuando el fármaco interaccionaba con la proteína que cuando se encontraba libre en disolución (0.78 ns). El tiempo de vida de ASH a esta longitud de onda resultó ser claramente mayor ($\langle\tau\rangle = 1.22$ ns). La disminución en el promedio del tiempo de vida de fluorescencia, atribuida a una TESS desde ¹FBP* a Trp, resultó ser más importante para el enantiómero (S)- que para (R)-FBP (0.54 ns vs. 0.70 ns). A longitudes de onda mayores (380 nm), donde únicamente emite ASH, el tiempo de vida promedio de

las especies implicadas disminuyó desde 5.78 ns para ASH a 3.69 y 4.14 ns para los sistemas (*S*)- y (*R*)-FBP/ASH, respectivamente. De nuevo se observó una dependencia de la configuración en las cinéticas, probablemente debida a la desactivación estereoselectiva por transferencia de carga de $^1\text{Trp}^*$ a FBP.

En la Figura 7.5 se observa la anisotropía de fluorescencia a 310 nm registrada mediante TCSPC. A diferencia del caso de la anisotropía registrada mediante FU en la escala de ps (Figura 7.4), esta vez sí se observaron diferencias para cada enantiómero de FBP.

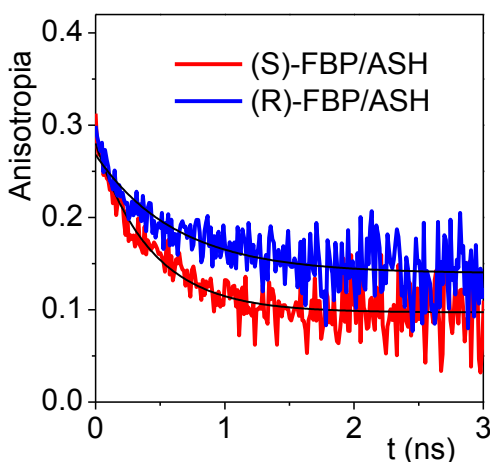


Figura 7.5: Anisotropías de desaparición de (*S*)-FBP/ASH y (*R*)-FBP/ASH, ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, aire, PBS). Cinéticas monitorizadas a 310 nm.

Para ambos sistemas fármaco/proteína, el valor de r_0 resultó ser de *ca.* 0.25 y desapareció rápidamente en los femtosegundos iniciales.

Las curvas de desaparición de anisotropía se ajustaron con dos

componentes. Mientras que para el sistema (*S*)-FBP/ASH los tiempos fueron de 0.09 y 9.5 ns, para el sistema (*R*)-FBP/ASH resultaron ser de 0.24 y 9.0 ns. La diferencia en los tiempos cortos se puede explicar por la orientación del fármaco en la cavidad de la proteína, lo que puede limitar los grados de libertad para la relajación conformacional, siendo más eficaz en el caso del enantiómero (*R*)-.

7.2.2. Comportamiento fotofísico de BPOH en ausencia de proteína

En primer lugar se caracterizó fotofísicamente (*S*)-BPOH en ausencia de proteína.

En la Figura 7.6 se muestra el espectro de absorción UV de (*S*)-BPOH en MeCN junto con (*S*)-FBP como referencia. Como era de esperar, la sustitución del flúor por el grupo hidroxilo en el FBP, indujo a cambios en las propiedades espectrales del cromóforo, siendo la característica más destacada la presencia de una banda en (*S*)-BPOH a longitudes de onda más largas, que se extendía por encima de los 300 nm. En disolución tampón fosfato (PBS 0.01 M, pH = 7.4) se observó un comportamiento similar. En cambio, en medio básico (NaOH 0.1 M) el espectro de absorción presentó un desplazamiento batocrómico, y la banda se atribuyó al correspondiente fenolato (*S*)-BPOH⁻.

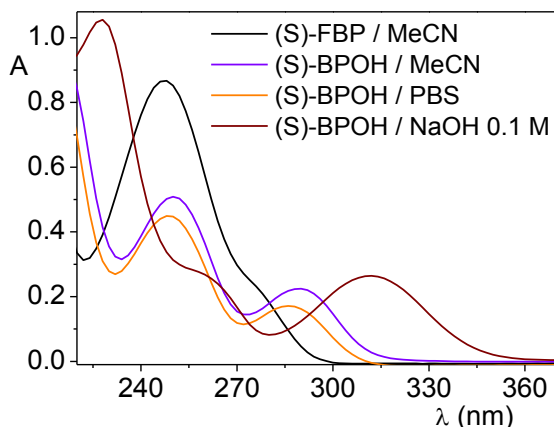


Figura 7.6. Espectro de absorción UV de (*S*)-BPOH en MeCN, PBS y NaOH 0.1 M junto con (*S*)-FBP en MeCN, 5.5×10^{-5} M.

Los espectros de emisión y excitación de fluorescencia de (*S*)-BPOH se muestran en la Figura 7.7, mientras que los parámetros fotofísicos se presentan en la Tabla 7.2. En acetonitrilo, el espectro de fluorescencia consistió en una banda centrada a *ca.* 330 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) resultó ser de 0.28, utilizando carprofeno en MeCN/N₂ como referencia ($\phi_F = 0.05$).¹³ La energía de singlete (E_S) calculada a partir de la intersección de los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 308$ nm) y excitación ($\lambda_{em} = 330$ nm) normalizados resultó ser de 91 kcal mol⁻¹. Por el contrario, el espectro de emisión de (*S*)-BPOH en NaOH presentó una banda centrada a *ca.* 410 nm, correspondiente a ¹((*S*)-BPO)⁻*. Los valores de ϕ_F y E_S para esta especie resultaron ser de 0.31 y 79 kcal mol⁻¹, respectivamente. En PBS se observó un comportamiento intermedio, donde la fluorescencia

presentó dos bandas, centradas a $\lambda = 343$ y 412 nm. Estos resultados mostraron que $^1((S)\text{-BPOH})^*$ y $^1((S)\text{-BPO}^-)^*$ resultaron ser las especies responsables de la emisión a *ca.* 330 y 410 nm, respectivamente, aunque los espectros de excitación fueron coincidentes para ambos máximos de emisión.

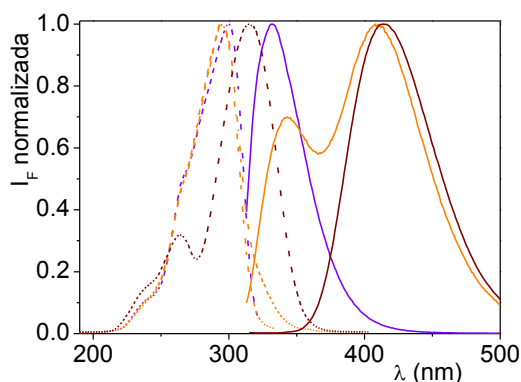


Figura 7.7. Espectros normalizados de emisión (línea continua, $\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm) y excitación (línea discontinua, λ_{em} correspondiente a cada máximo) de $(S)\text{-BPOH}$ en MeCN (violeta), PBS (naranja) y NaOH 0.1 M (granate) en N_2 .

La coincidencia de los espectros de excitación correspondientes a los dos máximos en disolución acuosa neutra (PBS) indicó que $(S)\text{-BPOH}$ es un fotoácido, es decir, que la desprotonación ocurre en el estado excitado singlete. El valor de pK_a^* fue estimado de acuerdo con un ciclo de Förster, mediante la ecuación (7.1), donde pK_a correspondió al estado fundamental, ¹⁴ y $E_S(\text{OH})$ y $E_S(\text{O}^-)$ a las energías de singlete de fenol y fenolato:

$$pK_a^* = pK_a - \frac{E_S(\text{OH}) - E_S(\text{O}^-)}{2.303 RT} \quad (7.1)$$

Con estos datos se obtuvo un valor de pK_a^* de 1.17, indicando claramente una mayor acidez de (*S*)-BPOH en su primer estado excitado singlete que en su estado fundamental. Este valor estuvo de acuerdo con el encontrado en la bibliografía ($pK_a^* = 1.15$) para el compuesto 2-hidroxibifenilo.¹⁵

Los tiempos de vida de emisión se muestran en la Tabla 7.2. Cuando se compararon los valores en MeCN con los de PBS, se observó como el tiempo de vida del fenol libre resultó ser menor en el caso de BPOH en PBS (de 1.8 ns a menos de 1 ns), indicando una desactivación dinámica. En cambio, se obtuvo un valor de τ_F de 3.3 ns para el fenolato ($\lambda_{em} = 412$ nm) tanto en PBS como en disolución básica.

En la Tabla 7.2 se recogen los principales parámetros fotofísicos de (*S*)-BPOH en acetonitrilo, PBS y NaOH a $\lambda_{exc} = 308$ nm.^a

Disolvente	ϕ_F	λ_{em} (nm)	E_s (kcal mol ⁻¹) ^a	τ_F (ns) ^b	τ_T (μ s) ^a
MeCN	0.28	332	91	1.8	2
PBS	0.10	343/412	90/84	<1/3.3	13
NaOH	0.31	414	79	3.3	Nd ^b

Tabla 7.2: Parámetros fotofísicos de (*S*)-BPOH, en acetonitrilo, PBS y NaOH a $\lambda_{exc} = 308$ nm, N₂.

^aDeterminados para las correspondientes banda(s) de emisión; ^bNo determinado.

El espectro de absorción transitoria de (*S*)-BPOH obtenido tras fotólisis de destello láser ($\lambda_{exc} = 308$ nm, MeCN, N₂) consistió en una banda centrada a 380 nm, atribuida al primer estado excitado triplete por comparación con el 2-hidroxibifenilo descrito en la literatura.¹⁶ El espectro se muestra en la Figura 7.8 junto con las cinéticas de desaparición monitorizadas a 380 nm. El espectro de absorción transitoria resultó ser muy similar en PBS y en MeCN, aunque ³(*S*)-BPOH* tuvo un tiempo de vida mayor en PBS ($\tau_T = 13$ μ s en PBS vs. 2 μ s en MeCN).

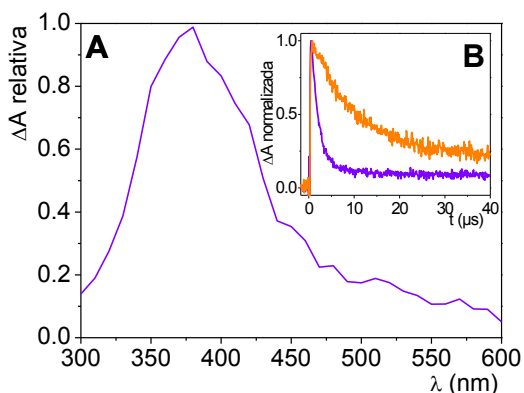


Figura 7.8. Fotólisis de destello láser de (S) -BPOH 2×10^{-4} M a $\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, N_2 . **A:** Espectro de absorción transitoria en MeCN, $0.9 \mu\text{s}$ después del pulso del láser. **B:** Cinéticas de desaparición normalizadas, monitorizadas a 380 nm en MeCN (violeta) y PBS (naranja).

Como era de esperar, $^3(S)\text{-BPOH}^*$ fue desactivado por O_2 ($k_D = 2.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en PBS). Por otro lado, a partir del espectro de fosforescencia del (S) -BPOH en matriz rígida de etanol a 77K (Figura 7.9) se pudo determinar la energía de triplete, obteniéndose un valor de 65 kcal mol^{-1} , valor comparable al de FBP.

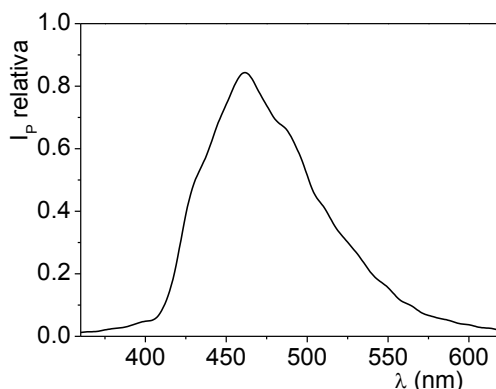


Figura 7.9. Espectro de fosforescencia de (*S*)-BPOH ($\lambda_{exc} = 308$ nm) en matriz rígida de etanol a 77 K.

7.2.3. Estudio de sistemas (*S*)- y (*R*)-BPOH / ASH

Tras la caracterización de las propiedades fotofísicas de (*S*)-BPOH en medio orgánico y acuoso, se procedió al estudio de (*S*)- y (*R*)-BPOH en presencia de ASH.

En la Figura 7.10 se muestra el espectro de absorción de una mezcla equimolar (*S*)-BPOH/ASH junto con sus componentes aislados a la misma concentración. Al comparar la banda experimental correspondiente a la mezcla equimolar con la banda teórica obtenida a partir de la suma de los espectros de (*S*)-BPOH y ASH, se observó la formación de un complejo en el estado fundamental en la región comprendida entre 290 y 330 nm.

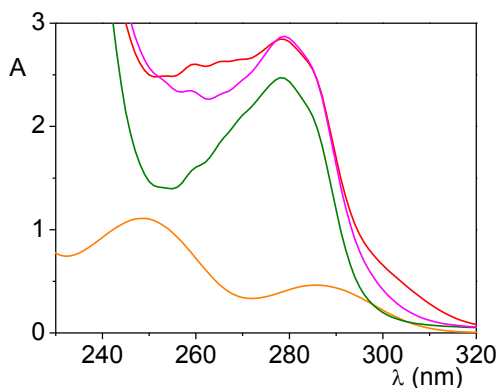


Figura 7.10. Espectro de absorción UV en PBS de (*S*)-BPOH (naranja), ASH (verde), mezcla equimolar (*S*)-BPOH/ASH (rojo) junto con la suma simulada (*S*)-BPOH + ASH (magenta). La concentración de cada uno fue de 10^{-4} M.

Para caracterizar el complejo, se prepararon disoluciones de (*S*)-BPOH/ASH a distintas relaciones molares; a las curvas obtenidas se les restó los espectros de (*S*)-BPOH y ASH aislados para las correspondientes mezclas (Figura 7.11). De este modo, se observó como la banda centrada a *ca.* 300 nm aumentó su intensidad al aumentar la concentración de proteína, por lo que pudo ser atribuída a un complejo (*S*)-BPOH@ASH en el estado fundamental.

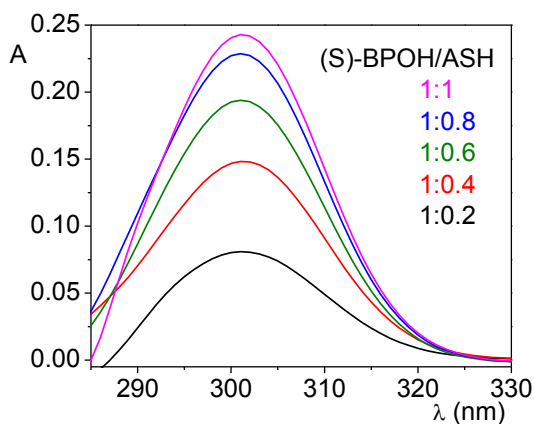


Figura 7.11. Curvas obtenidas tras la resta de las mezclas (S)-BPOH/ASH - (S)-BPOH - ASH, a diferentes relaciones molares de (S)-BPOH/ASH.

El espectro de fluorescencia de (S)-BPOH en PBS tras adición de cantidades creciente de ASH se muestra en la figura 7.12.A Cabe destacar la progresiva desaparición de la banda atribuida al fenolato en el interior de la proteína, lo que indicó que la desprotonación del estado excitado se encontró desfavorecida en las cavidades hidrofóbicas de la ASH. Se observó un comportamiento similar para (R)-BPOH, aunque la desprotonación fue significativamente menor para este enantiómero bajo las mismas condiciones (Figura 7.12.B).

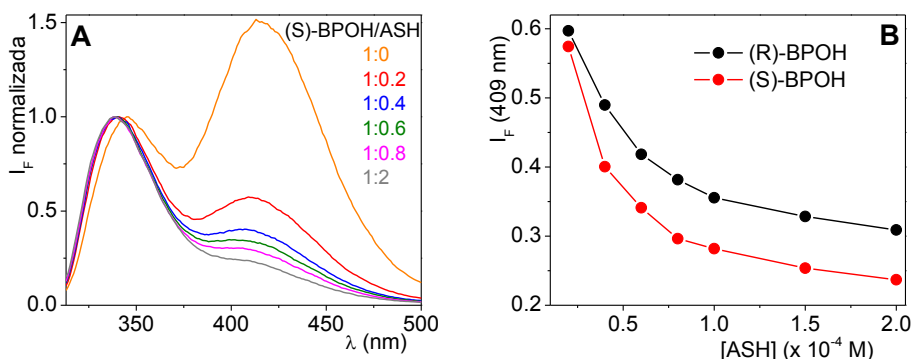


Figura 7.12. A: Espectros de fluorescencia (normalizados al máximo la banda de menor longitud de onda) de (S)-BPOH ($\lambda_{exc} = 308$ nm, aire, 10^{-4} M) tras adición de cantidades crecientes de ASH. **B:** Curvas obtenidas representando el valor de intensidad de fluorescencia (I_F) a 409 nm vs. las distintas concentraciones de ASH presentes en cada sistema (S)- o (R)-BPOH/ASH.

Con la finalidad de obtener más información acerca del complejo BPOH@ASH formado en el estado fundamental, se realizaron experimentos de absorción UV donde se monitorizaron los cambios espectrales producidos en mezclas BPOH/ASH (1:1.4) tras adiciones de una sonda desplazante de BPOH de la proteína. De este modo, sabiendo que el fármaco FBP se une preferentemente al sitio II de ASH y que la presencia de un grupo hidroxilo en BPOH debe favorecer la unión a este sitio, se escogió (S)-ibuprofeno ((S)-IBP) como sonda desplazante. En presencia de (S)-IBP, se debería encontrar una menor contribución de la forma complejada de BPOH y más ligando libre en disolución.

En el espectro de absorción UV se observó una disminución de la intensidad de la banda de absorción a longitud de onda larga. De hecho,

cuando se restaron de los espectros de las mezclas BPOH/ASH/IBP los de todos los componentes aislados a la concentración (Figura 7.13.A), el máximo a *ca.* 300 nm disminuyó al aumentar la concentración de (*S*)-IBP; este hecho resultó ser dependiente de la configuración de BPOH (Figura 7.13.B).

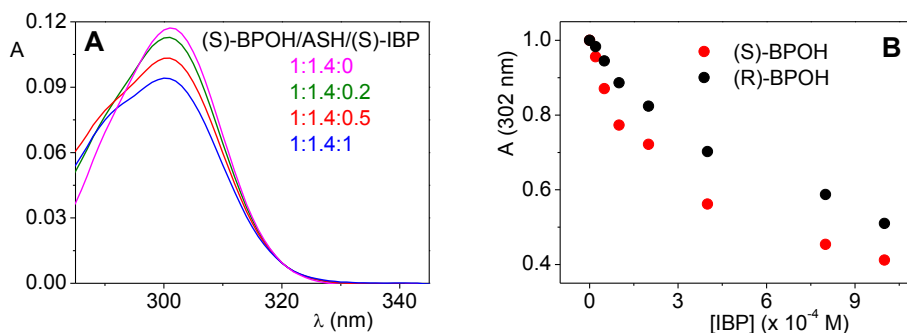


Figura 7.13. A: Espectros de absorción UV del complejo formado en el estado fundamental obtenido a partir de las restas de (*S*)-BPOH/ASH - (*S*)-BPOH - ASH - (*S*)-IBP tras adición de cantidades crecientes de (*S*)-IBP. **B:** Curvas obtenidas representando el valor de intensidad de absorción a 302 nm vs. las distintas concentraciones de (*S*)-IBP presentes en cada sistema (*S*)- o (*R*)-BPOH/ASH/(*S*)-IBP. [BPOH] = 10^{-4} M.

Por otro lado, se realizaron los experimentos de fluorescencia para las mismas muestras, observándose un desplazamiento de BPOH por (*S*)-IBP del interior de la proteína a la disolución, donde la desprotonación aumentó, volviéndose a observar la banda correspondiente al fenolato (Figura 7.14.A). Del mismo modo, se observó estereodiferenciación en el proceso (Figura 7.14.A).

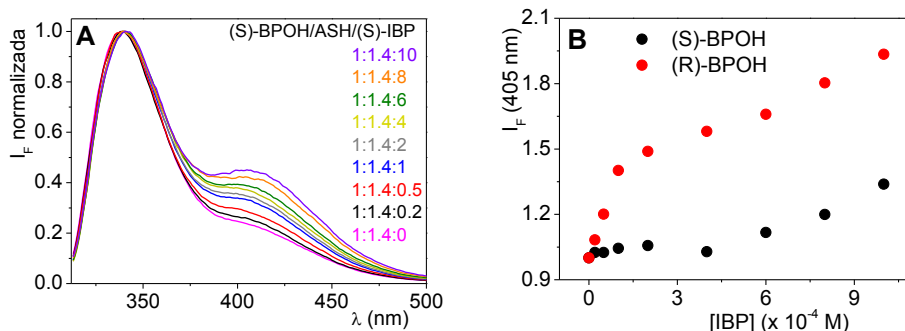


Figura 7.14. A: Espectros de fluorescencia normalizados de sistemas (S)-BPOH/ASH tras adición de cantidades crecientes de (S)-IBP. **B:** Curvas obtenidas representando el valor de intensidad de fluorescencia (I_F) a 405 nm vs. las distintas concentraciones de (S)-IBP presentes en cada sistema (S)- o (R)-BPOH/ASH/(S)-IBP; ($\lambda_{exc} = 308$ nm, aire, $[BPOH] = 10^{-4}$ M).

Por otra parte, las cinéticas de desaparición del triplete de BPOH en los sistemas BPOH/ASH obtenidas por fotólisis de destello láser (Figura 7.15) revelaron un aumento importante del tiempo de vida de triplete de BPOH en el interior de la proteína (19 μ s con ASH vs. 1.3 μ s en PBS). En cambio, no se observó diastereodiferenciación.

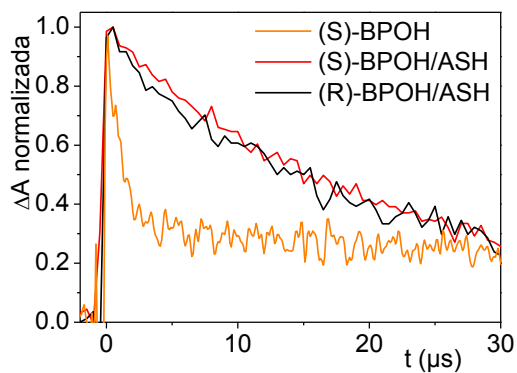


Figura 7.15. Cinéticas de desaparición monitorizadas a 380 nm obtenidas tras fotólisis de destello láser de (*S*)-BPOH y (*S*)- y (*R*)-BPOH en presencia de proteína (BPOH/ASH = 1:1, λ_{exc} = 308 nm, aire).

7.3. Conclusiones

Para los sistemas FBP/ASH las principales conclusiones obtenidas son:

Por comparación con los resultados obtenidos en el capítulo anterior para los sistemas modelo FBP-Trp, se ha probado que éstos son buenos modelos para simular las interacciones no covalentes en los sistemas supramoleculares fármaco@proteína. Las cinéticas de desaparición a $\lambda_{em} = 310$ nm revelan una desactivación dinámica de $^1ASH^*$, tanto en la escala de picosegundos (FU) como nanosegundos (TCSPC). El proceso de transferencia de energía desde $^1FBP^*$ a ASH es estereoselectivo. Las cinéticas de desaparición a $\lambda_{em} = 380$ nm, donde únicamente emite la proteína, son también dependientes de la configuración de FBP, aunque en menor medida. La desactivación puede ser debida a una transferencia electrónica y/o formación de excíplejo. Los valores obtenidos de anisotropía muestran que el microambiente proporcionado por la proteína, jugaba un papel importante en la relajación conformacional del FBP, siendo más eficiente para el enantiómero (*R*)-.

Para los sistemas BPOH/ASH las principales conclusiones obtenidas son:

La formación de un complejo BPOH@ASH está asociada a la aparición de una nueva banda de absorción a *ca.* 300 nm, cuya intensidad aumenta a concentraciones más elevadas de proteína y disminuye tras adición de (*S*)-IBP, como sonda desplazante del sitio II de

la ASH. Las medidas de fluorescencia constituyen una clara evidencia de la inhibición de la desprotonación en el estado excitado dentro de la cavidad hidrofóbica de la proteína, como muestra la marcada disminución de la banda del fenolato (a λ_{em} ca. 410 nm) en presencia de ASH. También se observa una marcada estereodiferenciación tanto en la formación del complejo en el estado fundamental como en la desprotonación en el estado excitado.

7.4. Parte experimental

7.4.1. Reactivos y disolventes

(S)- o (R)- Flurbiprofeno fue adquirido de Aldrich. (S)- o (R)- BPOH fue sintetizado como se detalla en el capítulo anterior. El acetonitrilo utilizado fue grado HPLC y adquirido de Merck. Las disoluciones de PBS 0.01 M (pH = 7.4) empleadas se obtuvieron por disolución de pastillas tampón fosfato adquiridas de Sigma disueltas en agua desionizada Milli-Q. La albúmina sérica humana fue adquirida de Sigma.

7.4.2. Medidas de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario y en tiempo resuelto (para los sistemas BPOH/ASH) se realizaron en atmósfera de nitrógeno o aire. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación (excepto en el caso de las disoluciones con ASH). Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C).

Para determinar el valor de los rendimientos cuánticos de fluorescencia se utilizó carprofeno en MeCN como referencia, con valor de $\phi_F = 0.05$ en nitrógeno.¹³

Los espectros de fluorescencia en tiempo resuelto de los sistemas FBP/ASH se realizaron en el Laboratoire Francis Perrin

(CNRS/IRAMIS/SPAM) CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette, Francia. Todas las muestras tuvieron la misma absorbancia (inferior a 0.2) a la longitud de onda de excitación. Las medidas de FU se realizaron en una celda de cuarzo 0.4 mm y las de TCSPC en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C) y en condiciones aeróbicas.

Para los estudios realizados en presencia de albúmina sérica, se prepararon una serie de disoluciones conteniendo (*S*) o (*R*)- BPOH en presencia de ASH, en un intervalo de relaciones molares comprendido entre 1:0.2 y 1:2 (disoluciones preparadas en PBS). Esta serie de disoluciones fueron preparadas como se detalla a continuación: sobre una disolución 1.0×10^{-4} M de (*S*) o (*R*)-BPOH se añadió una alícuota de una disolución 2.86×10^{-3} M de ASH; la mezcla resultante se guardó durante 15 horas a 4 °C para asegurar un completo equilibrio en la formación del complejo fármaco/proteína. Pasado este tiempo, la muestra se sometió a los experimentos de fluorescencia. A continuación, se describe de forma más detallada la preparación de la mezcla BPOH/ASH a una relación de concentración 1:1.5: sobre 1 mL de una disolución 1.0×10^{-4} M de BPOH en PBS se añadieron 104.9 µL de una disolución de ASH (2.86×10^{-3} M) en PBS y se enrasó con 930 µL de PBS. La disolución se mantuvo a 4 °C durante 15h. El procedimiento experimental seguido para el resto de mezclas BPOH/ASH (de 1:2 a 1:0.2) fue similar al explicado anteriormente.

En el caso de los sistemas (*S*) o (*R*)-FBP/ASH se procedió del mismo modo que para BPOH, pero a relaciones molares 0.7:1.

Para los estudios realizados en presencia de ibuprofeno, se procedió del mismo modo que en caso anterior. Se prepararon una serie de disoluciones en PBS conteniendo (*S*) o (*R*)- BPOH/ASH en presencia de (*S*)-IBP, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 1:0.2 y 1:10 como se detalla a continuación: sobre una disolución 1.0×10^{-4} M de (*S*) o (*R*)-BPOH se añadió una alícuota de una disolución 2.86×10^{-3} M de ASH; la mezcla resultante se guardó durante 5 horas a 4 °C para asegurar una situación de equilibrio en la formación del complejo ligando/proteína. Pasado este tiempo, se añadieron las alícuotas correspondientes de (*S*)-IBP 5.0×10^{-3} M y se guardaron las muestras durante 15 horas a 4 °C. Pasado ese tiempo la muestra se sometió a los experimentos de fluorescencia. A continuación, se describe de forma más detallada la preparación de la mezcla BPOH/ASH/IBP a una relación de concentración 1:1.4:1: sobre 1 mL de una disolución 1.0×10^{-4} M de BPOH en PBS se añadieron 100 μ L de una disolución de ASH (2.86×10^{-3} M) en PBS. La disolución se mantuvo a 4 °C durante 5h. A continuación se añadieron 40 μ L de una disolución de (*S*)-IBP (5.0×10^{-3} M) y se enrasó con 930 μ L de PBS. La disolución se mantuvo a 4 °C durante 15h. El procedimiento experimental seguido para el resto de mezclas BPOH/ASH/IBP (de 1:1.02 a 1:10) fue similar al explicado anteriormente.

7.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser

Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 308 nm, con una potencia de 30 mJ por pulso de láser. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.2. Las medidas se realizaron en atmósfera de aire o N₂ y en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22 °C).

Para preparar las disoluciones se procedió del mismo modo que en el caso de la fluorescencia.

7.4.4. Medidas de fosforescencia

Las medidas se realizaron en tubos de cuarzo que se introdujeron en nitrógeno líquido antes de medir. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.3. Las disoluciones fueron preparadas en etanol.

7.5. Referencias bibliográficas.

1. F. Lapicque, N. Muller, E. Payan, N Dubois, *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, 25, 115.
2. E. Alarcón, A. M. Edwards, A. Aspee, F. E. Moran, C. D. Borsarelli, E. A. Lissi, D. González-Nilo, H. Poblete, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 93.
3. M. Nishijima, T. Wada, T. Mori, T. C. S. Pace, C. Bohne, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3478.
4. T. Wada, M. Nishijima, T. Fujisawa, N. Sugahara, T. Mori, A. Nakamura, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7492.
5. R. Alonso, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Org. Lett.* **2011**, 13, 3860.
6. M. Marin, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 2910.
7. M. Marin, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, *Organic Letters* **2012**, 14, 1788.
8. V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Boscá, M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9538.
9. R. Alonso, M. Yamaji, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 11363.
10. I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, 1, 1015.
11. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition; Plenum Press: New York, **2006**.

12. A. Siemiarczuk, C. E. Petersen, C. E. Ha, J. Yang, N. V. Bhagavan, *Cell Biochem. Biophys.* **2004**, 40, 115.
13. B. Asíns-Fabra, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, 207, 52.
14. El pK_a de 2-hidroxibifenilo empleado para los cálculos está tomado de J. W. Bridges, P. J. Creaven, R. T. Williams, *Biochem. J.* **1965**, 96, 872.
15. M. Lukeman, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9458.
16. H. Mohan, O. Brede, J.P. Mittal, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, 140, 191.

Capítulo 8

Instrumentación

8.1. Instrumentación general

8.1.1. Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) se registraron utilizando un espectrómetro Varian Bruker de 300 MHz, utilizando como disolvente cloroformo o metanol deuterado. Los valores de desplazamiento químico (δ) son expresados en partes por millón (ppm), y son relativos a la señal del tetrametilsilano (TMS) o a la señal residual del cloroformo no deuterado a 7.26 ppm, escogidos como referencia. Para los espectros realizados en metanol deuterado, se usó como referencia la señal residual del metanol no deuterado a 3.3 ppm. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios (Hz).

8.1.2. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) fueron realizados en un espectrómetro XevoQToF (en modo de impacto electrónico, ESI⁺) en el ITQ de la Universitat Politècnica de València.

8.1.3. Espectros de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier FT/IR-460 Plus. Únicamente se han mostrado los desplazamientos de las principales bandas de absorción; ν (cm^{-1}).

8.1.4. Difracción de rayos-X

La difracción de rayos-X de monocristal se realizó en la Unidad de Rayos-X de la Universidad de Santiago de Compostela.

8.2. Instrumentación fotoquímica

8.2.1. Espectros de absorción ultravioleta-visible

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) se registraron utilizando dos equipos distintos. En unos casos se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 y en otros un espectrofotómetro Jasco V-630.

8.2.2. Irradiación fotoquímica en estado estacionario

La irradiación fotoquímica en estado estacionario de los compuestos se realizó en un fotorreactor multilámpara Luzchem, provisto de 10 lámparas, situando 5 de ellas en cada lateral del fotorreactor. Cada lámpara posee una potencia de 8 W. Las longitudes de onda de emisión máxima con las que se puede irradiar son de 254, 300 y 350 nm. El sistema posee un ventilador para la refrigeración de la muestra y un agitador magnético para favorecer la homogeneización de la misma.



Figura 8.1. Fotorreactor multilámpara.

8.2.3. Fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se llevaron a cabo utilizando dos equipos distintos según la longitud de onda de excitación seleccionada.

Los experimentos excitando a 266 ó 355 nm se llevaron a cabo utilizando un láser pulsado de Nd-YAG (Quantel Brilliant, donde los pulsos simples tienen una duración aproximada de 5 ns fwhm) acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 Luzchem. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de Xenón, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio Tektronix 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. El diámetro del punto de disparo en la cubeta es aproximadamente 4 mm.

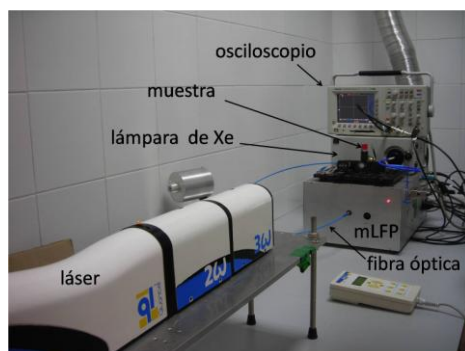


Figura 8.2. Equipo de FDL utilizado para excitar a 266 ó 355 nm.

Para los experimentos de fotólisis de destello láser excitando a 308 nm el sistema utilizado consistía en un láser pulsado de excímero de XeCl (Spectron Láser Systems, Warwick, RI), lámpara de Xenón Oriel Lo255 (Stratford, CT), un monocromador Oriel 77200, un sistema fotomultiplicador Oriel (PMT) formado por un tubo lateral 77348 PMT, una carcasa 70680 PMT, una fuente de potencia 70705 PMT y un osciloscopio Tektronix TDS-640A, (Köln, Germany).

8.2.4. Fluorescencia

Para los experimentos de fluorescencia en estado estacionario se utilizó un espectrofluorímetro de Photon Technology International (PTI), modelo LPS-220B, equipado con una lámpara de Xenón de 75 W, provisto de un monocromador tipo Czerny-Turner, modelo 101 y un detector Photomultiplier Detection System, modelo 814.

Las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron con tres equipos:

- Fluorescencia de tiempo resuelto en la escala de nanosegundos para especies con tiempos de vida superiores a 1.8 ns.
- Fluorescencia de suma de frecuencias (FU, Fluorescence Upconversion), con resolución de femtosegundos.

- Recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC, Time-Correlated Single PhotonCounting), con resolución de nanosegundos.

Las medidas de fluorescencia de tiempo resuelto en la escala de nanosegundos para especies con tiempos de vida superiores a 1.8 ns se realizaron mediante un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) modelo TM-2/2003 equipado con una lámpara de H₂/N₂ (50/50, duración del pulso de 1.8 ns) y un detector estroboscópico.

Las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron mediante las técnicas de FU y TCSPC en el Laboratoire Francis Perrin del CNRS, IRAMIS, SPAM en Gif-sur-Yvette, Francia.

Ambas técnicas utilizan como fuente de excitación el tercer armónico (267 nm) de un láser de modos fijos Ti-Sapphire (Coherent MIRA 900), bombeado por un láser de estado sólido (Coherent INNOVA 310, 8 W), donde los pulsos tienen una duración aproximada de 120 fs y una potencia de 1 W a 802 nm. La frecuencia de repetición es de 76 y 4.75 MHz para FU y TCSPC, respectivamente.

En la técnica de FU, la generación del tercer armónico se realiza mediante dos cristales BBO de tipo I de 1 mm de espesor (Fujian Institute) y espejos esféricos de 100 mm. La potencia media a 267 nm es de 50 mW y la densidad de potencia del pico de 0.2 GW/cm². La fluorescencia se recoge en espejos parabólicos (Janos), se pasa a través de un filtro de vidrio (Schott) de 1 mm WG 320 ó WG 305 con el fin de

suprimir la longitud de onda de excitación. Posteriormente, los fotones emitidos se focalizan en un cristal BBO tipo I de 1 mm de espesor (Fujian Institute) junto con el haz residual de la radiación fundamental (802 nm) con el fin de generar la suma de frecuencias (SF) de radiación. La radiación resultante (215-250 nm) se centra en la rendija de entrada de un monocromador de rejilla doble (SPEX 1680) y detectada por un fotomultiplicador R1527P (Hamamatsu) conectado a un lock-in contador de fotones (Stanford SR400). La resolución espectral se ajusta a 4 nm. La potencia de excitación media utilizada es de 40 mW. La densidad de potencia no puede medirse con precisión dentro del volumen de excitación pero está estimado en 0.2 ± 0.1 GW/cm² para una salida de 40 del tercer armónico (suponiendo un diámetro de 40 micrones del haz focalizado). El valor de fwhm de la función gaussiana de aparato es de aproximadamente 350 fs. Puede considerarse que la resolución temporal es mejor que 100 fs tras deconvolución, dependiendo de la relación señal/ruido. Las disoluciones (aproximadamente 25 ml) se mantienen en un sistema de flujo continuo y pasan a través de una celda de cuarzo 0.4 mm, que a su vez se mantiene en movimiento continuo perpendicular al haz de excitación con el fin de minimizar los efectos térmicos. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$) en condiciones aeróbicas.

La técnica de TCSPC utiliza una tarjeta de Becker & Hickl GmbH PC. Se coloca un filtro Schott WG 295 en frente de un monocromador SPEX para eliminar el haz de excitación. El detector está formado por una placa de microcanales (R1564 U Hamamatsu) que proporciona una

función de respuesta instrumental de 60 ps (fwhm). La potencia media del láser (0.1 mW) se mide con un medidor de potencia de banda ancha MellesGriot. El área irradiada en la superficie de la celda es de *ca.* 0.2 cm² lo cual corresponde a una intensidad de pulso de 2.4 kW/cm². Las medidas se realizan en celdas de cuarzo de 10 mm × 10 mm que están en continua agitación. Normalmente se registran sucesivas cinéticas de desaparición con la misma muestra con el fin de mejorar la relación señal/ruido y para asegurar que las señales medidas no se ven alteradas por la acumulación de fotoproductos.

En ambas técnicas de FU y TCSPC se pueden realizar medidas de excitación/detección de forma paralela ($I_{par}(t)$) y perpendicular ($I_{perp}(t)$), con el fin de estudiar efectos anisotrópicos en las cinéticas de desaparición. Para ello, la polarización del haz de excitación se controla con un polarímetro. A partir de estas medidas, la anisotropía de fluorescencia se puede calcular a partir de la ecuación (8.1):

$$r(t) = \frac{I_{par}(t) - RI_{perp}(t)}{I_{par}(t) + 2RI_{perp}(t)} \quad (8.1)$$

Si la transmisión en condiciones paralelas y perpendiculares es idéntica, no se aplica el factor de corrección R, que en nuestro caso es igual a la unidad.

8.2.5. Fosforescencia

Los espectros de emisión de fosforescencia se registraron en un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) modelo TM-2/2003 equipado con una lámpara de Xenón.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en la presente tesis son las siguientes:

- A) La espectroscopía de absorción transitoria ha mostrado ser una herramienta muy útil para investigar la formación y desaparición de estados excitados singlete generados por aniquilación triplete-triplete tras una transferencia de energía desde un sensibilizador excitado selectivamente. La emisión de la fluorescencia retardada se observa en forma de banda negativa en la escala de los microsegundos en el espectro de absorción transitoria. En el caso de sistemas formados por benzofenona y naftaleno quirales, se observa estereodiferenciación en las cinéticas obtenidas tras la transferencia de energía T-T, tanto para la desaparición del triplete del cromóforo de naftaleno a través de la formación de excíplejos como para la emisión de fluorescencia del estado excitado singlete del naftaleno.
- B) El estado excitado triplete del cromóforo NPT en los pseudopéptidos PSP-1 y PSP-2 es una sonda apropiada para las interacciones entre estos pseudopéptidos y sistemas mono- o bicromofóricos conteniendo cromóforos dadores de energía como BZP y/o BPN. La presencia del macrociclo o las subestructuras de cadena lateral en los pseudopéptidos tienen una gran influencia sobre las desactivaciones dinámicas de los diversos tripletes estudiados, retardando tanto los procesos de transferencia de energía como las desactivaciones de triplete de

NPT mediante la formación de excíplejo. Por otro lado, únicamente se observa la fluorescencia retardada resultado de la aniquilación triplete-triplete en el caso de los sistemas BZP-BPN/NPT donde el cromóforo de NPT es el compuesto modelo DMN.

- C)** Las interacciones entre los estados excitados de los cromóforos FBP y dThd se observan sólo cuando ambos se encuentran covalentemente unidos. En principio, las diadas FBP-dThd parecen modelos apropiados para anticipar la naturaleza de las interacciones no covalentes entre FBP y ADN en el estado excitado. Así, tras excitación en el UVC, el estado excitado singlete del FBP resultante podría inyectar carga negativa a una timina cercana, y el exceso de electrones podría viajar a través de la doble hélice de ADN, alcanzando una base distante o eventualmente reparando lesiones de bupirimidina.
- D)** Se ha demostrado que las diadas FBP-Trp, donde fármaco y aminoácido están covalentemente unidos, son buenos modelos para simular las interacciones no covalentes de los sistemas supramoleculares fármaco/proteína.
- E)** Para las diadas conteniendo un grupo fenólico, la presencia de éste modifica sustancialmente los fotoprocesos observados, siendo el bifenilo el cromóforo emisor. La desactivación de

fluorescencia es dinámica y estereoselectiva. En los correspondientes sistemas intermoleculares se observa la formación de un complejo en el estado fundamental y la inhibición del proceso de desprotonación fenólica en el interior de la proteína.

Resúmenes

Resumen en castellano

La espectroscopía de absorción transitoria ha resultado ser una herramienta útil para investigar la formación y desaparición de estados excitados singlete formados por aniquilación triplete-triplete, tras sensibilización. De este modo, tras excitar selectivamente BZP a 355 nm en presencia de NPT, se detectó mediante espectroscopía de absorción transitoria una banda negativa centrada a 340 nm, cuya formación y desaparición ocurría en la escala de los microsegundos. Esta banda fue asignada como fluorescencia retardada tipo P de NPT. En el caso de sistemas BZP/NPT quirales, se observó estereodiferenciación en las cinéticas de los procesos fotofísicos implicados.

Se ha profundizado en el comportamiento del estado excitado triplete de pseudopéptidos basados en naftaleno en presencia de benzofenona y/o bifenilo, como cromóforos dadores de energía. Este comportamiento ha sido comparado con el del compuesto modelo DMN. En todos los casos, la absorción triplete-triplete de NPT se ha detectado por espectroscopía de absorción transitoria, tras excitación selectiva de benzofenona a 355 nm. Las cinéticas de desaparición y formación de estas especies resultaron ser menores en los PSP, debido a que son más lentos los procesos de transferencia de energía triplete-triplete y formación de exciplejos. La fluorescencia retardada detectada en el modelo de naftaleno no fue observada en los PSP.

Se han estudiado las interacciones entre FBP y dThd unidos covalentemente, formando diadas (*S*)- o (*R*)-FBP-dThd. En ellas, la única

especie que emisor fue $^1\text{FBP}^*$, pero con rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia menores que los de FBP libre en disolución. Estos resultados indican una desactivación dinámica debida a una transferencia electrónica o formación de exciplexo, donde FBP es la especie dadora de carga. En acetonitrilo, ambos mecanismos resultaron favorables, mientras que en dioxano predominó la formación de exciplexo. El enantiómero (*S*)- presentó valores más bajos de ϕ_F y τ_F que su análogo (*R*)- indicando que la disposición espacial de ambos cromóforos desempeñaba un papel importante. El rendimiento cuántico de triplete de las diadas resultó ser mayor que el esperado únicamente a partir de los ϕ_{CIS} de $^1\text{FBP}^*\text{-dThd}$, siendo $\phi_T((S)-) > \phi_T((R)-)$. Este hecho se pudo explicar debido a una recombinación de carga del par de iones radicales y/o exciplexos, que podrían depender de factores geométricos. El tiempo de vida de las diadas resultó ser similar al de FBP libre, indicando ausencia de interacción en el estado excitado triplete.

Con el propósito de estudiar las interacciones fármaco/proteína se sintetizaron diadas conteniendo un derivado de bifenilo unido covalentemente a triptófano. En el caso de las diadas FBP-Trp se observó una notable desactivación de la fluorescencia, cuya emisión fue asignada al residuo de Trp. Esta desactivación se asignó a una TESS desde $^1\text{FBP}^*$ a Trp que resultó ser muy rápida y estereoselectiva, con una constante de desactivación mayor para el diastereómero (*R,S*)-FBP-Trp. A escalas de tiempo mayores, se observó una desactivación, también estereoselectiva, de la fluorescencia de $^1\text{Trp}^*$ debido a una transferencia de electrón y/o la formación de un exciplexo.

Para el caso de los sistemas BPOH-Trp, la sustitución de F por OH en FBP produjo una disminución de la E_S . La emisión en las diadas fue asignada al residuo de BPOH, este hecho fue debido a una TESS desde $^1\text{Trp}^*$ a BPOH. Se observó una marcada desactivación en las diadas, que resultó ser estereoselectiva, con k_D mayor para el diastereómero (*S,R*)-. La desactivación se explica por transferencia de electrón intramolecular y/o formación de un exciplexo. El diastereómero (*S,R*)- presentó una conformación plegada que justifica los valores obtenidos de ϕ_F y τ_F , siendo éstos menores para la diada (*S,R*)- que para la (*S,S*)-. El tiempo de vida de las diadas resultó inferior al de BPOH, confirmando que la desactivación de las primeras era de naturaleza dinámica.

Por otro lado, se estudiaron las interacciones entre derivados de bifenilo y ASH. En el caso de los sistemas FBP/ASH las cinéticas de desaparición a $\lambda_{em} = 310$ nm revelaron una desactivación dinámica de $^1\text{ASH}^*$, tanto en la escala de picosegundos (FU) como nanosegundos (TCSPC). El proceso de transferencia de energía desde $^1\text{FBP}^*$ a la ASH resultó ser estereoselectivo. Las cinéticas de desaparición a $\lambda_{em} = 380$ nm, donde únicamente emite la proteína, también fueron dependientes de la configuración de FBP, aunque en menor medida. La desactivación puede ser debida a una transferencia electrónica y/o formación de exciplexo.

Se ha caracterizado fotofísicamente BPOH en ausencia de proteína; el espectro de emisión de fluorescencia en medio acuoso presentó dos bandas, una a 332 nm correspondiente a $^1\text{BPOH}^*$ y otra a 414 nm correspondiente a $^1(\text{BPOH}^-)^*$. En presencia de ASH se detectó la

formación de un complejo BPOH@ASH en el estado fundamental (máximo a *ca.* 300 nm), cuya intensidad se veía aumentada a concentraciones más elevadas de proteína. Tras adición de ASH se observó una disminución de la banda de emisión del fenolato (a λ_{em} *ca.* 410 nm), confirmando la inhibición de la desprotonación en el estado excitado dentro de la cavidad hidrofóbica de la proteína. Tras adición de (S)-IBP, como sonda desplazante del sitio II de ASH la banda correspondiente al complejo BPOH@ASH disminuyó significativamente; en cambio, reapareció la banda correspondiente al fenolato. También se observó una gran estereodiferenciación tanto en la formación del complejo en el estado fundamental como en la desprotonación en el estado excitado. En el espectro de absorción transitoria de BPOH se observó una banda centrada a 380 nm correspondiente a su estado excitado triplete; en presencia de ASH el tiempo de vida del mismo aumentó de 1.3 a 19 μ s; en este caso no se observó diastereodiferenciación.

Resum en valencià

L'espectroscòpia d'absorció transitòria ha demostrat ser una eina útil per a investigar la formació i desaparició d'estats excitats singlet formats per aniquilació triplet-triplet, després de sensibilització. Així, després d'excitar selectivament BZP a 355 nm en presència de NPT, va ser detectat mitjançant espectroscòpia d'absorció transitòria una banda negativa centrada a 340 nm, la formació i desaparició es produïa en l'escala dels microsegons. Aquesta banda va ser assignada a fluorescència retardada de tipus P de NPT. En el cas de sistemes de BZP/NPT quirals, es va observar estereodiferenciació en les cinètiques dels processos fotofísics implicats.

S'ha aprofundit en el comportament de l'estat excitat triplet de pseudopèptids basats en naftalè en presència de benzofenona o bifenil com a cromòfors dadors d'energia. Aquest comportament ha estat comparat amb el compost model DMN. En tots els casos, l'absorció triplet-triplet de NPT s'ha detectada per espectroscòpia transitòria, després d'excitació selectiva de benzofenona a 355 nm. Les cinètiques de desaparició i formació d'aquestes espècies varen ser menors als PSP, degut a que els processos de transferència d'energia triplet-triplet i la formació de exciplexes són més lents. La fluorescència retardada detectada al model de naftalè no va ser observada als PSP.

Hem estudiat interaccions entre FBP i dThd units covalentment, formant diades (*S*)- o (*R*)-FBP-dThd. En elles, l'única espècie emissora era $^1\text{FBP}^*$, però amb rendiments quàntics i temps de vida de fluorescència

menors que els de FBP lliure en dissolució. Aquests resultats indiquen una desactivació dinàmica a causa d'una transferència electrònica o formació d'excíplexe, on FBP és l'espècie dadora de càrrega. En acetonitril, els dos mecanismes són favorables, mentre que en dioxà predomina la formació d'excíplexe. L'enantiòmer (*S*)- va presentar valors de τ_F i ϕ_F més baixos que el seu anàleg (*R*)- indicant que la disposició espacial dels dos cromòfors va jugar un paper important. El rendiment quàntic de triplet de les diades va ser major que l'esperat només tenint en compte els ϕ_{CIS} de $^1\text{FBP}^*\text{-dThd}$, on $\phi_T((S)-) > \phi_T((R)-)$. Aquest fet podria explicar-se per la recombinació de càrrega del parell d'ions radicals i/o excíplexes, que podrien dependre de factors geomètrics. El temps de vida de les diades va resultar ser similar a la de FBP lliure, indicant l'absència d'interacció a l'estat excitat triplet.

Amb la finalitat d'estudiar les interaccions fàrmac/proteïna es van sintetitzar diades contenint un derivat de bifenil unit covalentment a triptòfan. En el cas de les diades FBP-Trp es va observar una notable desactivació de la fluorescència, l'emissió va ser assignada al residu de Trp. Aquesta desactivació va ser assignada a una TESS des de $^1\text{FBP}^*$ a Trp que va ser molt ràpida i estèreoselectiva, amb una constant de desactivació major per al diastereòmer (*R,S*)-FBP-Trp. A escales de temps majors, es va observar una desactivació, també estèreoselectiva, de la fluorescència de $^1\text{Trp}^*$ a causa d'una transferència d'electrons i/o la formació d'un excíplexe.

En el cas dels sistemes BPOH-Trp, la substitució de F per OH al FBP va produir un descens de la E_S . L'emissió en les diades va ser

assignada al residu BPOH, aquest fet es va deure a una TESS des de $^1\text{Trp}^*$ a BPOH. Es va observar una marcada desactivació de les diades, que va resultar ser estèreoselectiva, amb k_D major pel diastereòmer (*S,R*)-. La desactivació s'explica per la formació d'un exciplexe i/o transferència d'electró intramolecular. EL diastereòmer (*S,R*)- va presentar una conformació doblegada que justifica els valors de τ_F i ϕ_F , aquestos van ser menors per a la diada (*S,R*)- que per a la (*S,S*)-. El temps de vida de les diades va ser inferior que BPOH, confirmant que la desactivació de les primeres era de natura dinàmica.

D'altra banda, es van estudiar les interaccions entre els derivats de bifeníl i ASH. En el cas dels sistemes FBP/ASH la cinètica de desaparició a $\lambda_{em} = 310$ nm va posar de manifest una desactivació dinàmica de $^1\text{ASH}^*$, tant en l'escala dels ps (FU) com ns (TCSPC). El procés de transferència d'energia de $^1\text{FBP}^*$ a ASH va ser estèreoselectiu. Les cinètiques de desaparició a $\lambda_{em} = 380$ nm, on només emet la proteïna, eren també dependents de la configuració de FBP, encara que en menor mesura. La desactivació pot ser deguda a una transferència electrònica i/o formació d'exciplexe.

Ha estat caracteritzat fotofísicament BPOH en absència de proteïna; l'espectre d'emissió de fluorescència en medi aquós va presentar dos bandes, una a 332 nm corresponent a $^1\text{BPOH}^*$ i l'altra a 414 nm corresponent a $^1(\text{BPOH}^-)^*$. En presència d'ASH es va detectar la formació d'un complex BPOH@ASH a l'estat fonamental (màxim a *ca.* 300 nm), la intensitat va augmentar a concentracions més altes de proteïna. Després de l'addició d'ASH es va observar una reducció de la

banda d'emissió del fenolat (a λ_{em} ca. 410 nm), confirmant la inhibició de la desprotonació a l'estat excitat dins de la cavitat hidrofòbica de la proteïna. Després d'afegir (*S*)-IBP, com sonda de desplaçament del lloc II de ASH la banda corresponent al complex BPOH@ASH havia disminuït significativament; d'altra banda, va reaparèixer el grup corresponent al fenolat. També es va observar una gran estereodiferenciació en la formació del complex a l'estat fonamental com a la deprotonació a l'estat excitat. A l'espectre d'absorció transitòria de BPOH es va observar una banda centrada a 380 nm, corresponent al seu estat excitat triplet; en presència d'ASH el temps de vida va augmentar de 1.3 a 19 μ s; en aquest cas no es va observar cap diastereodiferenciació.

Abstract in English

Transient absorption spectroscopy has proven to be a powerful tool to investigate the formation and decay of excited singlet states upon triplet-triplet annihilation, following T-T energy transfer from a selectively excited sensitizer. Thus, upon excitation of benzophenone (BZP) by laser flash photolysis (LFP) at $\lambda = 355$ nm in the presence of naphthalene (NPT), a negative band centred at 340 nm has been detected, with growth and decay in the microsecond timescale. It has been assigned to the P-type NPT delayed-fluorescence. In the case of chiral BZP/NPT systems, stereodifferentiation has been observed in the kinetics of the involved photophysical processes.

The triplet state behavior of naphthalene-based pseudopeptides has been investigated in the presence of benzophenone and/or biphenyl, as suitable energy donating chromophores. Their behavior has been compared with that of 1,4-dimethylnaphthalene as model compound. In all cases, the triplet-triplet absorption of naphthalene was detected by transient absorption spectroscopy, upon selective excitation of benzophenone at 355 nm. The kinetics of formation and decay of this species was markedly slower in the pseudopeptides, due to retardation of triplet-triplet energy transfer and exciplex formation. The delayed fluorescence detected in the model naphthalene was absent in the pseudopeptides.

Excited state interactions between (*S*)- or (*R*)-FBP and dThd covalently linked in dyads have been investigated. In both dyads, the

only emitting species was $^1\text{FBP}^*$, but with a lower fluorescence quantum yield (ϕ_F) and a shorter fluorescence lifetime (τ_F) than when free in solution. These results indicated that dynamic quenching occurred either by electron transfer or *via* exciplex formation, with FBP as the charge donating species. In acetonitrile both mechanisms were favored, while in dioxane exciplex formation was predominating. Isomer (*S*)- displayed lower values of ϕ_F and τ_F than its (*R*)- analog, indicating that the relative spatial arrangement of the chromophores plays a significant role. The triplet quantum yields (ϕ_T) of the dyads were significantly higher than the expectations based solely on $^1\text{FBP}^*$ -dThd intersystem crossing quantum yields (ϕ_{ISC}), with ϕ_T (*S*)- $>$ ϕ_T (*R*)-. This could be explained in terms of intramolecular charge recombination at the radical ion pairs and/or the exciplexes, which would be again dependent on geometrical factors. The triplet lifetimes (τ_T) of $^3\text{FBP}^*$ -dThd and free $^3\text{FBP}^*$ were similar, indicating the lack of excited state interactions at this stage. The FBP-dThd dyads could, in principle, constitute appropriate model systems for the elucidation of the excited state interactions in non-covalent DNA-ligand complexes.

In order to study drug/protein interactions, biphenyl derivatives and tryptophan were covalently linked to provide model dyads. In FBP-Trp dyads, a dramatic fluorescence quenching was observed, and the residual emission was assigned to the Trp unit. This quenching was assigned to an ultrafast ($k > 10^{10} \text{ s}^{-1}$) and stereoselective energy transfer from $^1\text{FBP}^*$ to Trp, with a higher rate constant for the (*R,S*)-diastereomer. At longer timescales, stereoselective quenching of $^1\text{Trp}^*$

fluorescence was also noticeable, due to intramolecular electron transfer and/or exciplex formation.

In BPOH-Trp systems, attachment of a hydroxy group at the ortho position of biphenyl resulted in a significant decrease of its singlet energy. A dramatic fluorescence quenching was observed, which displayed a residual emission assigned to the BPOH unit. This result was explained by a stereoselective energy transfer from $^1\text{Trp}^*$ to BPOH, with a higher rate constant for the (*S,R*)-diastereomer, followed by $^1\text{BPOH}^*$ quenching due to intramolecular electron transfer and/or exciplex formation. The (*S,R*)-diastereomer exhibited a folded conformation in the solid state, which is in good agreement with the steady-state and time-resolved observations of lower ϕ_F and shorter τ_F values for the (*S,R*)-diastereomer. The fluorescence lifetime was slower in the dyads than in (*S*)-BPOH, confirming a dynamic quenching.

In FBP/HSA systems, the decays at $\lambda_{em} = 310$ nm (FBP emission maximum) revealed a configuration-dependent dynamic quenching due to energy transfer, both on the picosecond (FU) and the nanosecond time scales. The kinetic stereodifferentiation was still evident at longer wavelengths (380 nm), where only HSA is emitting. The nature of this quenching was again attributed to a stereoselective electron transfer and/or exciplex formation in the supramolecular systems.

Photophysical characterization of BPOH in aqueous media revealed two emission maxima, one at 332 nm corresponding to $^1\text{BPOH}^*$ and the other at 414 nm corresponding to phenolate BPO^- emission. In the presence of HSA, a light absorbing ground state

complex BPOH@HSA was detected (maximum at *ca.* 300 nm), whose intensity increased with increasing protein concentration. The fluorescence spectra of (*S*)-BPOH in PBS, after addition of HSA, revealed a progressive diminution of the phenolate band, indicating that excited state deprotonation is disfavored within the hydrophobic protein cavities. A similar trend was observed for (*R*)-BPOH, but the extent of deprotonation was significantly lower for this enantiomer. Addition of increasing amounts of the site II displacement probe (*S*)-IBP to BPOH@HSA led to a significant decrease of the absorption maximum at *ca.* 300 nm and to a recovery of the phenolate emission band at *ca.* 410 nm, which were again configuration-dependent. The transient absorption spectrum of (*S*)-BPOH consisted on a broad band centered at 380 nm, attributed to the first triplet excited state. A dramatic enhancement of the triplet lifetimes within HSA was observed (19 μ s within protein vs. 1.3 μ s in bulk PBS), although no stereodifferentiation was noticed in this case.

Anexo I

Participación en
congresos

1. Autores: P. Bonancía, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: EXCITED STATE INTERACTIONS IN BIPHENYL-TRYPTOPHAN DYADS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: IX CONGRESO DE FOTOQUÍMICA

Lugar de celebración: Leioa- (País Vasco)

Año: 2009

2. Autores: P. Bonancía, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF BIPHENYL-TRYPTOPHAN
DYADS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: XXIII IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY

Lugar de celebración: Ferrara (Italia)

Año: 2010

3. Autores: P. Bonancía, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF BIPHENYL-TRYPTOPHAN
DYADS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: VII SIMPOSIO DE INVESTIGADORES JÓVENES RSEQ-SIGMA
ALDRICH

Lugar de celebración: Valencia

Año: 2010

4. Autores: P. Bonancía, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: INTRAMOLECULAR TRIPLET ENERGY TRANSFER IN BENZOPHENONE-BIPHENYL DYADS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: XXXIII REUNIÓN BIENAL DE LA RSEQ

Lugar de celebración: Valencia

Año: 2011

5. Autores: P. Bonancía, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: PHOTOPHYSICAL BEHAVIOR OF SYSTEMS CONTAINING BENZOPHENONE AND NAPHTHALENE CHROMOPHORES

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: III JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA

Lugar de celebración: Granada

Año: 2011

6. Autores: I. Vayá, P. Bonancía, M. J. Climent, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez, M. A. Miranda

Título: EXCITED STATE INTERACTIONS IN DIASTEREOMERIC FLURBIPROFEN-THYMINE DYADS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: XXIV IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY

Lugar de celebración: Coimbra (Portugal)

Año: 2012

7. Autores: M. C. Jiménez, P. Bonancía, L. Vigarra, F. Galindo, S. V. Luis, M. A. Miranda

Título: TRIPLET EXCITED STATE BEHAVIOR OF NAPHTHALENE-BASED PSEUDOPEPTIDES IN THE PRESENCE OF ENERGY DONORS

Tipo de participación: comunicación en póster

Congreso: XXIV IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY

Lugar de celebración: Coimbra (Portugal)

Año: 2012

Anexo II

Publicaciones

1. P. Bonancía, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Transient Absorption Spectroscopy Detection of Sensitized Delayed Fluorescence in Chiral Benzophenone/Naphthalene Systems". *Chem. Phys. Lett.* 2011, *515*, 194-196.
2. P. Bonancía, L. Vígara, F. Galindo, S. V. Luis, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Triplet Excited State Behavior of Naphthalene-Based Pseudopeptides in the Presence of Energy Donors". *J. Phys. Chem. B* 2012, *116*, 9957-9962.
3. P. Bonancía, I. Vayá, M. J. Climent, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Excited State Interactions in Diastereomeric Flurbiprofen-Thymine Dyads". *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 8807-8814.
4. I. Vayá, P. Bonancía, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Excited State Interactions between Flurbiprofen and Tryptophan in Drug@Protein Complexes and in Model Dyads. Fluorescence Studies from the Femtosecond to the Nanosecond Time Domain". Enviado a *Phys. Chem. Chem. Phys.*, ref. CP-ART-10-2012-043847.

5. P. Bonancía, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Intraprotein Formation of a Long Wavelength Absorbing Complex and Inhibition of Excited State Deprotonation in a Chiral Hydroxybiphenyl". Aceptado en *J. Phys. Chem. B*, ref. *jp-2012-105875*.

6. P. Bonancía, I. Vayá, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. "Stereodifferentiation in the Excited State Interactions in Hydroxybiphenyl-Tryptophan Dyads". *Enviado a Org. Biomol. Chem.*, ref. *OB-ART-11-2012-027278*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Transient absorption spectroscopy detection of sensitized delayed fluorescence in chiral benzophenone/naphthalene systems

Paula Bonancía, M. Consuelo Jiménez*, Miguel A. Miranda*

Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química, UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46071 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 July 2011
In final form 29 August 2011
Available online 9 September 2011

ABSTRACT

Transient absorption spectroscopy has proven to be a powerful tool to investigate the formation and decay of excited singlet states upon triplet–triplet annihilation, following T–T energy transfer from a selectively excited sensitizer. Thus, upon selective excitation of benzophenone (BZP) by laser flash photolysis (LFP) at $\lambda = 355$ nm in the presence of naphthalene (NPT), a negative band centered at 340 nm has been detected, with growth and decay in the microsecond timescale. It has been assigned to the P-type NPT delayed-fluorescence. In the case of chiral BZP/NPT systems, stereodifferentiation has been observed in the kinetics of the involved photophysical processes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Benzophenone (BZP) and naphthalene (NPT) are classical textbook examples of photoactive chromophores, which can undergo a number of photophysical and photochemical processes [1,2]. Transient species generated upon excitation of BZP and NPT are detectable by the usual emission or absorption spectroscopies, and their main features have been described in detail [3–21].

Specifically, BZP exhibits several remarkable characteristics that make it very useful for photochemical studies. Thus, the presence of an absorption band at $\lambda > 320$ nm allows selective BZP excitation in the presence of a large number of organic substrates (and therefore its use as photosensitizer); besides, the intersystem crossing quantum yield (ϕ_{ISC}) is close to the unity, which makes BZP a suitable ‘triplet source’ for T–T energy transfer to substrates with lower triplet energy (E_T). On the other hand, both the lowest triplet excited state (nn^* , $E_T = 69$ kcal/mol, $\lambda = 520$ – 530 nm) and the benzhydryl radical ($\lambda = 550$ nm) are observable in the transient absorption spectrum obtained upon laser flash photolysis (LFP) in acetonitrile [22].

Concerning NPT, emission from the first singlet excited state ($^1NPT^*$, $E_S = 92$ kcal/mol, $\phi_F = 0.19$ – 0.21) is centered at 350 nm, although longer-wavelength fluorescence from NPT excimers has also been reported. Intersystem crossing (ca 0.75) leads to $^3NPT^*$, which exhibits a maximum at 410–430 nm in the LFP spectrum [22,23]. Under specific experimental conditions, the radical cation (NPT^+) can also be detected (685 nm) [24]. Delayed P-type fluorescence in NPT derivatives may arise from interaction of two molecules in the triplet state ($^3NPT^* + ^3NPT^*$, triplet–triplet

annihilation) thus producing one NPT molecule in the excited singlet state. The lifetime of this process, which is usually observed by emission measurements upon direct irradiation of NPT, is half the value of that found for the concomitant phosphorescence [25].

Photoprocesses occurring in systems containing both chromophores have attracted considerable attention in the past. Upon long-wavelength excitation of BZP in the presence of NPT, the expected intermolecular T–T energy transfer from $^3BZP^*$ to NPT does actually take place. In addition, formation of $^3(BZP/NPT)^*$ triplet exciplexes constitutes an efficient channel for $^3NPT^*$ deactivation [26]. Bichromophoric compounds containing covalently linked BZP and NPT units have also been investigated; similar deactivation pathways have been proposed for these dyads, albeit with kinetics markedly faster than in the intermolecular case [27].

In the present work, we wish to report on the direct LFP observation of the characteristic $^1NPT^*$ emission in the microsecond time domain, upon selective excitation of the nn^* carbonyl band in BZP/NPT systems, as well as on the stereodifferentiation in the kinetics of the involved photophysical processes. Benzophenone (**1a**) and (S)-, (R)-ketoprofen (**1b**) have been employed as sensitizers, while naphthalene (**2a**) and (S)- or (R)-1-(1-naphthyl)ethylamine (**2b**) have been chosen as triplet energy acceptors (Chart 1).

2. Results and discussion

2.1. Benzophenone/naphthalene systems

The UV–Vis absorption spectrum of **1a** in acetonitrile (2.6×10^{-3} M) did not show any noticeable change at $\lambda > 330$ nm after addition of increasing amounts of **2a** up to 4.0×10^{-4} M. Thus, upon long-wavelength photolysis of **1a/2a** mixtures, the BZP chromophore is selectively excited. The transient absorption spectrum ($\lambda_{exc} = 355$ nm) of **1a** under N_2 exhibited the

* Corresponding authors. Fax: +34 963877809.

E-mail addresses: mcjimene@qim.upv.es (M. Consuelo Jiménez), mmiranda@qim.upv.es (M.A. Miranda).

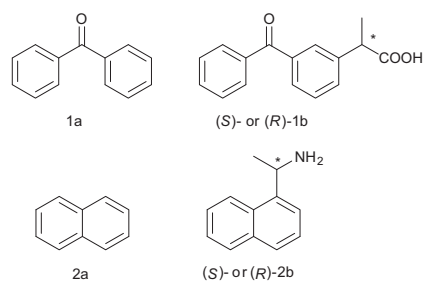


Chart 1. Chemical structures of the benzophenones and naphthalenes studied in this work.

characteristic band centered at 530 nm ($\tau_T = 1.7 \mu\text{s}$) due to $^3\text{BZP}^*$, whereas in the presence of **2a**, the LFP trace presented additional features.

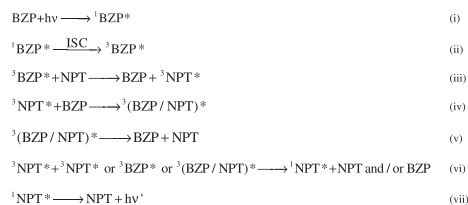
Under these conditions, the band peaking at 525 nm due to $^3\text{BZP}^*$ was efficiently quenched through T-T energy transfer ($k_q = 9.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), leading to $^3\text{NPT}^*$ ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$). Expectedly, the process was faster at higher **2a** concentrations (Figure 1A). The growth and decay of the 420 nm band is clearly visible in Figure 1B for $[\mathbf{2a}] = 2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Remarkably, the most relevant observation was the presence of a negative band centered at 340 nm, corresponding to an emitting transient species with growth and decay in the microsecond time-scale. In order to ascertain the nature of this new transient, the photophysical pathways occurring upon selective BZP excitation in the presence of NPT were considered (Scheme 1).

Thus, excitation of **1a** to its first singlet excited state (i) is followed by a very efficient intersystem crossing (ii), affording $^3\mathbf{1a}^*$ ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$). Triplet–triplet energy transfer from $^3\mathbf{1a}^*$ to **2a** affords $^3\mathbf{2a}^*$ (iii), observed at 420 nm. Deactivation of $^3\mathbf{2a}^*$ can take place through an exciplex with **1a** (iv + v). Collision of two triplets could lead to $^1\mathbf{2a}^*$ (vi). Since, according to Scheme 1, $^1\mathbf{2a}^*$ would be generated from a long-lived triplet precursor, its radiative decay to the ground state would occur as a P-type delayed fluorescence (vii).

2.2. Ketoprofen/1-(1-naphthyl)ethylamine systems

Looking for a possible stereodifferentiation in the excited state interactions, the (R)-form of ketoprofen ((R)-**1b**), was submitted to LFP in the presence of each enantiomer of 1-(1-naphthyl)



Scheme 1. Main photophysical processes occurring after excitation of BZP in the presence of NPT.

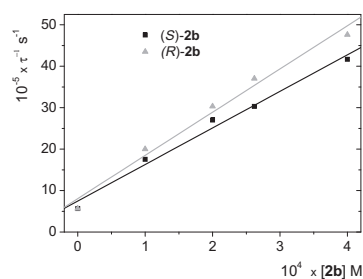


Figure 2. Stern–Volmer plots for the quenching of $^3(\text{R})\text{-1b}^*$ at 600 nm in the presence of increasing amounts of (S)-**2b** or (R)-**2b**.

ethylamine ((S)-**2b** or (R)-**2b**). The photophysical properties of **1b** and **2b** (absorption, emission and laser flash photolysis) were very similar to those of their parent compounds **1a** and **2a** (see Supplementary Material). Interestingly, triplet–triplet energy transfer from $^3\mathbf{1b}^*$ to **2b** affording $^3\mathbf{2b}^*$ (iii) resulted to be significantly stereoselective, with $k_q = (8.8 \pm 0.6) \times 10^9$ and $(10.4 \pm 0.8) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for (S)-**2b** or (R)-**2b**, respectively. The Stern–Volmer plots are shown in Figure 2. Consistent results were obtained using (S)-**1b** as donor; in this case, the (S)/(S) combination gave rise to the higher rate constant for quenching of the BZP-like triplet.

The corresponding NPT-type triplets exhibited a maximum centered at 430 nm in the transient absorption spectrum; decay of these species occurred with different kinetics (Figure 3A) for each **2b** enantiomer. Stereodifferentiation in the deactivation of $^3\mathbf{2b}^*$ must be related to exciplex formation (iv + v) [27], so chiral

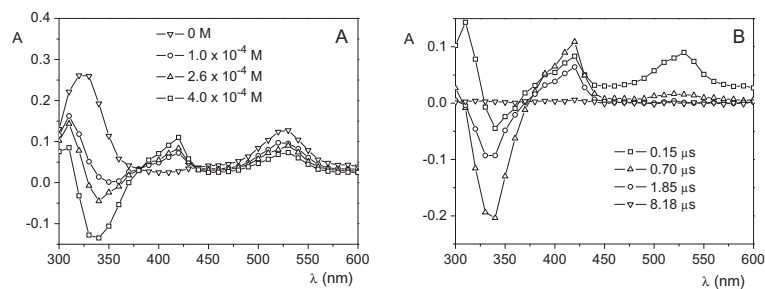


Figure 1. Laser flash photolysis of **1a** ($2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) in acetonitrile/ N_2 at $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$. (A) Spectra recorded in the presence of increasing amounts of **2a**, 0.15 μs after the laser pulse. (B) Spectra obtained in the presence of **2a** ($2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$) at different time windows.

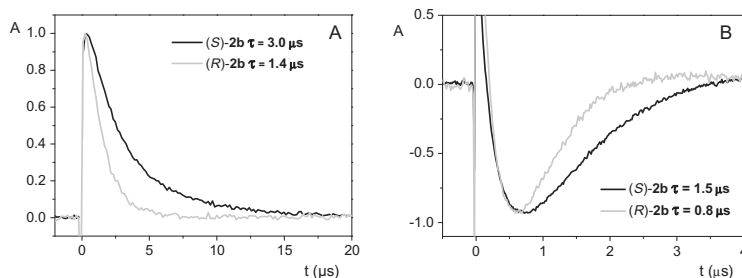


Figure 3. Laser flash photolysis of (*R*)-**1b** ($\lambda_{exc} = 355$ nm, MeCN, N_2 , 2.6×10^{-3} M) in the presence of (*R*)-**2b** and (*S*)-**2b** at 2.0×10^{-4} M concentration. Kinetic traces monitored at (A) 430 nm or (B) 340 nm.

discrimination would result from stereochemical recognition by (*R*)-**1b**.

Interestingly, the P-type delayed fluorescence was also observed in **1b/2b** combinations as a negative band peaking at 340 nm. The formation and decay of this transient is shown in Figure 3B. Again, the kinetics recorded for recovery of the baseline was configuration-dependent, being clearly faster in the case of (*R*)-**2b**. Although delayed fluorescence involving collision between two triplets should be intrinsically insensitive to the (*R*)- or (*S*)-nature of the asymmetric carbon of **2b**, the observed stereodifferentiation reflects the decay differences between the corresponding NPT triplet precursors. This is in accordance with the expected lifetime of the process, which can be predicted to be half the value found for the triplet lifetimes.

A similar trend was observed when an excess of acetic acid (0.6 M) was added to the **1b/2b** mixtures, ruling out that stereodifferentiation originates from carboxylate/ammonium ion interactions (see Supplementary Material).

3. Conclusions

Transient absorption spectroscopy has proven to be a powerful tool to investigate the formation and decay of excited singlet states upon triplet–triplet annihilation, following T–T energy transfer from a selectively excited sensitizer. Delayed emission is observed as a negative band in the microsecond timescale. In the case of chiral benzophenone/naphthalene pairs, stereodifferentiation has been observed in the kinetics of T–T energy transfer, $^3NPT^*$ decay through exciplex formation and $^1NPT^*$ fluorescence.

4. Experimental section

4.1. Chemicals

Benzophenone (**1a**), (*S*)- and (*R*)-ketoprofen ((*S*)-, (*R*)-**1b**), naphthalene (**2a**), (*S*)- and (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine ((*S*)-, (*R*)-**2b**), were commercially available. Their purity was checked by 1H NMR and HPLC analysis.

Laser flash photolysis measurements were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel Brilliant, 355 nm, 10 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled to a mLFP-111 Luzchem miniaturized equipment. All transient spectra were recorded in acetonitrile, employing 10×10 mm² quartz cells with 4 mL capacity. The samples were bubbled during 30 min with N_2 , prior to acquisition. The absorbance of the BZP chromophore was adjusted to 0.20 at the

laser excitation wavelength. All the experiments were carried out at room temperature (22 °C).

Acknowledgment

Financial support from the MICINN (Grant CTQ2010-14882 and predoctoral fellowship to P. B.) is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cpllett.2011.08.096.

References

- [1] A. Gilbert, J. Baggott, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
- [2] Nicholas J. Turro, J.C. Scaiano, V. Ramamurthy, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books, Sausalito, 2009.
- [3] Y. Kanda, H. Kaseda, T. Matsumura, *Spectrochim. Acta* 20 (1964) 1387.
- [4] R.M. Hochstrasser, H. Lutz, G.W. Scott, *Chem. Phys. Lett.* 24 (1974) 162.
- [5] K. Sandros, *Acta Chem. Scand.* 23 (1969) 2815.
- [6] M.W. Wolf, R.E. Brown, L.A. Singer, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 526.
- [7] S.K. Chattopadhyay, S.K. Kumar, P.K. Das, *J. Photochem.* 30 (1985) 81.
- [8] W.J. Leigh, D.R. Arnold, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1980) 406.
- [9] W.L. Wallace, R.P. Van Duyne, F.D. Luis, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 5319.
- [10] H.-H. Perkampues, I. Sandeman, C.J. Timons, *DMS UV Atlas of Organic Compounds*, vols. I–V, Verlag Chemie, Weinheim, Butterworths, London, England, 1966.
- [11] I.B. Berlman, *Handbook of Fluorescence of Aromatic Molecules*, second Edn., Academic Press, New York, 1971.
- [12] J.B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Interscience, New York, 1970.
- [13] B. Armand, R. Bensasson, *Chem. Phys. Lett.* 34 (1975) 44.
- [14] D.F. Evans, *J. Chem. Soc.* (1957) 1351.
- [15] M.Z. Hoffman, G. Porter, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 268 (1962) 46.
- [16] E. Clar, *Spectrochim. Acta* 4 (1950) 116.
- [17] B. Stevens, M.F. Thomaz, *Chem. Phys. Lett.* (1968) 549.
- [18] C.A. Parker, T.A. Joyce, *Trans. Faraday Soc.* 62 (1966) 2785.
- [19] A.R. Horrocks, F. Wilkinson, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 7 (1968) 421.
- [20] G.N. Lewis, M. Kasha, *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 2100.
- [21] D.N. Dempster, T. Morrow, M.F. Quinn, *J. Photochem.* 2 (1974) 329.
- [22] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M.T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
- [23] I. Carmichael, G.L. Hugh, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 15 (1986) 1.
- [24] X. Cai, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9319.
- [25] A.D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997. <http://old.iupac.org/goldbook/D01579.pdf>.
- [26] M. Yamaji, T. Tanaka, H. Shizuka, *Chem. Lett.* (1997) 19.
- [27] H. Shizuka, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 825; M.C. Jiménez, S.-E. Stiriba, R. Tormos, J. Pérez-Prieto, M.A. Miranda, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 36.

Excited-State Interactions in Diastereomeric Flurbiprofen–Thymine Dyads

Paula Bonancía,[†] Ignacio Vayá,[†] M. José Climent,[†] Thomas Gustavsson,[‡] Dimitra Markovitsi,[‡] M. Consuelo Jiménez,^{*,†} and Miguel A. Miranda^{*,†}

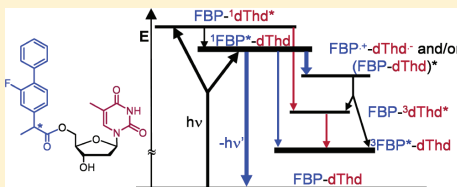
[†]Chemistry Department/Institute of Chemical Technology UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, Spain

[‡]CNRS, IRAMIS, SPAM, Francis Perrin Laboratory, URA 2453, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Supporting Information

ABSTRACT: Excited-state interactions between (S)- or (R)-flurbiprofen ((S)- or (R)-FBP) and thymidine (dThd) covalently linked in dyads **1** or **2** have been investigated. In both dyads, the only emitting species is ¹FBP*, but with a lower fluorescence quantum yield (ϕ_F) and a shorter fluorescence lifetime (τ_F) than when free in solution. These results indicate that dynamic quenching occurs either by electron transfer or via exciplex formation, with FBP as the charge-donating species. In acetonitrile, both mechanisms are favored, while in dioxane exciplex formation is predominating.

Isomer **1** displays lower values of ϕ_F and τ_F than its analogue **2**, indicating that the relative spatial arrangement of the chromophores plays a significant role. The triplet quantum yields (ϕ_T) of **1** and **2** are significantly higher than the expectations based solely on ¹FBP*–dThd intersystem crossing quantum yields (ϕ_{ISC}), with $\phi_T(\mathbf{1}) > \phi_T(\mathbf{2})$. This can be explained in terms of intramolecular charge recombination at the radical ion pairs and/or the exciplexes, which would be again dependent on geometrical factors. The triplet lifetimes (τ_T) of ³FBP*–dThd and free ³FBP* are similar, indicating the lack of excited-state interactions at this stage. The FBP–dThd dyads could, in principle, constitute appropriate model systems for the elucidation of the excited-state interactions in noncovalent DNA–ligand complexes.



INTRODUCTION

The fact that ultraviolet (UV) radiation induces chemical reactions in DNA leading to carcinogenic mutations is at the origin of numerous investigations devoted to the study of the electronically excited states of DNA.^{1–5} The UV solar radiation that reaches the Earth's surface ranges from 400 to 320 nm (UVA) and from 320 to 290 nm (UVB). Both UVA and UVB radiations are able to induce damage in DNA, which is responsible for some types of cancer.^{6–9} Concerning UVB, it is efficiently absorbed by nucleobases, causing direct photo-reactions of DNA. It is also possible to cause DNA degradation by means of photosensitization, performed either by endogenous (i.e., metabolites) or by exogenous (i.e., drugs or cosmetics) agents.¹⁰ It is known that nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), when interacting with free nucleobases or nucleosides, enhance the photoinduced formation of thymine cyclobutane dimers.^{11,12} In this context, a detailed understanding of deactivation channels of drug excited states in the presence of biomolecules is essential to predict a possible photobiological risk in patients, mainly associated with phototoxicity.

Among NSAIDs, which are widely prescribed therapeutic agents for a variety of pathological conditions including headache, pain caused by degenerative diseases, and fever,¹³ 2-arylpropionic acid derivatives are an important group. They include ibuprofen, naproxen, ketoprofen, or flurbiprofen and

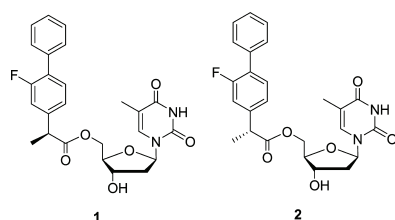
are usually marketed as racemic mixtures (with few exceptions, such as naproxen). However, their anti-inflammatory activity is mainly attributed to the (S)-enantiomer.¹⁴ The lowest singlet and triplet excited states of flurbiprofen (FBP) have recently been characterized,¹⁵ and their photophysical properties have been employed to obtain relevant information on different issues, either from a biological point of view (binding degree to a transport protein, enzyme-like activity of HSA, etc.)^{16–20} or for analytical purposes (i.e., determination of enantiomeric compositions).²¹ In addition, FBP has been used as a triplet sensitizer of quinolones, for the determination of the triplet energy of thymine in DNA.^{22,23}

Model systems (dyads) containing a photoactive drug covalently linked to a biomolecule fragment have been designed in the past with the purpose to provide mechanistic insight into the key basic processes such as energy transfer, electron transfer, or exciplex formation.^{24–27} Following this strategy, we have now synthesized two stereoisomeric dyads **1** and **2** (Chart 1) containing (S)- or (R)-FBP attached to thymidine at the 5' position of the sugar. These dyads are, a priori, suitable models for the investigation of excited-state interactions in their complexes with DNA.

Received: June 28, 2012

Revised: August 7, 2012

Published: August 8, 2012

Chart 1. Chemical Structures of the Dyads Investigated in This Work

Steady-state and time-resolved spectroscopic measurements were performed on the dyads to characterize the excited-state properties. To correctly interpret the results obtained on the dyads, comparative measurements were also done on the individual chromophores (FBP and dThd) as well as on their equimolar mixture.

The results show that singlet excited-state interactions between the FBP and dThd chromophores are only observed when both units are covalently linked. The only emitting species is $^1\text{FBP}^*$, which undergoes dynamic quenching by either electron transfer or exciplex formation, with FBP as the charge-donating species. Because both mechanisms require interaction at a contact distance, the relative spatial arrangement of the chromophores plays a significant role. Intramolecular charge recombination at the radical ion pairs and/or the exciplexes results in population of the FBP triplet excited state, a pathway that is also sensitive to geometrical factors. In noncovalent FBP/DNA complexes, excitation in the UVC could result in charge injection from $^1\text{FBP}^*$ to a nearby thymine, and the excess electron could be transported along the DNA double strand.²⁸

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Solvents. The (S)- and (R)-flurbiprofen ((S)- and (R)-FBP), thymidine (dThd), and 1-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) were commercially available. Their purity was checked by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Spectroscopic-grade solvents were used without further purification.

General. Absorption spectra were recorded using 1 cm quartz cells; λ_{max} and $\log \epsilon$, in brackets, are given for the main absorption bands. Infrared (IR) spectra were obtained with a Fourier transform infrared (FTIR) instrument; ν_{max} (cm^{-1}) is given for the main absorption bands. ^1H NMR spectra were measured in CD_3OD , using a 300 MHz apparatus; chemical shifts are reported in δ (ppm) values, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed by ESI+ with a XevoQToF spectrometer, in the ITQ, at Universitat Politècnica de València.

Synthesis of the Substrates. The FBP–dThd dyads **1** and **2** (Chart 1) were obtained by condensation of (S)- or (R)-flurbiprofen and thymidine at the 5' position of the sugar as follows: to a mixture of dThd (0.30 g, 1.23 mmol) and (S)- or (R)-FBP (0.29 g, 1.19 mmol) in 2 mL of anhydrous pyridine was slowly added EDC (0.23 g, 1.19 mmol) under magnetic stirring, at 0 °C. When the addition was completed, the reaction mixture was kept at 0 °C for 2 h. Pyridine was then

removed under reduced pressure and the viscous residue dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed with NaHCO_3 (1 M), to remove unreacted FBP and dThd. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, and the solvent was rotavaporated. The organic residue was submitted to column chromatography using hexane/methanol (9:1, v/v) as eluent, to produce **1** or **2** (ca. 70%). Copies of the ^1H and ^{13}C NMR spectra are shown in Figures S1 and S2 of the Supporting Information.

5'-(S)-[(2-Fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-thymidine (1). White powder. UV λ_{max} ($\log \epsilon$): 250 (4.1). FTIR ν (cm^{-1}): 3420 (br), 1721, 1655, 1480, 1418, 1267, 1174, 767, 697. ^1H NMR (δ , ppm): 1.43 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.72 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.81–1.90 (m, 1H), 2.09–2.17 (m, 1H), 3.80 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 3.97–4.01 (m, 1H), 4.16–4.21 (m, 2H), 4.32 (dd, 1H, $J = 12.0$, $J = 6.0$ Hz), 6.08 (dd, 1H, $J = 8.1$, $J = 6.0$ Hz), 7.02–7.11 (m, 2H), 7.23–7.41 (m, 7H). ^{13}C NMR (δ , ppm): 11.5, 17.6, 39.5, 45.0, 64.4, 71.4, 85.0, 85.5, 110.3, 114.9 + 115.2, 123.6, 127.6 + 123.7, 127.6, 128.0 + 128.1, 128.3, 128.6, 128.7, 130.9, 135.4, 136.1, 142.3 + 142.4, 150.9, 158.1 + 161.4, 165.1, 173.9. HRMS for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{FN}_2\text{O}_6$ (MH^+): calcd, 469.1775; found, 469.1773.

5'-(R)-[(2-Fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-thymidine (2). White powder. UV λ_{max} ($\log \epsilon$): 250 (4.1). FTIR ν (cm^{-1}): 3422 (br), 1720, 1656, 1475, 1418, 1272, 1172, 768, 698. ^1H NMR (δ , ppm): 1.43 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.55–1.64 (m, 1H), 1.81 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.97–2.05 (m, 1H), 3.77 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.96–3.99 (m, 1H), 4.05–4.09 (m, 1H), 4.14 (dd, 1H, $J = 12.2$, $J = 3.1$ Hz), 4.39 (dd, 1H, $J = 12.2$, $J = 5.1$ Hz), 6.06 (dd, 1H, $J = 8.1$, $J = 6.0$ Hz), 7.00–7.08 (m, 2H), 7.23–7.40 (m, 7H). ^{13}C NMR (δ , ppm): 11.3, 17.4, 39.3, 44.8, 64.5, 71.2, 84.6, 85.6, 110.4, 114.8 + 115.1, 123.6 + 123.7, 127.6, 127.9 + 128.1, 128.3, 128.6 + 128.7, 130.8, 135.4, 136.2, 142.1 + 142.2, 151.0, 158.1 + 161.4, 165.1, 173.9. HRMS for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{FN}_2\text{O}_6$ (MH^+): calcd, 469.1775; found, 469.1766.

Fluorescence Measurements. Emission spectra were recorded on a spectrofluorometer system, which was provided with a monochromator in the wavelength range of 200–900 nm. The solutions were placed into 10 mm \times 10 mm quartz cells. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.2. Steady-state experiments were performed at 22 °C or at -78 °C. For the fluorescence quantum yield determination, FBP in MeCN/air was used as a secondary reference, with $\phi_{\text{F}} = 0.17$ (air) or 0.21 (N_2).²⁵

Time-resolved fluorescence measurements were performed using the fluorescence upconversion (FU) and time-correlated single photon counting (TCSPC) techniques. For both techniques, the excitation source was the third harmonic (267 nm) of a mode-locked Ti:Sapphire laser, delivering 100 fs pulses with a repetition rate of 76 and 4.75 MHz, respectively (using a pulse-picker). The femtosecond FU setup has been described earlier.²⁹ For the upconversion technique, the average excitation power used was 40 mW. The power density cannot be measured precisely within the excitation volume, but we estimate it to 0.2 ± 0.1 GW/ cm^2 for a 40 mW output from the tripler unit (assuming a 40 μm diameter of the focused beam). The fwhm value of a Gaussian apparatus function is about 350 fs. We judge that the time resolution of the setup is better than 100 fs after deconvolution, depending on the signal-to-noise ratio. Solutions (about 25 mL) were kept flowing through a 0.4 mm quartz cell, which itself was kept in continuous motion perpendicular to the excitation beam to minimize thermal

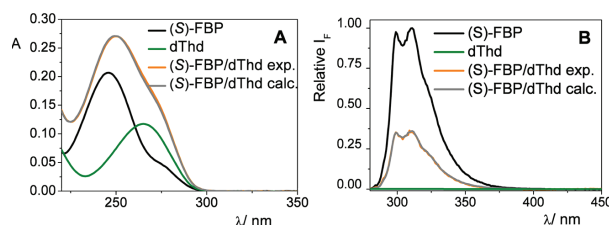


Figure 1. (A) UV absorption spectra in MeCN of (S)-FBP (10^{-5} M), dThd (10^{-5} M), and a 1:1 molar mixture of (S)-FBP and dThd at the same concentration, together with that calculated for the same mixture taking into account independent absorption by each chromophore. (B) Fluorescence spectra of isoabsorptive solutions ($A_{267} = 0.1$) of (S)-FBP (black) and (S)-FBP/dThd at 1:1 molar ratio (red), in acetonitrile. The gray trace corresponds to the theoretical band calculated as independent emission of FBP and dThd, taking into account the photons absorbed by each chromophore.

effects. All measurements were performed at room temperature (22 ± 1 °C) under aerated conditions.

For the TCSPC technique, a Becker & Hickl GmbH PC card was used. A Schott WG 295 long pass filter was placed in front of a SPEX monochromator. The detector was a microchannel plate (R1564 U Hamamatsu) providing an instrumental response function of 60 ps (fwhm). The average laser power (0.1 mW) was measured with a Melles Griot broadband powermeter. The irradiated area on the surface of the cell was ca. 0.2 cm^2 corresponding to a pulse intensity of 2.4 kW/cm^2 . Solutions were contained in a $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ quartz cell and continuously stirred. Successive recordings with the same sample gave identical decays, which were eventually merged to improve the signal-to-noise ratio. Such a procedure allowed us to ensure that the measured signals were not altered during the measurements due to a possible accumulation of photo-products.

For both FU and TCSPC, parallel ($I_{\text{par}}(t)$) and perpendicular ($I_{\text{perp}}(t)$) excitation/detection measurements were performed by controlling the polarization of the exciting beam with a zero-order half-wave plate. The transmission under parallel and perpendicular conditions was found to be identical, so no correction was applied. From these measurements, the fluorescence anisotropy can be calculated from the formula $r(t) = (I_{\text{par}}(t) - I_{\text{perp}}(t)) / (I_{\text{par}}(t) + 2I_{\text{perp}}(t))$.

Phosphorescence Measurements. Emission spectra were recorded on a spectrofluorometer system, which was provided with a monochromator in the wavelength range of 200–900 nm. The solutions were placed into a quartz tube and introduced into liquid nitrogen prior to the measurements. The absorbance of the samples was 0.3 at the excitation wavelength (266 nm).

Laser Flash Photolysis Experiments. Laser flash photolysis (LFP) experiments were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel Brilliant, 266 nm, 10 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled to a mLFP-111 Luzchem miniaturized equipment. This transient absorption spectrometer includes a ceramic xenon light source, 125 mm monochromator, Tektronix 9-bit digitizer TDS-3000 series with 300 MHz bandwidth, compact photomultiplier and power supply, cell holder and fiber optic connectors, fiber optic sensor for laser-sensing pretrigger signal, computer interfaces, and a software package developed in the LabVIEW environment from National Instruments. The LFP equipment supplies 5 V trigger pulses with programmable frequency and delay. The rise time of the detector/digitizer is ~ 3 ns up to 300 MHz (2.5 GHz

sampling). The monitoring beam is provided by a ceramic xenon lamp and delivered through fiber optic cables. The laser pulse is probed by a fiber that synchronizes the LFP system with the digitizer operating in the pretrigger mode. All transient spectra were recorded using $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ quartz cells with a capacity of 4 mL and were bubbled for 30 min with N_2 before signal acquisition. The absorbance of the samples was 0.2 at the laser excitation wavelength (266 nm).

RESULTS AND DISCUSSION

Absorption and Fluorescence Properties of an Equimolar FBP/dThd Mixture. The absorption and emission spectra of (S)-FBP are well-known¹⁵ and do not deserve a detailed description here. Concerning dThd, only spectra in aqueous solution have been reported.³⁰ The absorption and emission spectra of dThd in MeCN and dioxane do not differ substantially in shape from those in water and are given in the Supporting Information (Figures S4 and S5). It should be remarked that the molar extinction of dThd is significantly higher in MeCN than in water (15.3×10^3 at 265 nm as compared to 9.9×10^3 at 267 nm). Likewise, the fluorescence quantum yield of dThd in MeCN is substantially lower than that in water (3.0×10^{-5} as compared to 1.5×10^{-4}).

The fluorescence spectrum of the equimolar mixture in MeCN (under aerated conditions) with $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm is shown in Figure 1B. It is nearly identical to that of (S)-FBP obtained under the same conditions after scaling with the relative absorbance (48%), calculated using isoabsorptive solutions of (S)-FBP and dThd as models for comparison. Indeed, the fluorescence quantum yield (ϕ_F) of dThd (3×10^{-5} , see Figure S5 in the Supporting Information) is several orders or magnitude lower than that of (S)-FBP (0.17). This shows that the emission of the equimolar mixture of (S)-FBP and dThd is only due to the photons absorbed by (S)-FBP, also indicating the absence of any excited-state interaction in the mixture (Figure 1A).

Time-resolved fluorescence measurements, both on the picosecond and on the nanosecond time scales, were done on dThd and FBP as well as their mixture in MeCN (22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm). Comparative measurements were made at 310 nm; this wavelength was chosen because it corresponds to the maximum of the FBP fluorescence spectrum.

The fluorescence decay of dThd in aqueous solution is known to be ultrafast and hardly depends on the emission wavelength, with an average lifetime well below 1 ps.²⁹ This is due to the presence of highly efficient intramolecular

nonradiative deactivation channels. The fluorescence decay of dThd in MeCN recorded by FU is likewise ultrafast and can be described by a biexponential function with time constants of 0.25 and 1.65 ps (see below). The fluorescence of FBP in MeCN is much longer-lived, in line with the much higher quantum yield. Interestingly, the decay kinetics depends on the emission wavelength (see Figure S3).

The fluorescence trace of the mixture at 310 nm rises instantaneously before undergoing an ultrafast decay (20% amplitude, limited by the instrumental apparatus function) to a constant value. This is in line with the superposition of dThd and FBP fluorescence scaled by the relative absorbance at 267 nm and emission intensities at 310 nm. Time-resolved data thus show no indication of any excited-state interaction in the mixture.

Neither steady-state nor time-resolved data thus show indications of FBP–dThd interaction in the mixture.

Photophysical Behavior of FBP/dThd Dyads. The UV absorption spectra of dyads 1 and 2 are nearly identical to the sum of the spectra of the individual FBP and dThd units obtained under the same conditions (Figure 2). This shows the absence of any significant ground-state intramolecular interactions between the two chromophores in the two dyads.

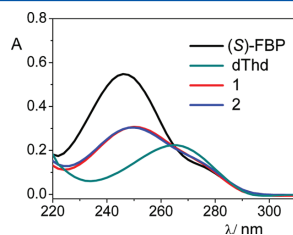


Figure 2. UV absorption spectra of isoabsorptive solutions (at 267 nm) of (S)-FBP (black), dThd (dark green), 1 (red), and 2 (blue), in acetonitrile.

The fluorescence spectra of the two dyads as well as (S)-FBP obtained at room temperature after excitation at 267 nm are shown in Figure 3A. The ordinate in this figure is chosen as a relative fluorescence intensity, that is, scaled for equal absorbance at the excitation wavelength (the spectra are normalized with regards to the maximum of the FBP spectrum taken equal to one). The most remarkable feature observed is a dramatic fluorescence quenching in the two dyads. The observed fluorescence was assigned to (S)-FBP ($\lambda_{em} = 310$

nm)¹⁵ rather than to dThd for the reasons evoked above (Figure 3A). The fluorescence quantum yields (ϕ_f) of the two dyads were somewhat higher in dioxane than in acetonitrile (see Table 1).

In ethanol matrix at -78 °C, the fluorescence intensity shows the same trend as the relative absorbance of FBP in the dyads (Figure 3B). This value is much higher than that observed at 22 °C, showing the near absence of the fluorescence quenching. This may be the result of the limited degrees of freedom for conformational relaxation in the rigid matrix that prevents effective population of the conformations required for intramolecular excited-state interactions.

Fluorescence decays on the femtosecond time scale were recorded for the dyads at 310 nm by FU at 22 °C, $\lambda_{exc} = 267$ nm (Figure 4). In MeCN solution, the kinetics were very similar to that of the equimolar mixture, that is, characterized by an instantaneous rise followed by an ultrafast decay leveling out to a constant value ($\sim 80\%$, see Figure 4A). The ultrafast component is typical for the < 1 ps fluorescence decay of dThd, as in the case of the equimolar mixture. The subsequent constant level emission is supposedly only due to $^1\text{FBP}^*$. These observations clearly demonstrate two different phenomena: (i) the lack of intramolecular singlet–singlet energy transfer from $^1\text{dThd}^*$ to FBP and (ii) the FBP (biphenyl) singlet state as the only species responsible for the residual emission observed in the steady-state fluorescence. No differences were found on this short time scale between the two dyads.

However, on the nanosecond time scale (TCSPC), both dyads showed a more complex behavior, either in acetonitrile or in dioxane (Figure 4B). While the fluorescence decay of (S)-FBP is monoexponential, that of the dyads is clearly nonexponential and much faster, indicating a dynamic $^1\text{FBP}^*$ quenching. Interestingly, the (S)- isomer decays faster than the (R)-derivative. To quantify this comparison, experimental data were fitted using a multiexponential model function convoluted by the apparatus function. As expected, the (S)-FBP fluorescence profiles are well described by one single time constant (1.70 ns in MeCN, 1.80 ns in dioxane). Conversely, a triexponential model function was required for the dyads, with a ~ 100 ps, a ~ 300 ps, and a low-amplitude nanosecond component close to the FBP lifetime. The average lifetimes ($\langle \tau \rangle = a_1\tau_1 + a_2\tau_2$) of the (S)- and (R)-isomers in MeCN are 0.27 and 0.31 ns, respectively (Table 1), but all three time constants for the (S)-isomer are faster than those of the (R)-isomer. In addition to the low-amplitude nanosecond component, the fluorescence decays below 1 ns can be correctly described only by a biexponential model function. The characteristic times obtained are $\tau_1 = 0.14$ ns ($a_1 = 0.50$)

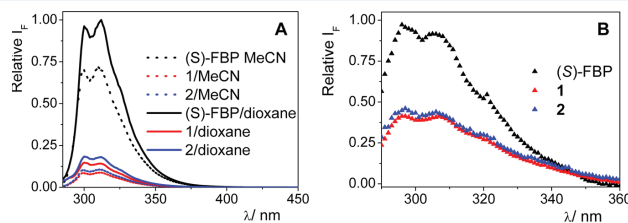


Figure 3. Fluorescence spectra of isoabsorptive solutions at $\lambda_{exc} = 267$ nm of (S)-FBP (black), 1 (red), and 2 (blue). (A) At 22 °C, in acetonitrile (dashed line) and dioxane (solid line). (B) In ethanol matrix at -78 °C.

Table 1. Photophysical Properties of (S)-FBP and the Dyads at $\lambda_{\text{exc}} = 267 \text{ nm}^a$

	ϕ_F	τ_F^b (ns)	k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	k_{Q}^c ($\times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$)	ϕ_{Q}	ϕ_{SC}	ϕ_{T}^c	$\phi_{\text{T}} - \phi_{\text{SC}}$
Acetonitrile								
(S)-FBP	0.17	1.70	1.00			0.71	0.71	
1	0.015	0.27	1.16	3.11	0.402	0.063	0.167	0.104
2	0.018	0.31	1.21	2.64	0.393	0.075	0.126	0.051
Dioxane								
(S)-FBP	0.24	1.80	1.33			0.70	0.70	
1	0.035	0.51	1.49	1.40	0.329	0.102	0.219	0.117
2	0.044	0.62	1.54	1.06	0.303	0.127	0.167	0.040

^aIn general, errors were lower than the last significant figure of the stated values. ^bMeasured at 310 nm; for the dyads, the fitting was performed using a triexponential model function, and the values given here correspond to an average of the three lifetimes. ^cIn deaerated media, $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

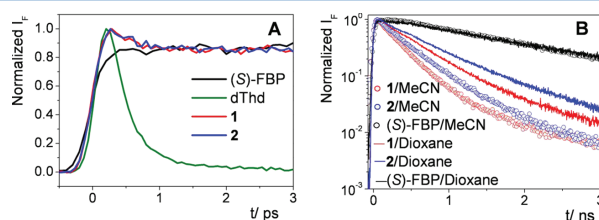


Figure 4. Fluorescence decays at 310 nm of (S)-FBP (black), dThd (green), 1 (red), and 2 (blue) in acetonitrile/air, at 22 °C, using 267 nm as the excitation wavelength. (A) Picosecond time scale (FU), in acetonitrile. (B) Nanosecond time scale (TCSPC), in acetonitrile and dioxane.

and $\tau_2 = 0.47 \text{ ns}$ ($a_2 = 0.50$) for (S)-FBP and $\tau_1 = 0.18 \text{ ns}$ ($a_1 = 0.84$) and $\tau_2 = 0.70 \text{ ns}$ ($a_2 = 0.16$) for (R)-FBP. The need for two fast components may indicate the presence of two types of conformations with different efficiencies of the quenching mechanism (vide infra). It is worth mentioning that whatever the nature of this quenching mechanism, it is more efficient in the case of the (S)-isomer. A similar trend was observed in dioxane, although with markedly slower time constants.

The fluorescence anisotropy decays (recorded by FU) of the dyads (Figure 5) were compared to that of free FBP. For the

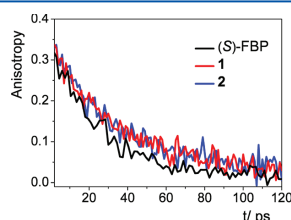


Figure 5. Fluorescence anisotropies (at 22 °C) of (S)-FBP (black), 1 (red), and 2 (blue) in acetonitrile/air at $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ concentration, using 267 nm as the excitation wavelength.

latter, the anisotropy decayed with a characteristic time of about 30 ps, while for the dyads the decay time was about 45 ps. For both FBP and the dyads, an initial fluorescence anisotropy at time zero $r_0 = 0.32$ was observed. FBP has a molecular volume of ca. 300 \AA^3 , as calculated from the van der Waals increments.³¹ Using the Stokes–Einstein–Debye equation,³² one thus obtain a rotational time of about 27 ps, slightly faster than that observed (30 ps). The deviation can be understood in terms of the nonspherical shape of the chromophore. The total volume of the FBP–dThd dyads is about 492 \AA^3 , giving a

rotational time of about 44 ps, very close to that experimentally observed (45 ps, $r_0 = 0.31$). The monoexponential behavior, and in particular the lack of any fast decay at early times, shows that there is no internal rotation between the two residues.

Upon laser flash photolysis (LFP) of the two dyads (excitation at 266 nm), the typical FBP triplet–triplet absorption spectrum was obtained (Figure 6A). The signals were less intense than when FBP was directly excited under the same conditions, taking into account its relative absorbance in the dyads. Interestingly, the intensity was higher than what was expected in view of the dramatic fluorescence decrease (vide supra). This indicates that the singlet excited state is not the only precursor of the triplet state. Moreover, the triplet quantum yield (Table 1) was found to be higher for the (S)- than for the (R)-stereoisomer. Quantitative data determined from these experiments are shown in Table 1.

The triplet lifetimes in the dyads are equal to that of free FBP ($24 \mu\text{s}$),¹⁵ indicating the lack of intramolecular interactions in the excited triplet state.

In contrast, the phosphorescence spectra of the dyads obtained in a frozen ethanol matrix at $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 6B) revealed that the emission from the triplet excited state merely reflects the fraction of photons absorbed by the FBP chromophore.

The fluorescence quantum yields of the dyads ($\phi_{\text{F, dyad}}$) were obtained using (S)-FBP as standard ($\phi_{\text{F, std}} = 0.21$ in MeCN/ N_2 or 0.17 in MeCN, air).¹⁵ In this expression (eq 1), A_{dyad} and A_{std} are the areas under the emission curve for dyads and FBP, respectively, A_{abs} represents the absorbance at the excitation wavelength, and η corresponds to the refractive index of the solvent. In all cases, the fluorescence was quenched by more than 80%. Stereodifferentiation was observed in the fluorescence lifetimes, which were much shorter for the dyads than for (S)-FBP, indicating a dynamic quenching. From these experimentally determined ϕ_{F} and τ_{F} values, and taking into

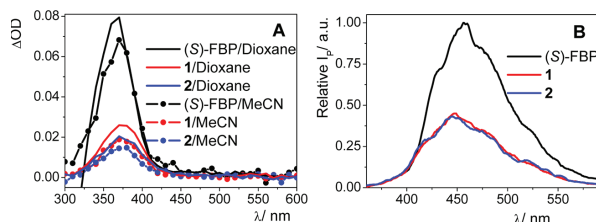


Figure 6. (A) Laser flash photolysis spectra ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (S)-FBP (black), **1** (red), and **2** (blue), in acetoneitrile or dioxane, at 1.0×10^{-5} M concentration, $1 \mu\text{s}$ after the laser pulse. (B) Phosphorescence spectra ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (S)-FBP (black), **1** (red), and **2** (blue) in ethanol matrix at -78 °C.

Table 2. Free Energy Changes (in kcal mol $^{-1}$) Associated with Electron Transfer or Exciplex Formation in FBP*/dThd Systems^a

donor/acceptor	acetoneitrile				dioxane			
	ΔG_{ET}		ΔG_{exc}		ΔG_{ET}		ΔG_{exc}	
	S ₁	T ₁	S ₁	T ₁	S ₁	T ₁	S ₁	T ₁
FBP/dThd	-30.0	+4.0	-25.1	+8.9	-5.0	+29.0	-22.7	+11.2
dThd/FBP	-2.4	+31.6	+2.5	+36.5	+22.7	+56.7	+4.9	+38.9

^aThe given results are precise to $\pm 10\%$ because the exact values of the redox potentials are not known for all compounds.

account the fraction of photons absorbed by (S)-FBP ($\Psi = 0.48$ in acetoneitrile and 0.46 in dioxane), the k_F value was obtained using eq 2. The subsequent quenching constants ($k_{Q_{dyad}}$) and quenching quantum yields ($\phi_{Q_{dyad}}$) were determined by means of eqs 3 and 4, respectively, where the average lifetimes $\tau_{F_{dyad}}$ are used for convenience, even if the best fitting is nonmonoexponential.

Likewise (eq 5), it was possible to determine the intersystem crossing quantum yield ($\phi_{ISC_{dyad}}$). The triplet quantum yields ($\phi_{T_{dyad}}$) were determined from LFP experiments (eq 6) at $\lambda_{exc} = 266$ nm, where ΔOD_{dyad} and ΔOD_{std} are the top of the optical density value for dyads and FBP (the standard), respectively, at the maximum of the T–T absorption spectrum (360 nm). The molar absorption coefficient (ϵ) was assumed to be the same in the given solvent.

$$\phi_{F_{dyad}} = \phi_{F_{std}} \frac{A_{dyad} \text{ Abs}_{std} \eta_{dyad}^2}{A_{std} \text{ Abs}_{dyad} \eta_{std}^2} \quad (1)$$

$$k_{F_{dyad}} = \frac{\phi_{F_{dyad}} / \Psi}{\tau_{F_{dyad}}} \quad (2)$$

$$k_{Q_{dyad}} = \frac{1}{\tau_{F_{dyad}}} - \frac{1}{\tau_{F_{std}}} \quad (3)$$

$$\phi_{Q_{dyad}} = \frac{k_{Q_{dyad}}}{k_{F_{dyad}}} \times \phi_{F_{dyad}} \quad (4)$$

$$\phi_{ISC_{dyad}} = \phi_{F_{dyad}} \times \frac{\phi_{ISC_{std}}}{\phi_{F_{std}}} \quad (5)$$

$$\phi_{T_{dyad}} = \phi_{F_{std}} \frac{\Delta OD_{dyad} \epsilon_{T_{std}}}{\Delta OD_{std} \epsilon_{T_{dyad}}} \quad (6)$$

Concerning the nature of the $^1\text{FBP}^*$ fluorescence quenching mechanism, it can be due to energy transfer, electron transfer, or exciplex formation. The possibility of Förster energy transfer can be reasonably disregarded, in view of the sensitivity of ϕ_Q to the rigidity of the medium (no quenching in solid matrix) and to the polarity of the solvent (lower quenching efficiency in dioxane than in acetoneitrile).³³ Moreover, the observed stereodifferentiation in the ϕ_F and ϕ_T values also supports that a close contact between the two chromophores is necessary in the involved processes.

As regards the feasibility of formation of radical ion pairs or exciplexes from the singlet or triplet states, it can be estimated by application of eqs 7 and 8:³⁴

$$\Delta G_{ET} (\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{\text{donor}} - E_{RED}^{\text{acceptor}} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \right] - E^* \quad (7)$$

$$\Delta G_{exc} (\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{OX}^{\text{donor}} - E_{RED}^{\text{acceptor}} - 0.75 \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon - 1} - 0.19 \right) + 0.38 \right] - E^* \quad (8)$$

Taking into account the corresponding redox potentials ($E_{OX}(\text{biphenyl}) = 1.95$ V,³⁵ $E_{RED}(\text{thymidine}) = -1.10$ V,³⁶ $E_{OX}(\text{thymidine}) = 1.70$ V,³⁷ and $E_{RED}(\text{biphenyl}) = -2.55$ V³⁸), the appropriate dielectric constants ($\epsilon_{MeCN} = 37.5$ and $\epsilon_{dioxane} = 2.25$),³⁹ and the FBP singlet or triplet energies (E^*),¹⁵ the free energy values obtained for electron transfer and exciplex formation are shown in Table 2.

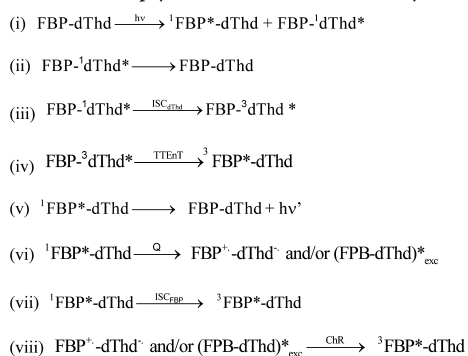
In general, charge transfer is only favored from the FBP singlet excited state as donor, and the fluorescence quenching may be due both to electron transfer and to exciplex formation. The latter process should be clearly predominating in dioxane. By contrast, $^3\text{FBP}^*$ should be essentially unreactive in both solvents, which is in agreement with the lack of dynamic

quenching observed in the LFP experiments. Moreover, the positive values of ΔG consistently obtained in Table 2 for the T_1 columns indicated that charge recombination leading to $^3\text{FBP}^*$ is indeed thermodynamically allowed.

Another point of interest is the origin of the FBP triplet. Its quantum yield (ϕ_T), determined from LFP, is found to be significantly higher than ϕ_{ISC} . Triplet generation could in principle occur through several pathways: (a) intersystem crossing from S_1 , (b) triplet–triplet energy transfer from $^3\text{dThd}^*$, or (c) charge recombination of the radical ion pairs or exciplexes possibly resulting from quenching of the excited singlet states. As ϕ_T is higher than ϕ_{ISC} , path (a) cannot be the only operating route. Contribution of path (b) is possible because $E_T(\text{dThd})$ is ca. 9 kcal mol $^{-1}$ higher than $E_T(\text{FBP})$; however, on the basis of the known ϕ_{ISC} values for dThd (in the order of 10^{-2}), this process would not account for the observed ϕ_T , at least for **1**. Hence, pathway (c) also seems to be operating, and its contribution is clearly more important for the (S)-isomer than for its (R)-analogue.

According to the results obtained from the photophysical measurements and the calculations described above, the main deactivation processes that can take place upon excitation of a dyad containing covalently linked FBP and dThd subunits are indicated in Scheme 1 and can be summarized as follows. Initial

Scheme 1. Photophysical Processes in FBP–dThd Dyads



excitation at 267 nm (i) leads to the first singlet excited state of either FBP or dThd, as expected from the UV absorption spectra of these chromophores (Figure 1). Singlet–singlet energy transfer (SSET) from $^1\text{dThd}^*$ (E_s ca. 100 kcal mol $^{-1}$)³⁷ to the FBP moiety (E_s ca. 99 kcal mol $^{-1}$)¹⁵ would be nearly thermoneutral, but such a process is kinetically ruled out, in view of the ultrafast decay traces observed in Figure 4A. Deactivation of $^1\text{dThd}^*$ occurs through a highly efficient intramolecular nonradiative decay⁴⁰ (ii) or by intersystem crossing as a minor pathway⁴¹ (iii). Triplet–triplet energy transfer from $^3\text{dThd}^*$ (74 kcal mol $^{-1}$)^{22,23} to FBP ($E_T = 65$ kcal mol $^{-1}$)¹⁵ is outlined in (iv). Fluorescence emission from $^1\text{FBP}^*$ is represented in (v), and intramolecular quenching (Q) of $^1\text{FBP}^*$ to afford radical ion pairs or exciplexes is illustrated by process (vi). Route (vii) corresponds to intersystem crossing (ISC) in FBP. Finally, charge recombination (ChR) at the radical ion pairs or the exciplexes leading also to $^3\text{FBP}^*$ is indicated in (viii).

CONCLUSIONS

Singlet excited-state interactions between the FBP and dThd chromophores are only observed when both units are covalently linked. There is no indication of any intermolecular interactions in an equimolar mixture, neither in the ground states, nor in the excited states. In the FBP–dThd dyads, the only emitting species is $^1\text{FBP}^*$, with a quantum yield and a lifetime remarkably lower than when acting as a free chromophore. Free energy changes, calculated using Rehm–Weller equations, indicate that dynamic quenching may occur either by electron transfer or by exciplex formation, with FBP as the charge-donating species. In acetonitrile, both mechanisms are clearly favored, while in dioxane exciplex formation should be overwhelmingly predominating. In all cases, quenching requires interaction at contact distance, so the relative spatial arrangement of the chromophores plays a significant role. Indeed, the (S)-isomer (**1**) exhibits lower values of ϕ_F and τ_T than does its (R)-analogue. As a general observation, the triplet quantum yield (ϕ_T) determined in the dyads is significantly higher than the expectations based on the $^1\text{FBP}^*\text{-dThd}$ intersystem crossing quantum yields (ϕ_{ISC}) taking into account the fraction of light absorbed by the FBP moiety. This can be accounted for in terms of intramolecular charge recombination at the radical ion pairs and/or the exciplexes. Again, these processes would be expected to depend on geometrical factors, and indeed their contribution is more important in the case of **1** than in **2**. Once formed, the $^3\text{FBP}^*\text{-dThd}$ dyads have triplet lifetimes (τ_T) similar to that of free FBP, indicating the lack of excited-state interactions at this stage. This is in agreement with thermodynamic calculations, which lead to positive ΔG values for electron transfer or exciplex formation occurring from the triplet excited state.

In principle, the FBP–dThd dyads could be appropriate models to anticipate the nature of excited-state interactions in noncovalent FBP/DNA complexes. Thus, upon excitation in the UVC, the resulting $^1\text{FBP}^*$ would inject negative charge to a nearby thymine, and the excess electron could travel along the DNA double strand, reaching a distant base or eventually repairing a bipyrimidine lesion.^{42–45}

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Figures S1 and S2: ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of **1** and **2**. Figure S3: Fluorescence decays of FBP and FBP+dThd in MeCN (20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm) at different emission wavelengths. Figure S4: Steady-state absorption spectra of dThd in MeCN and water. Figure S5: Corrected steady-state fluorescence spectra of dThd in MeCN and thymine in water used for the calculation of the fluorescence quantum yields. Figure S6: Model structures of **1** and **2** obtained using HyperChem Release 8.0.3 for Windows Molecular Model System. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mmiranda@qim.upv.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Government (Grants CTQ2010-14882 and CTQ2009-13699), Salvador Madariaga Program (Grant to M.C.J.), Juan de la Cierva Program (contract to I.V.), Generalitat Valenciana (Prometeo 2008/090), and the Universitat Politècnica de València (PAID 05-11, ref 2766) is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977–2020.
- (2) Middleton, C. T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217–239.
- (3) Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025–2030.
- (4) Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Vayá, I. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3271–3276.
- (5) Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1219–1232.
- (6) Osterlind, A. *Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *72*, 67–68.
- (7) Soehnge, H.; Ouhitit, A.; Ananthaswamy, H. N. *Front. Biosci.* **1997**, *2*, D538–D551.
- (8) Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 13765–13770.
- (9) Bayanz, A.; Vayá, I.; Changenet-Barret, P.; Gustavsson, T.; Douki, T.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5163–5165.
- (10) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 903–911.
- (11) Chouini-Lalanne, N.; Defais, M.; Paillous, N. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 441–446.
- (12) Marguery, M. C.; Chouini-Lalanne, N.; Ader, J. C.; Paillous, N. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 679–684.
- (13) Brooks, P. M.; Day, R. O. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1716–1725.
- (14) Evans, A. M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 7S.
- (15) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038–1041.
- (16) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015–1020.
- (17) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayá, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134–10135.
- (18) Vayá, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694–2699.
- (19) Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861–6865.
- (20) Pérez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829–833.
- (21) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 11284–11287.
- (22) Boscá, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318–6319.
- (23) Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7409–7414.
- (24) Jiménez, M. C.; Stiriba, S. E.; Tormos, R.; Pérez-Prieto, J.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 36–38.
- (25) Vayá, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9363–9371.
- (26) Jiménez, M. C.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol., C* **2007**, *8*, 128–142.
- (27) Vayá, I.; Pérez-Ruiz, R.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *486*, 147–153.
- (28) Wagenknecht, H.-A. Principles and Mechanisms of Photo-induced Charge Injection, Transport and Trapping in DNA. In *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*; Wagenknecht, H.-A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 1–26.
- (29) Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Markovitsi, D. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 195–200.
- (30) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367–11374.
- (31) Edward, J. T. *J. Chem. Educ.* **1970**, *47*, 261–270.
- (32) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer-Verlag: New York, 2006.
- (33) Speiser, S. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1953–1976.
- (34) Weller, A. *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93–98.
- (35) Merkel, P. B.; Luo, P.; Dinnocenzo, J. P.; Farid, S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5163–5173.
- (36) Steenzen, S.; Telo, J. P.; Novais, H. M.; Candeias, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4101–4709.
- (37) Vicić, D. A.; Odom, D. T.; Núñez, M. E.; Gianolio, D. A.; McLaughlin, L. W.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8603–8611.
- (38) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (39) Lide, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.
- (40) Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Barone, V.; Improta, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 607–619.
- (41) Serrano-Perez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11880–11883.
- (42) Fazio, D.; Trindler, C.; Heil, K.; Chatgililoglu, C.; Carell, T. *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 206–212.
- (43) Park, M. J.; Fujitsuka, M.; Kawai, K.; Majima, T. *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 2056–2062.
- (44) Breeger, S.; Hennecke, U.; Carell, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1302–1303.
- (45) Giese, B.; Carl, B.; Carl, T.; Carell, T.; Behrens, C.; Hennecke, U.; Schiemann, O.; Feresin, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848–1851.

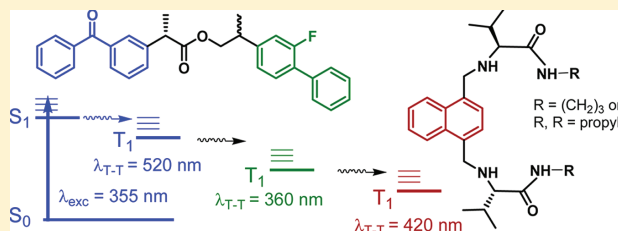
Triplet Excited State Behavior of Naphthalene-Based Pseudopeptides in the Presence of Energy Donors

Paula Bonancía,[†] Laura Vígara,[‡] Francisco Galindo,[‡] Santiago V. Luis,[‡] M. Consuelo Jiménez,^{*,†} and Miguel A. Miranda^{*,†}

[†]Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46071 Valencia, Spain

[‡]Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universitat Jaume I, Av. Sos Baynat, s/n, 12071 Castellón, Spain

Supporting Information



ABSTRACT: In this work, the triplet state behavior of naphthalene-based pseudopeptides with amide-based macrocyclic or lateral chain structures has been investigated in the presence of benzophenone and/or biphenyl, as suitable energy-donating chromophores. Their behavior has been compared with that of 1,4-dimethylnaphthalene as model compound. In all the cases, the triplet–triplet absorption of naphthalene is detected by transient absorption spectroscopy, upon selective excitation of benzophenone at 355 nm. The kinetics of formation and decay of this species is markedly slower in the pseudopeptides, due to retardation of triplet–triplet energy transfer and exciplex formation. Finally, the delayed fluorescence detected in the model naphthalene is absent in the pseudopeptides. The concept can, in principle, be exploited for the study of excited-state interactions in supramolecular systems.

INTRODUCTION

Pseudopeptidic compounds are suitable hosts for a variety of species; this is in the origin of molecular recognition phenomena,^{1–3} which have found application in fields such as medicinal,^{4,5} analytical,⁶ or supramolecular^{7–9} chemistry. In particular, pseudopeptides are synthetic models employed to gain insight into biological processes of high complexity.^{10–12} A powerful strategy in the design of such models could be the incorporation of an active chromophore into the chemical structure of the pseudopeptide, which ultimately would report on the supramolecular interactions with a given guest, through the absorption and emission properties of its excited states.

Concerning the use of photophysical parameters to obtain relevant information on binding interactions, most of the previous work has been done by examining the behavior of singlet excited states using either steady-state or time-resolved fluorescence techniques.¹³ In comparison, the use of triplet excited states as reporters remains almost unexplored,¹⁴ although the laser flash photolysis technique has proven to be a promising tool in such type of investigations.^{15–23}

An essential requirement for an appropriate chromophore to be incorporated into the pseudopeptide structure is that its

main photophysical properties are well-defined and can be easily characterized. For that reason, naphthalene (NPT) is a suitable choice. Thus, fluorescence from the lowest-lying singlet excited state ¹NPT* ($\phi_F = 0.19–0.21$) is centered at 350 nm (although longer-wavelength emission from NPT excimers has also been reported). After intersystem crossing (ϕ_{ISC} , ca. 0.75), the triplet excited state ³NPT* ($E_T = 61$ kcal/mol)²⁴ is reached; its transient absorption can be detected at $\lambda_{max} = 410–430$ nm in the laser flash photolysis (LFP) spectrum.²⁵ Delayed P-type fluorescence in NPT derivatives can also occur, arising from the annihilation of two ³NPT* units, to produce again ¹NPT* through direct irradiation. From this wealth of photophysical information, it can be anticipated that incorporation of the NPT chromophore into a pseudopeptidic framework may provide an efficient tool for the investigation of excited-state interactions with complexed guests.

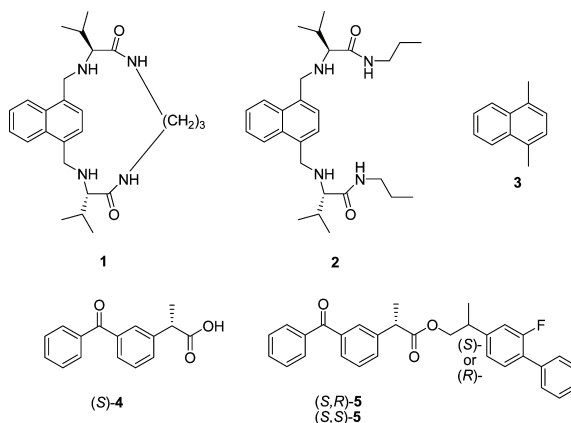
In this context, the fluorescence properties of pseudopeptides containing NPT subunits have already found application for the

Received: May 20, 2012

Revised: August 3, 2012

Published: August 3, 2012

Chart 1



radiometric sensing of N-protected amino acid derivatives.²⁶ However, the potential of the corresponding NPT triplet excited state still remains unexplored. In order to bypass formation of ¹NPT*, benzophenone (BZP) derivatives can be envisaged as triplet photosensitizers, leading exclusively to ³NPT*. This is based on the possibility of selective excitation of BZP at $\lambda > 320$ nm and to its favorable values of ϕ_{ISC} and E_T .

With this background, the objective of this work is to investigate the triplet excited state behavior of naphthalene-based pseudopeptides **1** and **2** in the presence of benzophenone or biphenyl (BPN), using 1,4-dimethylnaphthalene (**3**) for comparison. For the studies in the presence of BZP, (S)-ketoprofen ((S)-**4**) has been selected. In the case of BPN, direct excitation of the chromophore is not possible in the presence of NPT. For this reason, in order to generate selectively ³BPN*, model dyads **5** containing (R)- or (S)-2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propan-1-ol, ((R)- or (S)-FBPOH), covalently linked to (S)-**4** as the photoexcitable unit seem appropriate. Thus, selective excitation of BZP ($E_T = 69$ kcal mol⁻¹) followed by T–T energy transfer to BPN ($E_T = 65$ kcal mol⁻¹) may in principle lead to population of ³BPN* in order to follow the deactivation channels in the presence of **1–3**. Thus, the complex behavior of the triplet excited state manifold is expected to reveal interesting features of the pseudopeptides/benzophenone or biphenyl interactions. The chemical structures of **1–5** are shown in Chart 1.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Solvents. (S)-Ketoprofen, (S)- and (R)-flurbiprofen, dicyclohexylcarbodiimide, and 1,4-dimethylaminopyridine were commercially available. Their purity was checked via ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Reagent or spectroscopic-grade solvents were used without further purification.

General. ¹H NMR spectra were measured in CDCl₃, using a 300 MHz apparatus; chemical shifts are reported in δ (ppm) values, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. High-resolution mass spectrometry was performed with a UPLC-MS-MS system at the Instituto de Tecnología Química

UPV-CSIC. Isolation and purification were performed using preparative layer chromatography on silica gel.

Synthesis of Dyads (S,S)-5 and (S,R)-5. Dyads (S,S)-5 and (S,R)-5 were prepared in two steps. First, (S)- or (R)-FBP was reduced. Thus, FBP (1.23 mmol) was dissolved in 12 mL of dry ether at 0 °C; then 5 mL (4.90 mmol) of 1 M LiAlH₄ in ether was added dropwise, and the mixture was heated under reflux for 1 h. The crude was cooled to room temperature and washed with water (3 × 10 mL). The organic phases were combined, dried over MgSO₄ and evaporated to afford quantitatively (R)- or (S)-2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propan-1-ol ((R)- or (S)-FBPOH), which were used directly in the following reaction without further purification. To a cold solution of (R)- or (S)-FBPOH (0.87 mmol) in ether (25 mL), dicyclohexylcarbodiimide (1.30 mmol) was added portion wise. Then, a solution of (S)-**4** (0.87 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (catalytic amounts) in ether (25 mL) was added, and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. Brine was added, and the mixture was extracted with ether (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO₄, evaporated, and purified using preparative layer chromatography (eluent hexane/ethyl acetate, 75/25 v/v).

Spectroscopic Characterization of (S,S)-5 and (S,R)-5. (S)-2-(2-Fluorobiphenyl-4-yl)propyl (S)-2-(3-benzoylphenyl)propanoate, (S,S)-5. Yield: 42%. ¹H NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 1.24 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.50 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 3.01–3.13 (m, 1H), 3.77 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 4.14–4.24 (m, 2H), 6.88–6.96 (m, 2H), 7.27–7.78 (m, 15H). ¹³C NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 17.7, 18.2, 38.5, 45.4, 69.3, 114.7 + 115.0, 123.2 + 123.3, 127.0 + 127.1, 127.6, 128.3, 128.4, 128.5, 128.9, 129.0, 129.2, 130.0, 130.6, 131.5, 132.5, 135.6, 137.5, 137.9, 140.7, 144.6 + 144.7, 157.9 + 161.2, 173.8, 196.4. HRMS for C₃₁H₂₇FO₃ (MH⁺): calcd. 467.2022, found: 467.2017. UV λ_{max} (log ϵ): 200 (4.7), 250 (4.4), 340 (2.1).

(R)-2-(2-Fluorobiphenyl-4-yl)propyl (S)-2-(3-benzoylphenyl)propanoate, (S,R)-5. Yield: 45%. ¹H NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 1.23 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.51 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 3.03–3.13 (m, 1H), 3.78 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 4.10–4.16 (m, 1H), 4.23–4.31 (m, 1H), 6.89–6.99 (m, 2H), 7.28–7.77 (m, 15H). ¹³C NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 17.7, 18.2, 38.4, 45.4,

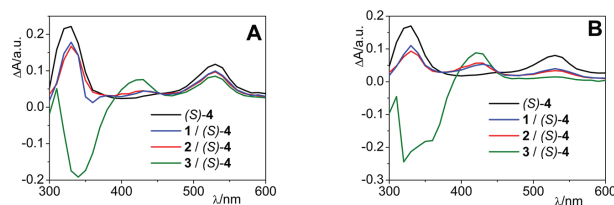


Figure 1. Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2) of (S)-4 at $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ concentration alone (black) or in the presence of 1 (blue), 2 (red), or 3 (green) at $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ concentration. Spectra recorded (A) $0.15 \mu\text{s}$ or (B) $0.69 \mu\text{s}$ after the laser pulse.

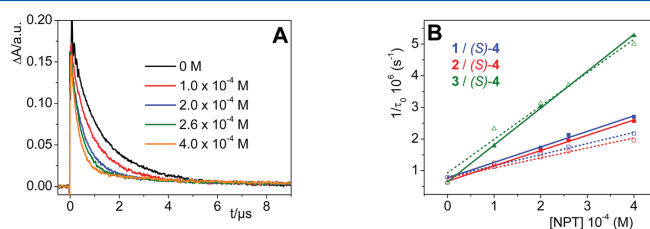


Figure 2. Laser flash photolysis of (S)-4 ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, MeCN, N_2) in the presence of increasing amounts of NPT derivatives 1–3. (A) Kinetic traces monitored at 530 nm in the presence of 1. (B) Stern–Volmer plots for $^3\text{BZP}^*$ quenching by 1 (blue), 2 (red), and 3 (green) in the absence (solid lines) and in the presence of 0.6 M HOAc (dotted lines).

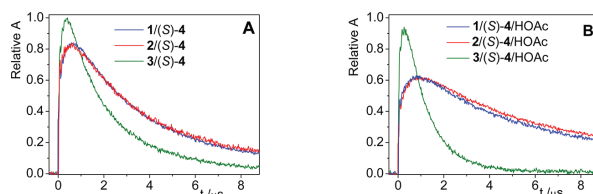


Figure 3. Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2) of (S)-4 $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ in the presence of 1 (blue), 2 (red), or 3 (green) at $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ concentration. Decay traces monitored at 430 nm ; the maximum value of the absorbance (1.0) corresponds to the system 3/(S)-4. (A) In the absence of HOAc. (B) In the presence of HOAc 0.6 M .

69.3, 114.7 + 115.0, 123.2 + 123.3, 127.0 + 127.1, 127.6, 128.3, 128.4, 128.7, 128.9, 129.0, 129.2, 130.0, 130.6, 131.5, 132.5, 135.6, 137.5, 137.8, 140.7, 144.6 + 144.7, 158.0 + 161.3, 173.9, 196.4. HRMS for $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{FO}_3$ (MH^+): calcd. 467.2022, found: 467.2020. UV λ_{max} ($\log \epsilon$): 200 (4.7), 250 (4.4), 340 (2.1).

Laser Flash Photolysis Experiments. Laser flash photolysis (LFP) experiments were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel Brilliant, 355 nm, 20 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled to a mLFP-111 Luzchem miniaturized equipment. This transient absorption spectrometer includes a ceramic xenon light source, 125 mm monochromator, Tektronix 9-bit digitizer TDS-3000 series with 300 MHz bandwidth, compact photomultiplier and power supply, cell holder and fiber optic connectors, fiber optic sensor for laser-sensing pretrigger signal, computer interfaces, and a software package developed in the LabVIEW environment from National Instruments. The LFP equipment supplies 5 V trigger pulses with programmable frequency and delay. The rise time of the detector/digitizer is $\sim 3 \text{ ns}$ up to 300 MHz (2.5 GHz sampling). The monitoring beam is provided by a ceramic xenon lamp and delivered through fiber optic cables. The laser

pulse is probed by a fiber that synchronizes the LFP system with the digitizer operating in the pretrigger mode. All transient spectra were recorded using $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ quartz cells with a capacity of 4 mL and were bubbled for 30 min with N_2 before signal acquisition. The absorbance of the samples was 0.2 at the laser excitation wavelength (355 nm).

RESULTS AND DISCUSSION

Pseudopeptidic naphthalene derivatives **1** and **2** belong to a family of molecules employed as model compounds in supramolecular chemistry.^{6,13,14,26–30} The synthesis of **1** and **2** has been reported elsewhere³¹ and is based on coupling of 1,4-bis(bromomethylnaphthalene) with valine; however, while **1** presents a macrocyclic structure, **2** conserves open chains at both sides of NPT. Together with **1** and **2**, the behavior of 1,4-dimethylnaphthalene (**3**) was also studied as the simplest model for comparison.

The UV–vis absorption spectrum of (S)-4 (MeCN, $1 \times 10^{-3} \text{ M}$) exhibited the characteristic $S_0 \rightarrow S_1$ band (320–390 nm). In the presence of increasing amounts of **1–3** (from 1×10^{-4} to $4 \times 10^{-4} \text{ M}$), this spectral region did not show any noticeable

change, indicating that selective excitation of the benzophenone chromophore is possible at long wavelengths (Figure S1 in the Supporting Information). The transient absorption spectrum ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, N_2) of pure (S)-4 at $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ concentration displayed the typical $^3\text{BZP}^*$ band peaking at 530 nm ($\tau_{\text{T}} = 1.6 \mu\text{s}$). After addition of 1, 2, or 3 (in the absence or presence of HOAc), new spectra were obtained (Figure 1A,B and Figure S2A–F in the Supporting Information).

It became clear that $^3\text{BZP}^*$ is efficiently quenched through a T–T energy transfer mechanism, leading to $^3\text{NPT}^*$ (band centered at $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$). As expected, the process was faster at higher naphthalene concentrations (Figure 2A,B and Figure S3A–F in the Supporting Information). Interestingly, the growth and decay of $^3\text{NPT}^*$ were clearly slower for the pseudopeptides than for model 3 (see Figure 3). The following observations apply to (S)-4/1–3 mixtures at 10:1 molar ratio, although the trend was similar within a broader range (26:1 to 6:1). Thus, $^3\text{1}^*$ and $^3\text{2}^*$ were formed relatively slowly ($480 \text{ ns} < \tau_{\text{growth}} < 620 \text{ ns}$) in comparison to $^3\text{3}^*$ ($\tau_{\text{growth}} = 271 \text{ ns}$), as observed from the initial rise of the trace monitored at $\lambda = 430 \text{ nm}$. Besides, in acidic medium the maximum was reached for pseudopeptides ca. 100 ns later than in the case of 3.

From the slope of the corresponding Stern–Volmer plots (Figure 2B), it was possible to obtain the corresponding k_{Q} values (Table 1); they indicated that quenching is similar for

Table 1. Relevant Photophysical Parameters for Triplet Excited States of (S)-4/1–3 Systems

conditions ^a	$k_{\text{Q}}/10^{10} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})$ ^b	$\tau_{\text{growth}}^{\text{obs}} \text{ (ns)}$	$A \text{ (}\% \text{)}$ ^d	$\tau_{\text{T}} \text{ (}\mu\text{s)}$ ^e	
1	A	0.49 ± 0.02	477 ± 4	84	3.25 ± 0.02
	B	0.34 ± 0.01	571 ± 5	63	6.05 ± 0.03
2	A	0.48 ± 0.01	513 ± 4	84	3.15 ± 0.02
	B	0.32 ± 0.04	616 ± 4	63	6.53 ± 0.03
3	A	1.16 ± 0.02	271 ± 3	100	1.79 ± 0.01
	B	1.05 ± 0.01	271 ± 2	94	1.11 ± 0.02

^aA = MeCN, B = MeCN, HOAc 0.6 M. ^bQuenching constant for $^3\text{4}^*$ ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) monitored at 530 nm in the presence of increasing amounts of NPT derivatives (from 1×10^{-4} to $4 \times 10^{-4} \text{ M}$). ^cRise of the $^3\text{NPT}^*$ signal, at 430 nm. ^dMaximum of the signal at $\lambda = 430 \text{ nm}$ for each NPT/BZP system (10:1 molar ratio), relative to 3/(S)-4 in the absence of HOAc, given as percentage. ^eTriplet lifetime of $^3\text{NPT}^*$, from the trace at 430 nm.

both pseudopeptides and faster for 3. The same trend was observed in acidic medium, although the processes took place at longer time scales.

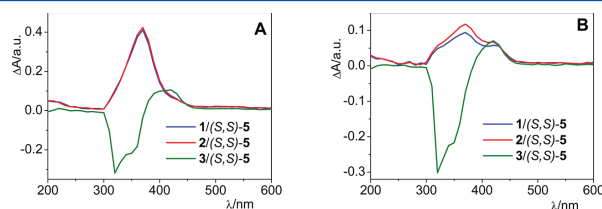


Figure 4. Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2 , $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) of (S,S)-5 in the presence of 1 (blue), 2 (red), or 3 (green), at $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ concentration. Spectra recorded at different time windows: (A) 0.20 μs ; (B) 1.00 μs .

Furthermore, comparison of the maximum absorbance values at 430 nm indicated that T–T energy transfer is more efficient in nonacidic medium, and that the amount of $^3\text{3}^*$ is higher than those of $^3\text{1}^*$ and $^3\text{2}^*$. This is in good agreement with the corresponding values of the rate constants found for quenching of the excited state precursor ($^3\text{4}^*$). These data could indicate that the geometry of approach between donor BZP and acceptor NPT is actually influenced by the pseudopeptidic architecture surrounding the polyaromatic chromophore in 1 and 2. Concerning the $^3\text{NPT}^*$ decay dynamics (linked to formation of a triplet exciplex between $^3\text{NPT}^*$ and BZP), the values of τ_{T} were almost coincident for $^3\text{1}^*$ and $^3\text{2}^*$, while $^3\text{3}^*$ was shorter-lived; i.e., the decay of the complex formed by BZP and $^3\text{1}^*$ or $^3\text{2}^*$ is retarded by the presence of the pseudopeptidic framework; this effect was more pronounced in acidic medium.

Relevant data are summarized in Table 1. In addition, the most remarkable difference found between the transient absorption spectra of pseudopeptides 1 and 2 and the model compound 3 was the absence of the negative band centered at 340 nm in the former. This signal can be attributed to delayed fluorescence from $^1\text{NPT}^*$, which arises through annihilation of the $^3\text{NPT}^*$ precursor and occurs in the microsecond time scale. A full LFP characterization of P-type delayed fluorescence in BZP/NPT systems has been recently published.³² Again, the absence of appreciable T–T annihilation could be due to the shielding effect caused by the pseudopeptidic moieties surrounding the naphthalene chromophore in the case of 1 and 2.

In order to investigate the triplet excited state interactions between biphenyl and pseudopeptides 1 and 2, (S)-4 was covalently linked to (S)- or (R)-2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propan-1-ol (obtained by reduction of flurbiprofen).³³ In order to detect possible stereodifferentiation in the excited-state interactions, dyads (S,S)- and (S,R)-5 were prepared. Their absorption spectra are also shown in Figure S6 (Supporting Information). Excitation of these dyads at $\lambda > 330 \text{ nm}$ should initially result in generation of $^3\text{BZP}^*$; however, after fast intramolecular T–T energy transfer $^3\text{BPN}^*$ would be selectively populated. The transient absorption spectra of (S,S)- and (S,R)-5 obtained after LFP at $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ are shown in Figure S7 (Supporting Information); their most remarkable feature is the presence of an intense band centered at 360 nm due to $^3\text{BPN}^*$,³⁴ together with a residual trace of $^3\text{BZP}^*$ at longer wavelengths (500–550 nm). In the presence of 1–3 (Figure 4), formation of $^3\text{BPN}^*$ was still detected at shorter lifetimes, although at longer time scales the spectral shape changed, and the typical $^3\text{NPT}^*$ band emerged at $\lambda = 430 \text{ nm}$. The kinetic behavior was different for pseudopeptides 1 and 2

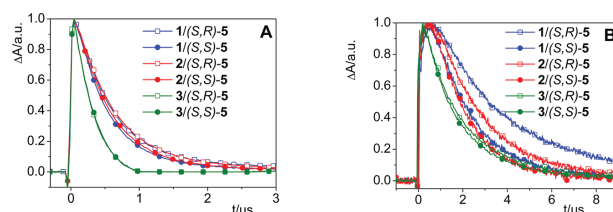


Figure 5. Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, MeCN, N_2) of (S,S)-5 and (S,R)-5 at $2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ concentration, in the presence of 1, 2, or 3, $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Normalized decays monitored at (A) 360 nm and (B) 430 nm.

and for the model compound 3 (Figure 5). Thus, in the spectra of (S,S)-5 in the presence of 1 and 2, both $^3\text{BPN}^*$ and $^3\text{NPT}^*$ contributions are observable in the second time window (1 μs after the laser pulse). However, only $^3\text{NPT}^*$ was detected under the same conditions in the presence of 3; remarkably, the negative band peaking at 330 nm, due to $^1\text{NPT}^*$ delayed fluorescence was also clearly visible in this case. The behavior of (S,R)-5 was similar; additional information is provided in Figures S8 and S9 of the Supporting Information.

The decays at 360 nm ($^3\text{BPN}^*$) and 430 nm ($^3\text{NPT}^*$) for the different combinations of (S,S)-5 and (S,R)-5 in the presence of 1–3 are shown in Figure 5. At both wavelengths, the decay was slower for pseudopeptides 1 and 2 than for the model compound 3. Besides, a significant stereodifferentiation was found for the kinetic traces of the $^3\text{NPT}^*$ species, with (S,R)-5 decaying consistently slower than its stereoisomer (S,S)-5. Notably, in the case of the open-chain derivative 2, the $^3\text{NPT}^*$ lifetime is significantly longer for (S,R)-5 than for (S,S)-5 (2.50 versus 1.89 μs). Moreover, for macrocycle 1, the more preorganized host, stereodifferentiation was even larger (triplet lifetimes 3.52 versus 1.92 μs). This supports the formation of an excited-state complex between donor 5 and chiral hosts 1 and 2, and is in agreement with the fact that achiral host 3 does not discriminate between diastereomeric guests (S,S)-5 and (S,R)-5.

The biphenyl and naphthalene triplet lifetimes are presented in Table 2. Triplet–triplet energy transfer from BZP to BPN Systems

Table 2. Triplet Lifetimes of BPN and NPT in NPT/BZP–BPN Systems

NPT derivative	dyad	$\tau(^3\text{BPN}^*)/\mu\text{s}$	$\tau(^3\text{NPT}^*)/\mu\text{s}$
none	(S,S)-5	1.45 ± 0.01	–
none	(S,R)-5	2.20 ± 0.01	–
1	(S,S)-5	0.52 ± 0.01	1.92 ± 0.02
1	(S,R)-5	0.62 ± 0.01	3.52 ± 0.03
2	(S,S)-5	0.59 ± 0.01	1.89 ± 0.05
2	(S,R)-5	0.66 ± 0.01	2.50 ± 0.06
3	(S,S)-5	0.30 ± 0.01	1.75 ± 0.01
3	(S,R)-5	0.30 ± 0.01	1.65 ± 0.01

was a very efficient process, both in the absence and in the presence of NPT derivatives. Thus, the band of $^3\text{BZP}^*$ was almost negligible already at the early time windows, and its lifetimes could not be determined accurately.

CONCLUSIONS

In summary, the triplet excited state of the NPT chromophore in 1 and 2 is an appropriate reporter for the interactions

between these pseudopeptides and mono- or bichromophoric systems containing triplet energy-donating moieties such as BZP and/or BPN. The presence of the macrocyclic or lateral chain substructures of 1 and 2 has a marked influence on the dynamics of the triplet manifold, retarding all the triplet–triplet energy-transfer processes, as well as $^3\text{NPT}^*$ deactivation via exciplex formation. Finally, the delayed fluorescence clearly detected in the model compound 3, as a result of the triplet–triplet annihilation, is absent in the pseudopeptides. This concept can, in principle, be exploited for the study of the excited-state interaction in supramolecular systems.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Absorption spectra, additional laser flash photolysis spectra and spectroscopic characterization of dyads (S,S)-5 and (S,R)-5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mcjimene@qim.upv.es (M.C.J.); mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the MICINN (Grants CTQ-2010-14882, CTQ2009-14366-C02-01 and FPI contract to P.B.), the Generalitat Valenciana (Prometeo 2008/090), the UPV (PAID 05-11 Program, ref 2766), and Fundació Caixa Castelló-UJI (P1 1B-2009-59) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1995.
- Cavalli, S.; Albericio, F.; Kros, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241–263.
- Uhlenheuer, D. A.; Petkau, K.; Brunsveld, L. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2817–2826.
- Loo, Y.; Zhang, S.; Hauser, C. A. E. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 593–603.
- Neffe, T.; Bilanz, M.; Grüneberg, I.; Meyer, B. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3482–3488.
- Laurencin, M.; Legrand, B.; Duval, E.; Henry, J.; Baudy-Floc'h, M.; Zatylny-Gaudin, C.; Bondon, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2025–2034.
- Galindo, F.; Burguete, M. I.; Vigara, L.; Luis, S. V.; Kabir, N.; Gavrilovic, J.; Russell, D. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 6504–6508.

- (7) Clark, J. L.; Peinado, J.; Stezowski, J. J.; Vold, R. L.; Huang, Y.; Hoatson, G. L. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26375–26387.
- (8) Angelici, G.; Castellucci, N.; Falini, G.; Huster, D.; Monari, M.; Tomasini, C. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 923–929.
- (9) Angelici, G.; Falini, G.; Hofmann, H.-J.; Huster, D.; Monari, M.; Tomasini, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8075–8078.
- (10) Eichler, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 707–713.
- (11) Robinson, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1278–1288.
- (12) Nielsen, P. E. *Pseudopeptides in Drug Discovery*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004.
- (13) Galindo, F.; Becerril, J.; Burguete, M. I.; Luis, S. V.; Vigarà, L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1659–1662.
- (14) Salom-Roig, X. J.; Martínez, J.; Burguete, M. I.; Galindo, F.; Luis, S. V.; Miranda, M. A.; Morant-Miñana, M. C.; Pérez-Prieto, J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4859–4862.
- (15) Vayà, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015–1020.
- (16) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayà, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134–10135.
- (17) Vayà, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694–2699.
- (18) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Boscá, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423–431.
- (19) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538–9539.
- (20) Vayà, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 11284–11287.
- (21) Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861–6865.
- (22) Pérez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829–833.
- (23) Pérez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4460–4468.
- (24) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (25) Carmichael, I.; Hugh, G. L. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*, 1–250.
- (26) Alfonso, I.; Burguete, M. I.; Galindo, F.; Luis, S. V.; Vigarà, L. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6130–6142.
- (27) Burguete, M. I.; Galindo, F.; Gavara, R.; Izquierdo, M. A.; Lima, J. C.; Luis, S. V.; Parola, A. J.; Pina, F. *Langmuir* **2008**, *24*, 9795–9803.
- (28) Burguete, M. I.; Galindo, F.; Izquierdo, M. A.; O'Connor, J.-E.; Herrera, G.; Luis, S. V.; Vigarà, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5967–5979.
- (29) Rubio, J.; Izquierdo, M. A.; Burguete, M. I.; Galindo, F.; Luis, S. V. *Nanoscale* **2011**, *3*, 3613–3615.
- (30) Martí-Centelles, V.; Burguete, M. I.; Galindo, F.; Izquierdo, M. A.; Kumar, D. K.; White, A. J. P.; Luis, S. V.; Vilar, R. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 490–500.
- (31) Burguete, M. I.; Galindo, F.; Izquierdo, M. A.; Luis, S. V.; Vigarà, L. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9493–9501.
- (32) Bonancia, P.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *515*, 194–196.
- (33) Asins-Fabra, B.; Andreu, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *207*, 52–57.
- (34) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayà, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038–1041.

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/pccp

PAPER

Excited state interactions between flurbiprofen and tryptophan in drug/protein complexes and in model dyads. Fluorescence studies from the femtosecond to the nanosecond time domains

Ignacio Vayá,^a Paula Bonacía,^a M. Consuelo Jiménez,^a Dimitra Markovitsi,^b Thomas Gustavsson^{b*} and Miguel A. Miranda^{a*}

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXX 20XX
DOI: 10.1039/c0xx00000x

We report here on the interaction dynamics between flurbiprofen (FBP) and tryptophan (Trp) covalently linked in model dyads and in a complex of FBP with human serum albumin (HSA) probed by time-resolved fluorescence spectroscopy from the femto- to the nano-second timescales. In the dyads, a rapid ($k > 10^{10} \text{ s}^{-1}$) dynamic quenching of the $^1\text{FBP}^*$ fluorescence is followed by a slower ($k > 10^9 \text{ s}^{-1}$) quenching of the remaining $^1\text{Trp}^*$ fluorescence. Both quenching processes display a clear stereoselectivity; the rates being 2-3 times higher for the (*R,S*)-dyad. In addition, a red-shifted exciplex emission is observed, rising in 100-200 ps. A similar two-step dynamic fluorescence quenching is also observed in the FBP/HSA complex, although the kinetics of the involved processes are slower. The characteristic reorientational times determined for the two enantiomeric forms of FBP in the protein show that the interaction is stronger for the (*R*)- form. This is, to our knowledge, the first observation of stereoselective flurbiprofen-tryptophan interaction dynamics with femtosecond time resolution.

1. Introduction

The binding of drugs to biomolecules is determinant not only for drug action (both therapeutic and toxic) but also for drug transport and disposition which are regulated by various transport proteins such as human serum albumin (HSA). The detailed understanding of drug-protein binding, both from a structural and dynamic point of view, constitute a particularly active research field today, with the aim to improve the drug delivery.

Flurbiprofen (FBP) [2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propanoic acid] is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) employed for the treatment of a broad spectrum of pathophysiological conditions, including fever, headache, etc.¹⁻⁴ FBP presents a chiral center and it has been reported that only the (*S*)-form possesses pharmacological activity (inhibition of the cyclooxygenase enzymes).^{5,6} It is known that FBP preferentially binds to HSA in the so-called site II following Sudlow's classification.⁷

HSA is one of the most abundant proteins in blood and plasma. This protein is responsible for the transport of different agents in the bloodstream, such as fatty acids, drugs, or metabolites.^{8,9} Therefore, the binding of ligands to HSA, and in particular its stereoselectivity, constitutes a key process, relevant for the modulation of a number of properties (drug solubility in plasma, toxicity, susceptibility to oxidation, in vivo half-life, etc.).^{10,11}

Optical spectroscopy has proven to be particularly useful in the study of drug-protein binding.^{12,13} The observed excited state dynamics may be interpreted in terms of fundamental processes such as intermolecular energy and electron transfer, depending on

the specific drug-protein binding. Characterizing the excited state thus allows a better understanding of the molecular recognition governing the drug transport. In particular, different enantiomers may have different binding properties resulting in easily distinguishable spectroscopic properties.

FBP contains a biphenyl chromophore with well-known photophysical properties.¹⁴ Possessing a non-negligible intersystem crossing yield, both the singlet and triplet states can in principle serve to monitor its binding to a protein. Indeed, previous laser flash photolysis studies on FBP/HSA complexes showed that the triplet state of FBP within the protein is different for the two enantiomers.^{15,16} It was also observed that FBP binds to both sites I and II, but with higher affinity to site II as indicated by the triplet quenching rates. However, the triplet lifetime monitors rather its protection from oxygen quenching and not the direct interaction with the protein. Also, the fundamental processes mentioned above involved in the binding dynamics occur on a much shorter time scale; a few nanoseconds or less.

Fluorescence spectroscopy provides therefore a more direct means to study molecular recognition since it involves the singlet excited state of the drug and its dynamics, which in most cases evolves on the nanosecond timescale. Various fluorescence techniques have been used in the past to investigate the interactions between different drugs and proteins, with special attention to HSA. In particular, steady-state fluorescence quenching is an efficient way to interrogate the interaction between the drug and the protein.¹⁷⁻²⁵ Time-resolved fluorescence measurements²⁶⁻²⁸ allow the characterisation of the dynamical processes involved and, in particular, femtosecond fluorescence

Solutions (about 25 ml) were kept flowing through a 0.4 mm quartz cell, which itself was kept in continuous motion perpendicular to the excitation beam in order to minimise thermal effects.

For the TCSPC measurements, a Becker & Hickl GmbH PC card was used. A Schott WG 295 filter was placed in front of a SPEX monochromator. The detector was a microchannel plate (R1564 U Hamamatsu) providing an instrumental response function of 60 ps (fwhm). The average laser power (0.1 mW) was measured with a Melles Griot broadband powermeter. The irradiated area on the surface of the cell was ca. 0.2 cm² corresponding to a pulse intensity of 2.4 kW/cm². Solutions were contained in a 10 mm × 10 mm quartz cell and continuously stirred. Successive recordings with the same sample gave 15 identical decays which were eventually merged to improve the signal-to-noise ratio. Such a procedure allowed us to ensure that the measured signals were not altered during the measurements due to a possible accumulation of photoproducts.

The time-resolved experiments were performed either at magic angle or under successive parallel ($I_{par}(t)$) and perpendicular ($I_{perp}(t)$) excitation/detection conditions. These were achieved by controlling the polarisation of the exciting beam with a zero-order half-wave plate. From these measurements, the fluorescence anisotropy was calculated from the formula:

$$r(t) = \frac{I_{par}(t) - RI_{perp}(t)}{I_{par}(t) + 2RI_{perp}(t)} \quad (1)$$

The transmission under parallel and perpendicular conditions was found to be identical so the correction factor R was put to unity.

3. Results and discussion

3.1 Studies on FBP-TrpMe model dyads

Due to the poor solubility of the FBP-TrpMe dyads in aqueous media, steady-state and time-resolved fluorescence experiments were performed in acetonitrile under aerated conditions. The fluorescence quantum yields of (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe were found to be 0.028 and 0.015, respectively (Figure SI-1), which are much lower than those of the individual chromophores.³⁷ From the shape and the position of the fluorescence bands, it was confirmed that emission is dominated by ¹TrpMe*. For both dyads, a longer wavelength band (centred at 450 nm), assigned to exciplex emission, was also observed. This band was more intense for the (*R,S*)- diastereomer.

Figures 1 and 2 show the fluorescence decays recorded by FU and TCSPC at both 310 nm (maximum of FBP emission) and 340 nm (maximum of TrpMe emission). The fluorescence decays of the dyads are much faster than those of FBP or TrpMe. This is in line with the low quantum yields and clearly shows that the fluorescence quenching is dynamic.

In order to explore the fluorescence quenching more in detail, it is instructive to inspect the FU decays recorded at 310 nm, where FBP emission is dominating (Figure 1A). For comparison, the fluorescence profile of (*S*)-FBP in MeCN is also given here. The most striking feature is the very rapid decay of the fluorescence from the dyads, occurring on the picosecond time scale. Another important aspect is the strong stereo-

differentiation; the fluorescence decay of the (*R,S*)- diastereomer is faster than that of the (*S,S*)-dyad. The fluorescence decays are highly non-exponential but the “average” characteristic times estimated at the 1/*e* level are ≈ 62 and ≈ 28 ps for (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe, respectively (Table 1). These times should be compared to the much longer and wavelength independent fluorescence lifetime of FBP; $\tau_f = 1.67$ ns. We note that the FBP signal at 310 nm shows a rapid rise, on the order of a few ps.⁴⁴ This can be assigned to a vibrational redistribution in the excited state, but is outside the scope of the present work.

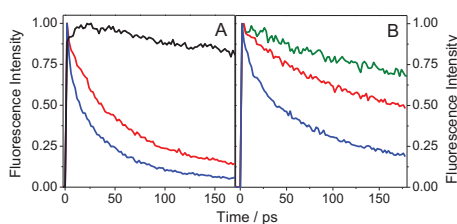


Figure 1. FU decays at A) ($\lambda_{em} = 310$ nm) and B) ($\lambda_{em} = 340$ nm) of (*S*)-FBP (black), (*S*)-TrpMe (green), (*S,S*)-FBP-TrpMe (red) and (*R,S*)-FBP-TrpMe (blue).

Based on the average fluorescence lifetimes given above, the corresponding rate constants (k_{Q1}) could be estimated (Table 1). The values obtained were higher than 10^{10} s⁻¹ and revealed a remarkable stereoselectivity.

Table 1. Kinetic parameters derived from the FU and TCSPC fluorescence decays of (*S*)-FBP, (*S*)-TrpMe, (*S,S*)-FBP-TrpMe and (*R,S*)-FBP-TrpMe in acetonitrile under air at 310 and 340 nm. Uncertainties are ± 5 % if not otherwise stated.

Compound	τ_f (ps) ^a	$k_{Q1} \times 10^{10}$	τ_f (ns) ^{b,c}	$k_{Q2} \times 10^9$
(<i>S</i>)-FBP	1670 ^c	-	-	-
(<i>S</i>)-TrpMe	2100 ^c	-	1.35	-
(<i>S,S</i>)-FBP-TrpMe	62 ^d	1.6	0.46	1.4
(<i>R,S</i>)-FBP-TrpMe	28 ^d	3.5	0.23	3.6

^a $\lambda_{em} = 310$ nm; ^b $\lambda_{em} = 340$ nm; ^cTCSPC; ^dFU

The FU decays at 340 nm (Figure 1B) are slower than those observed at 310 nm. Also here, the fluorescence decays are highly non-exponential with average characteristic times of ≈ 300 and ≈ 80 ps for (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe, respectively. We note that there is no rise in the signal as would be expected following the previously proposed energy transfer process from ¹FBP* to TrpMe.³⁷ This may actually be understood in terms of the strong direct excitation of TrpMe at 267 nm. Moreover, the spectral overlap of FBP and TrpMe emission is very important at this wavelength.

The fluorescence anisotropy decays of the dyads were compared to that of free FBP at 310 nm (Figure SI-2). For the latter, the anisotropy decayed with a characteristic time of about 26 ± 1 ps, while for (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe characteristic times of 42 ± 2 and 44 ± 4 ps were obtained. FBP has a molecular volume of ca. 300 Å³, which in the frame of the Stokes-Einstein-Debye theory⁴⁴ corresponds to a rotational time of about 27 ps, in correspondence with that observed. The total volume of the FBP-

TrpMe dyads is about 492 \AA^3 , giving a rotational time of about 44 ps, once again in agreement with those experimentally observed. The mono-exponential behavior of the anisotropy decays, and in particular the lack of any fast decays at early times, shows that there is no internal rotation between the two chromophores at early times. The slight difference between the (*S,S*)- and (*R,S*)- dyads are within the experimental uncertainties.

Regarding the fluorescence anisotropy decays at 340 nm; 24 ± 1 and 32 ± 2 ps for (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe respectively; they are faster than to those recorded at 310 nm. However, this is not necessarily the sign of any internal dynamics, but may only be the result of the disappearance of the FBP fluorescence (having a higher anisotropy, $r_0 \approx 0.31 \pm 0.01$) leaving only the TrpMe fluorescence (having a lower anisotropy, $r_0 \approx 0.17 \pm 0.01$) at this wavelength. The zero time fluorescence anisotropies for the (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe dyads at 340 nm are 0.25 ± 0.01 and 0.22 ± 0.01 , respectively, representing average values of FBP and TrpMe. As in the case of the fluorescence intensity decays, these observations can be explained in terms of the direct excitation of TrpMe and the spectral overlap of the two chromophores at 340 nm.

In order to follow the fluorescence dynamics at 340 nm, it is necessary to go to much longer times than what is possible with FU. Fluorescence decays recorded by TCSPC at 340 nm of (*S,S*)- and (*R,S*)-FBP-TrpMe as well as (*S*)-TrpMe in MeCN are shown in Figure 2A. As can be seen, the dyad signals decay much faster than that of TrpMe. This is once again characteristic for a dynamic quenching but occurring on a much slower timescale than what was observed for the FU data.

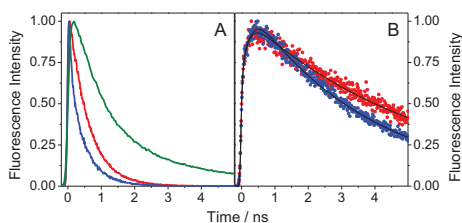


Figure 2. TCSPC decay traces at A) ($\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$), B) ($\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) of (*S*)-TrpMe (green), (*S,S*)-FBP-TrpMe (red) and (*R,S*)-FBP-TrpMe (blue). Fitted curves are shown in black.

What is striking is the clear difference observed in the decay traces of the (*S,S*)- and (*R,S*)- dyads. This stereo-differentiation was not detected in the previous study,³⁷ and constitutes an important new element. As for FU data, the (*R,S*)-FBP-TrpMe fluorescence decays more rapidly than that of (*S,S*)-FBP-TrpMe. Both signals are close to mono-exponential, with characteristic times of 460 and 230 ps for the (*S,S*)- and (*R,S*)- diastereomers, respectively (see Table 1). These times should be compared to the 1.35 ns decay time of TrpMe at this wavelength. The k_{Q2} values of the dyads, calculated from the corresponding τ_F values, underline the strong stereoselectivity.

The TCSPC decays of the dyads are much faster at 310 nm than at 340 nm (Figure SI-3). This may not seem surprising at

first in view of the fact that the FBP fluorescence is very efficiently quenched. In fact, we do not expect any emission from FBP beyond a few tens of picoseconds, so the residual fluorescence should be due to the TrpMe unit at both wavelengths. Still, the fluorescence lifetimes measured at 310 and 340 nm are very different. Actually, the Trp fluorescence is known to be very complex, with strongly wavelength dependent decay times.³⁶ This has been assigned to the co-existence of several rotamers with different excited state dynamics,⁴⁵ which may also occur in the dyads.

The TCSPC profiles at 450 nm (Figure 2B) are much slower than those at either 310 or 340 nm. Interestingly, these profiles are characterized by a rapid rise, 115 ± 7 and 189 ± 6 ps for (*S,S*)- and (*R,S*)-, respectively. This rise can be assigned to the formation of an exciplex.³⁷ The rate of this process is intermediate between the two fluorescence quenching processes previously described, so it is impossible to correlate it with the one or the other. As already proposed in the literature, such exciplexes could serve as intermediates for electron transfer processes,⁴⁶ consistent with the electron donor character of Trp.³⁶ The fitted exciplex lifetimes are 5.34 ± 0.02 and 3.63 ± 0.01 ns for the (*S,S*)- and (*R,S*)- diastereomers, respectively, displaying the same order as the fluorescence quenching.

3.2 Studies on FBP/HSA complexes

Steady-state UV absorption and fluorescence measurements on FBP/HSA complexes were performed on mixtures of FBP (either (*S*)-FBP/HSA or (*R*)-FBP/HSA, $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) and HSA at 0.7:1 molar ratio in PBS, since under these conditions all the drug is essentially bound to the protein.¹⁶

The UV absorption and emission spectra of (*S*)-FBP, HSA, and (*S*)-FBP/HSA are shown in Figure 3. Parallel experiments were conducted with the (*R*)-enantiomer, and the results were basically identical (data not shown).

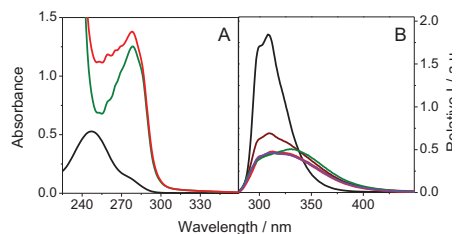


Figure 3. A) UV absorption spectra of (*S*)-FBP (black), HSA (green), and the (*S*)-FBP/HSA mixture (red) in PBS. The concentration of the solutions was $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ for FBP and $3.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ for HSA; B) fluorescence spectra of (*S*)-FBP (black), HSA (green), and (*S*)-FBP/HSA (red) in PBS, under air, using isoabsorptive solutions at the excitation wavelength (267 nm). Simulated emissions, taking into account the percentage of light absorbed by each subunit (dark red), and the possible quenching processes as explained in the text (violet) are also shown.

Comparing the fluorescence spectra of the drug/protein mixtures with those of isolated FBP and HSA revealed that both contribute to the emission of the complex. This is in principle not surprising since both chromophores absorb strongly at the

excitation wavelength.

Taking into account the relative absorbances of FBP and HSA at 267 nm, one can calculate the resulting fluorescence spectrum of the complex using the simple relation

$$A_F(\text{tot}) = 0.18 \times A_F(\text{FBP}) + 0.82 \times A_F(\text{HSA}) \quad (2)$$

where A_F (FBP) and A_F (HSA) is the area under the emission curves of the two subunits. However, the simulated spectrum does not match the experimental one. Instead, an excellent reproduction of the real emission of the drug/protein system (Figure 2) was achieved by using the relation

$$A_F(\text{tot}) = 0.074 \times A_F(\text{FBP}) + 0.746 \times A_F(\text{HSA}) \quad (3)$$

corresponding to an important quenching of the FBP fluorescence and a lower deactivation of the HSA fluorescence.

In order to gain further insight into the excited state dynamics of these systems, fluorescence decays of FBP, HSA and the two complexes were recorded by FU and TCSPC at various wavelengths.

While the fluorescence decay of FBP in bulk PBS solution is monoexponential, those of HSA and the two FBP/HSA complexes are strongly non-exponential and wavelength dependent. In general, three-exponential model functions were required to accurately describe the fluorescence traces of the protein-containing samples (Table 2). In view of the complexity of the fluorescence decay analysis, we also report the average lifetime ($\langle\tau\rangle$) which allows an easier comparison of the excited state dynamics of FBP within and outside the protein.

To illustrate this, the FU measurements of FBP and the FBP/HSA complexes recorded at 310 nm are shown in Figure 4. At early times, the fluorescence decays of the two enantiomers are identical, showing an instantaneous rise, limited by the apparatus function, followed by a constant value (Figure 4A).

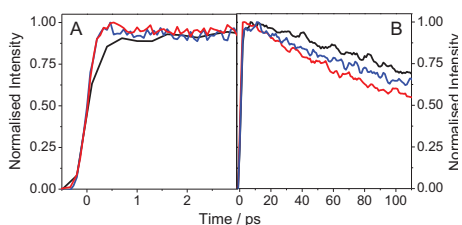


Figure 4. FU decays of (S)-FBP (black), (S)-FBP/HSA (red) and (R)-FBP/HSA (blue) in PBS/air at 310 nm. Note the different timescales used in A) and B).

Interestingly, the slight picosecond rise observed for free FBP is lacking for the complexes. This rise, that was also observed in acetonitrile, may be attributed to an intramolecular vibrational relaxation. That it is missing in the two complexes may indicate that FBP is rather tightly bound to the protein, resulting in a reduced coupling of its vibrational modes. Alternatively, such a tight binding would imply a fast intermolecular vibrational relaxation which could accelerate the FBP intramolecular

vibrational relaxation. As a consequence, it would be too fast to be detected with our current time-resolution.

Beyond a few picoseconds, the fluorescence decays of the two FBP/HSA complexes become slightly more rapid than that of free FBP (Figure 4B). This behavior can be explained in terms of a dynamic quenching of the FBP fluorescence when bound to the protein. This dynamic quenching is clearly configuration-dependent. The approximate characteristic decay times in the 0–120 ps time window are ≈ 180 and ≈ 250 ps for (S)-FBP/HSA and (R)-FBP/HSA, respectively.

This dynamical quenching at 310 nm persists and becomes even more marked at longer times, as illustrated by the TCSPC traces shown in Figure 5A. While the fluorescence decay of FBP is monoexponential with a lifetime of 0.78 ns, that of HSA is more complex and can be described by an average lifetime $\langle\tau\rangle = 1.22$ ns. On the nanosecond timescale, the fluorescence decays of the two FBP/HSA complexes are much more rapid than that of free FBP. The decrease in the average fluorescence lifetime is more important for the (S)- than for the (R)-enantiomer (0.54 ns vs. 0.70 ns).

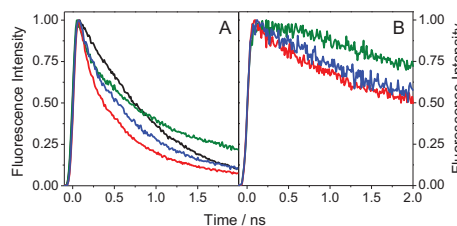


Figure 5. TCSPC decays of (S)-FBP (black), HSA (green), (S)-FBP/HSA (red) and (R)-FBP/HSA (blue) in PBS at A) $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm, and B) $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm.

At 380 nm (Figure 5B), where only HSA emits, the measured fluorescence lifetimes are much longer for both complexes (Table 2). Still, they are shorter than that of HSA alone. Remarkably, there is a clear stereoselectivity also in this process.

The HSA fluorescence is known to be highly non-exponential,³⁶ but the actual characteristic decay times depend on both the excitation and the emission wavelengths, ranging from less than one to several nanoseconds.^{47–49} The origin of this has been mainly assigned to the heterogeneity of the Trp microenvironment.⁴⁷ Previous femtosecond studies of UV excited HSA have shown that the dynamics of Trp within the protein are slow compared to those in solution.^{50–52} This is very much in line with what we observe.

Regarding the fluorescence anisotropies recorded by FU, several interesting aspects can be noted (Figure 6A). For HSA, an initial value of about 0.18 is observed which is the same as for isolated Trp. This also shows that the HSA fluorescence is dominated by Trp and other residues do not contribute. The fluorescence anisotropy remains constant over the observed time window, in line with a slow rotational diffusion of the voluminous protein. In contrast, for FBP, the initial fluorescence anisotropy at time zero (r_0) is 0.36 ± 0.02 and it decays with a

characteristic time of 65 ± 6 ps (in accordance with the rotational diffusion of FBP in water). However, in the presence of the protein, the r_0 value drops to 0.29 ± 0.02 but it remains practically constant during the first hundreds of picoseconds. In principle, this can be explained by the drug being inert within the protein due to the more constrained microenvironment. Since overlapping fluorescence from both FBP and HSA is observed, the resulting anisotropy value (0.29) is in between those of FBP (0.36) and HSA (0.18).

Table 2. Kinetic parameters obtained from the fitting of the TCSPC decays upon excitation at 267 nm in PBS under air. Uncertainties are ± 5 % if not otherwise stated.

λ_{em} (nm)	Parameters ^a	HSA	(S)-FBP/HSA	(R)-FBP/HSA
310	τ_1 (ns)/ p_1 (%)	0.16/5	0.18/17	0.25/9
	τ_2 (ns)/ p_2 (%)	1.00/36	0.69/51	0.72/60
	τ_3 (ns)/ p_3 (%)	4.36/59	3.48/32	3.51/31
	$\langle \tau \rangle$ (ns)	1.22	0.54	0.70
380	τ_1 (ns)/ p_1 (%)	2.94/18	0.36/3	0.53/3
	τ_2 (ns)/ p_2 (%)	6.93/71	2.59/25	3.08/30
	τ_3 (ns)/ p_3 (%)	12.8/11	7.68/72	7.95/67
	$\langle \tau \rangle$ (ns)	5.78	3.69	4.14

^a Obtained by a non-linear fitting/deconvolution procedure, using a three exponential function $F(t) = \sum a_i \exp(-t/\tau_i)$; $p_i = 100a_i \tau_i / (a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 + a_3 \tau_3)$; $\langle \tau \rangle$ is the average lifetime, determined as $a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 + a_3 \tau_3$. At 310 nm, τ_F (FBP) was 0.78 ns.

The ns fluorescence anisotropy decays recorded by TCSPC at $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm are shown in Figure 6B. In contrast with the ps fluorescence anisotropy decays recorded by FU, a chiral discrimination can be observed. For both drug/protein systems, the r_0 value was *ca.* 0.28 ± 0.02 and decreased rapidly to a constant value within the first few nanoseconds. The anisotropy decays were properly fitted using monoexponential model functions. While the characteristic time for (S)-FBP/HSA was found to be 0.44 ± 0.03 ns and that of (R)-FBP/HSA 0.62 ± 0.07 ns. The difference in lifetime can be related to the orientation of the drug within the protein, which may restrict the degrees of freedom for conformational relaxation more effectively in the case of the (R)-enantiomer.

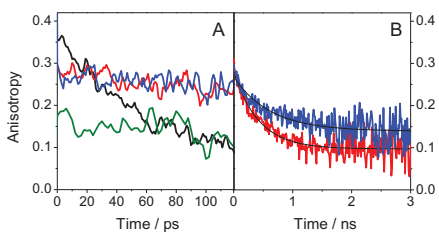


Figure 6. Fluorescence anisotropy decays of (S)-FBP (black), HSA (green), (S)-FBP/HSA (red) and (R)-FBP/HSA (blue) in PBS at $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm. A) FU and B) TCSPC (the best fit it is shown in black solid line).

Actually, it is well known that for a chromophore attached to a protein its motional freedom is restricted. A common model to describe such restricted rotational diffusion is the “wobbling-in-a-cone” model.⁵³

$$r(t) = r_0 \left[(1 - A_\infty) e^{-t/\tau_R} + A_\infty \right] \quad (4)$$

$$A_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} = \left[\frac{1}{2} \cos \theta_{\text{max}} (1 + \cos \theta_{\text{max}}) \right]^2 \quad (5)$$

In equation (5), θ_{max} corresponds to the semicone angle defining the restricted motion of the chromophore. Using $r_0 = 0.28$ and $r_\infty = 0.10/0.14$ for S/R respectively, one can calculate the corresponding values of θ_{max} to 46° and 26° . This means that (S)-FBP will cover a solid angle during its rotational diffusion which is four times as large as that covered by the (R)-enantiomer. In addition, its characteristic reorientational time is more than twice as fast as well. These two parameters are typical for a much more restricted conformation of the (R)-enantiomer within the protein.

Conclusions

The goal of the present work was to elucidate the interaction between flurbiprofen and tryptophan and in particular the role of stereoselectivity. To this aim, we compared the photophysical behaviour of FBP when covalently linked to Trp in a model dyad with that of FBP in a non-covalent complex with human serum albumin.

A dramatic fluorescence quenching was observed in the model dyads, which display only a weak emission assigned to the Trp unit. According to the analysis of the FU decays, this quenching is dynamic ($k > 10^{10} \text{ s}^{-1}$) and stereoselective, with a higher rate constant for the (R,S)-diastereomer. The rapid quenching of the FBP fluorescence has previously been attributed to an energy transfer to Trp. While this explanation remains a possibility, it can neither be confirmed nor discarded by the present experiments. At longer timescales, a slower stereoselective quenching ($k > 10^9 \text{ s}^{-1}$) of the ¹Trp* fluorescence is also observed together with exciplex formation.

Similar trends were observed in the drug/protein complexes, although the kinetics of the involved processes were slower. The fluorescence decay at $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm (FBP emission maximum) revealed a stereoselective dynamic quenching, both on the picosecond (FU) and nanosecond (TCSPC) time scales, analogous to what was found in the dyads. This kinetic stereodifferentiation was still evident at longer wavelengths (380 nm), where only HSA is emitting. As in the dyads, the nature of this slower quenching can be attributed to a stereoselective exciplex formation and/or electron transfer.

Finally, the fluorescence anisotropy decays at 310 nm recorded by TCSPC clearly showed that the protein microenvironment plays a significant role in the conformational relaxation of FBP, which is more restricted in the case of the (R)-enantiomer. This stereoselectivity is possibly related to the drug binding capability of the protein and could have, by extrapolation, consequences for the FBP pharmacological activity.

Comparing the behaviour of the dyads and the complex, we deduce that the same fundamental processes occur in the two systems, although on much different time-scales. The observed dynamic quenching rates are much lower in the complexes than in the dyads, which can be understood in terms of the strong conformation dependences of the processes involved.

To conclude, this systematic study of FBP-Trp interactions based on time-resolved fluorescence shows that the covalently

linked dyads are suitable models to simulate the non-covalent interactions in the supramolecular drug/protein systems.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Government (Grants CTQ2010-14882 and CTQ2009-13699, PR2011-0581, JCI-2010-0624, BES-2008-003314), the Generalitat Valenciana (Prometeo 2008/090) and from the Universitat Politècnica de València (PAID 05-11, Ref 2766) is gratefully acknowledged.

Notes and references

- ^a Chemistry Department/Institute of Chemical Technology UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, Spain. Fax: +34967879349; Tel: +34967877344; E-mail: mmiranda@qim.upv.es.
- ^b CNRS, IRAMIS, SPAM, Francis Perrin Laboratory, URA 2453, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax: +330169087639; Tel: +330169084644; E-mail: thomas.gustavsson@cea.fr
- J. Rovinsky and D. Micekova, *Drug Exp. Clin. Res.*, 2000, **26**, 19-24.
- N. Bellamy, W. G. Bensen, P. M. Ford, S. H. Huang and J. Y. Lang, *Clin. Invest. Med.*, 1992, **15**, 427-433.
- D. S. Muckle, *Am. J. Med.*, 1986, **80**, 76-80.
- M. Vetrugno, A. Maino, G. M. Quaranta and L. Cardia, *Clin. Ther.*, 2000, **22**, 719-731.
- H. A. Bae, K. W. Lee and Y. H. Lee, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2006, **40**, 24-29.
- S. Sagdine and H. Pir, *Spectrochim. Acta A*, 2009, **73**, 181-194.
- T. Wybranowski, M. Cyrankiewicz, B. Ziomkowska and S. Kruszewski, *Biosystems*, 2008, **94**, 258-262.
- T. Peters, in *All About Albumin - Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1995, pp. 76-132.
- D. C. Carter and J. X. Ho, *Advances in Protein Chemistry*, 1994, **45**, 153-203.
- U. Madsen, P. Kroegsgaard-Larsen and T. Liljefors, *Textbook of Drug Design and Discovery*, Taylor and Francis, Washington DC, 2002.
- B. Zimmermann, C. Hahnefeld and F. W. Herberg, *Targets*, 2002, **1**, 66-73.
- Y. V. Il'ichev, J. L. Perry and J. D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 452-459.
- Y. V. Il'ichev, J. L. Perry and J. D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 460-465.
- M. C. Jimenez, M. A. Miranda, R. Tormos and I. Vaya, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 1038-1041.
- M. C. Jimenez, M. A. Miranda and I. Vaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10134-10135.
- I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 1015-1020.
- N. Seedher and S. Bhatia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **39**, 257-262.
- N. Seedher and S. Bhatia, *Pharmacol. Res.*, 2006, **54**, 77-84.
- R. K. Nanda, N. Sarkar and R. Banerjee, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2007, **192**, 152-158.
- Y. He, Y. W. Wang, L. F. Tang, H. Liu, W. Chen, Z. L. Zheng and G. L. Zou, *J. Fluoresc.*, 2008, **18**, 433-442.
- B. Zhou, R. Li, Y. Zhang and Y. Liu, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 453-459.
- I. Vaya, R. Pérez-Ruiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.*, 2010, **486**, 147-153.
- H. Vahedian-Movahed, M. R. Saberi and J. Chamani, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2011, **28**, 483-502.
- B. Hemmateenejad, M. Shamsipur, F. Samari, T. Khayamian, M. Ebrahimi and Z. Rezaei, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **67-68**, 201-208.
- U. Katrahalli, V. K. A. Kalalbandi and S. Jaldappagari, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **59**, 102-108.
- M. El-Kemary, M. Gil and A. Douhal, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 2896-2902.
- L. Tormo, J. A. Organero, B. Cohen, C. Martin, L. Santos and A. Douhal, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 13641-13647.
- S. Tardioli, I. Lammers, J. H. Hooijschuur, F. Ariese, G. van der Zwan and C. Gooijer, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 7033-7039.
- D. P. Zhong, A. Douhal and A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, **97**, 14056-14061.
- A. Douhal, M. Sanz and L. Tormo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 18807-18812.
- B. Cohen, J. A. Organero, L. Santos, L. R. Padial and A. Douhal, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 14787-14795.
- M. Gil, Y. Wang and A. Douhal, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2012, **234**, 146-155.
- Y. L. Wang, B. Cohen, L. Jicsinszky and A. Douhal, *Langmuir*, 2012, **28**, 4363-4372.
- P. G. Takla, S. G. Schulman and J. H. Perrin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1985, **3**, 41-50.
- I. Lammers, V. Lhiaubet-Vallet, M. Consuelo Jiménez, F. Ariese, M. A. Miranda and C. Gooijer, *Chirality*, 2012, **24**, 840-846.
- J. R. Lakowicz, Plenum Press, New York, 2006, ch. Chapters 16, 17.
- I. Vaya, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 9363-9371.
- M. C. Jiménez, U. Pischel and M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. C*, 2007, **8**, 128-142.
- S. Abad, U. Pischel and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 2711-2717.
- S. Abad, I. Vaya, M. C. Jimenez, U. Pischel and M. A. Miranda, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 2175-2183.
- M. Montalti, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton FL, 2006.
- T. Gustavsson, A. Sharonov and D. Markovitsi, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **351**, 195-200.
- F. A. Miannay, T. Gustavsson, A. Banyasz and D. Markovitsi, *J. Phys. Chem. A*, 2010, **114**, 3256-3263.
- P. Bonancia, I. Vayá, M. J. Climent, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 8807-8814.
- J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald and G. R. Fleming, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 3824-3832.
- H. Lemmetyinen, N. Tkachenko, A. Efimov and M. Niemi, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2009, **13**, 1090-1097.
- A. Siemiarz, C. E. Petersen, C. E. Ha, J. S. Yang and N. V. Bhagavan, *Cell Biochem. Biophys.*, 2004, **40**, 115-122.
- J. M. Beechem and L. Brand, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 43-71.
- A. Sarkar and S. C. Bhattacharya, *J. Lumin.*, 2012, **132**, 2612-2618.
- W. Lu, J. Kim, W. Qiu and D. Zhong, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **388**, 120-126.
- W. Qiu, L. Zhang, O. Okobiah, Y. Yang, L. Wang, D. Zhong and A. H. Zewail, *J. Phys. Chem. B*, 2006.
- L. Zhang, Y.-T. Kao, W. Qiu, L. Wang and D. Zhong, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 18097-18103.
- G. F. Schroder, U. Alexiev and H. Grubmuller, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 3757-3770.

Stereodifferentiation in the Intramolecular Singlet Excited State Quenching of Hydroxybiphenyl/Tryptophan Dyads

Paula Bonancía,^a Ignacio Vayá,^a Dimitra Markovitsi,^b Thomas Gustavsson,^b M. Consuelo Jiménez^{*a} and Miguel A. Miranda^{*a}

⁵ Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXX 20XX
DOI: 10.1039/b000000x

The photochemical processes occurring in diastereomeric dyads (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1**, prepared by conjugation of (*S*)-2-(2-hydroxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid ((*S*)-**BPOH**) with (*S*)- and (*R*)-**Trp**, have been investigated. In acetonitrile, the fluorescence spectra of (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1** were coincident in shape and position with that of (*S*)-**BPOH**, although they revealed a markedly stereoselective quenching. Since singlet energy transfer from **BPOH** to **Trp** is forbidden (5 kcal mol⁻¹ uphill), the quenching was attributed to thermodynamically favoured (according to Rehm-Weller) electron transfer or exciplex formation. Upon addition of 20% water, the fluorescence quantum yield of (*S*)-**BPOH** decreased, while only minor changes were observed for the dyads. This can be explained by an enhancement of the excited state acidity of (*S*)-**BPOH**, associated with bridging of the carboxy and hydroxy groups by water, in agreement with the presence of water molecules in the X-ray structure of (*S*)-**BPOH**. When the carboxy group was not available for coordination with water, as in the methyl ester (*S*)-**BPOHMe** or in the dyads, this effect was prevented; accordingly, the fluorescence quantum yields did not depend on the presence or absence of water. The fluorescence lifetimes in dry acetonitrile were 1.67, 0.95 and 0.46 ns for (*S*)-**BPOH**, (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1**, respectively, indicating that the observed quenching is indeed dynamic. In line with the steady-state and time-resolved observations, molecular modelling pointed to a more favourable geometric arrangement of the two interacting chromophores in (*S,R*)-**1**. Interestingly, this dyad exhibited a folded conformation in the solid state.

Introduction

Bichromophoric compounds incorporating two photoactive moieties are useful models to gain insight into key mechanistic aspects of light-induced processes. In this context, intramolecular energy, proton or electron transfer, as well as exciplex formation and photochemical reactivity, have received considerable attention.¹ These processes have been investigated in a variety of systems, including dyads containing a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) covalently linked to a biomimetic substructure (for instance, an amino acid or a nucleoside, as models for proteins or DNA).² Specifically, previous efforts have been devoted to the photophysical study of dyads containing NSAIDs and the amino acid tryptophan (**Trp**), as valuable tools to provide relevant information on drug-protein interactions within the binding sites.³ In this context, steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy has been widely used to address a variety of biological problems,⁴ including the excited state interactions between proteins and complexed ligands.⁵

The photophysical behaviour of diastereomeric dyads containing the biphenyl-like NSAID flurbiprofen ((*S*)-**FBP**, Chart

1) and **Trp** has recently been described.⁶ Upon irradiation at 266 nm, both chromophores are excited, but only **Trp** emission ($E_S = 96$ kcal mol⁻¹) is detected. Moreover, stereoselective intramolecular ¹**Trp*** charge transfer quenching is observed, accompanied by formation of exciplexes. Indeed, the absorption and emission properties of **Trp** are very sensitive to the local environment⁷ and have been employed to investigate structural changes of protein functions⁸ and to address the protein binding of endogenous and exogenous agents (such as drugs, fatty acids, metabolites).⁹

Attachment of a hydroxy group at the *ortho* position of a biphenyl results in a significant decrease of its singlet energy (*ca.* 10 kcal mol⁻¹) and provides an additional deactivation pathway, namely excited state intramolecular proton transfer (ESIPT). As ESIPT is in general a reversible process,¹⁰ it has found application for the design of photostabilizers, solar filters, solar energy collectors, etc.¹¹ In hydroxybiphenyls, ESIPT occurs from the acidic phenolic proton to the sp² hybridized 2'-carbon of the aromatic ring, giving rise to a reactive quinone methide. In addition, intermolecular excited state deprotonation is observed in

the presence of bulk water, to give the corresponding phenolate.¹²

With this background, we have now investigated the photophysical processes occurring in diastereomeric dyads (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1** (Chart 1), which contain a chiral 2-hydroxybiphenyl derivative covalently linked to **Trp**.

Results and Discussion

The required (*S*)-2-(2-hydroxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid (*S*)-**BPOH** was readily obtained by irradiation of (*S*)-**FBP** in aqueous media, through a photoreductive substitution.¹³ The dyads (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1** were prepared by conjugation of (*S*)-**BPOH** with the (*S*)- or (*R*)- methyl ester of tryptophan (**TrpMe**), using a carbodiimide as activating agent. The chemical structures are shown in Chart 1.

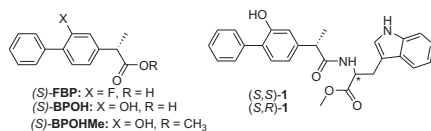


Chart 1

The UV-Vis absorption spectrum of (*S,S*)-**1** in MeCN is shown in Figure 1, together with those of (*S*)-**FBP** and (*S*)-**BPOH** for comparison. It can be observed that replacement of fluorine by hydroxyl induces a bathochromic shift of the longer wavelength band. The spectra of (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1** were coincident and matched with that obtained upon addition of the absorption spectra of the isolated chromophores ((*S*)-**BPOH** and (*S*)-**TrpMe**), indicating the absence of significant interactions between the two moieties in the ground state.

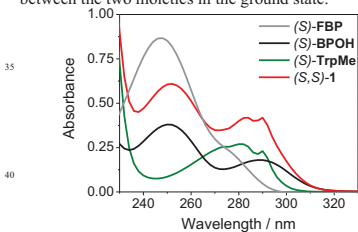


Figure 1. UV-Vis absorption spectra of (*S*)-**FBP** (grey), (*S*)-**BPOH** (black), (*S*)-**TrpMe** (green) and (*S,S*)-**1** (red) in acetonitrile at 5×10^{-5} M concentration.

The fluorescence spectra of (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1**, obtained after excitation at $\lambda = 267$ nm in MeCN/air, are shown in Figure 2 (solid lines) together with that of (*S*)-**BPOH**. All the emissions consisted in a structureless band centered at ca. 330 nm (Table 1). In the dyads, the incident photons are absorbed by both the hydroxybiphenyl chromophore and the **Trp** moiety (Figure 1); however, no **Trp** contribution was observed in the fluorescence spectra, which were coincident in shape and position with that of (*S*)-**BPOH**. From the intersection between the excitation ($\lambda_{\text{em}} = 330$ nm) and emission ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm) normalised bands (Figure

S4 in Supporting Information), a singlet energy value of ca. 91 kcal mol⁻¹ was obtained for (*S*)-**BPOH**, (*S,S*)-**1** and (*S,R*)-**1**.

In the dyads, the most remarkable observation was a dramatic quenching, which turned out to be stereoselective (see Table 1). Since SSET from (*S*)-**BPOH** to **Trp** is thermodynamically forbidden, the observed quenching was in principle attributed to electron transfer or exciplex formation.

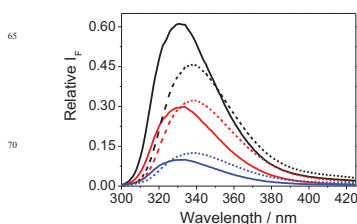


Figure 2. Fluorescence spectra of (*S*)-**BPOH** (black), (*S,S*)-**1** (red) and (*S,R*)-**1** (blue) at $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, under air. Solid lines: MeCN; dashed lines: MeCN/H₂O 4:1.

The feasibility of formation of radical ion pairs or exciplexes from the singlet excited state can be estimated by application of the Rehm-Weller equations.¹⁴ Taking into account the corresponding oxidation (E_{OX}) and reduction (E_{RED}) potentials,¹⁵ the appropriate dielectric constants (ϵ)¹⁶ and the (*S*)-**BPOH** singlet energy ($E_{\text{S}} = 91$ kcal mol⁻¹), a favourable thermodynamics was anticipated for charge transfer quenching via both electron transfer and exciplex formation. These processes are more likely to occur in folded conformations, since a close contact is required between the donor and acceptor moieties. As a matter of fact, the (*S,R*)-diastereomer exhibited a folded conformation in the solid state, as shown by X-ray diffraction (Figure 3). Interestingly, quenching was more efficient in this dyad than in (*S,S*)-**1**.

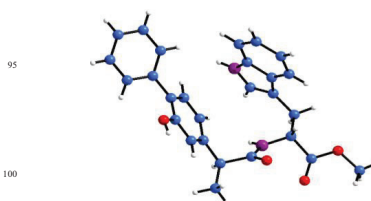


Figure 3. X-ray structure of compound (*S,R*)-**1**.

To check whether ESIPPT from the acidic phenolic proton to the sp² hybridised 2'-carbon of the neighbouring aromatic ring could play a role in these systems, in competition with charge transfer quenching, a 20% of water was added (dashed lines in Figure 2). This water content should be low enough as to prevent intermolecular excited state deprotonation to bulk water, giving the corresponding phenolate.

Table 1. Relevant photophysical parameters for (S)-BPOH, (S)-BPOHMe, (S,S)-1 and (S,R)-1.^a

	MeCN				MeCN/H ₂ O			
	(S)-BPOH	(S)-BPOHMe	(S,S)-1	(S,R)-1	(S)-BPOH	(S)-BPOHMe	(S,S)-1	(S,R)-1
$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)	331	334	330	332	338	340	339	339
$\phi_{\text{F}}^{\text{b}}$	0.241	0.290	0.116	0.042	0.200	0.280	0.139	0.060
τ_{F} (ns) ^c	1.67	2.10	0.95	0.46	1.27	1.80	1.07	0.57
$k_{\text{F}} \times 10^8$ (s ⁻¹) ^d	1.43	1.38	1.22	0.94	1.57	1.55	1.29	1.05
$k_{\text{Q}} \times 10^8$ (s ⁻¹) ^e	-	-	4.5	15.8	-	-	1.5	9.7
$\phi_{\text{Q(ov)}}^f$	-	-	0.52	0.83	-	-	0.31	0.70
$\phi_{\text{Q(dy)}}^g$	-	-	0.43	0.68	-	-	0.16	0.55

^aThe absorbance of the samples was 0.2 at the excitation wavelength. ^b $\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, air, (S)-TTP in water as standard ($\phi_{\text{std}} = 0.13$); ^c $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm; ^d $k_{\text{F}} = \phi_{\text{F}}/\tau_{\text{F}}$; ^e $k_{\text{Q}} = (1/\tau_{\text{F(dy)}} - 1/\tau_{\text{F(BPOH)}})$; ^f $\phi_{\text{Q(ov)}} = [1 - (\phi_{\text{F(dy)}}/\phi_{\text{F(BPOH)}})]$; ^g $\phi_{\text{Q(dy)}} = \phi_{\text{F(dy)}}k_{\text{Q(dy)}}/k_{\text{F(dy)}}$.

In this solvent mixture, the emission maxima were red-shifted, due to the enhanced medium polarity. Remarkably, the fluorescence quantum yield of (S)-BPOH was clearly lower than in dry MeCN, while only minor changes were observed for the dyads (Table 1). A similar trend has been reported for the model compound 2-hydroxybiphenyl under related conditions (acetonitrile containing 10 M water), although fluorescence quenching occurs to a lesser extent.¹² The interesting effect observed with (S)-BPOH in the presence of water can be explained by an enhancement of the excited phenol acidity, associated with bridging of the carboxy and hydroxy groups by water. As a matter of fact, this situation is clearly observed in the X-ray structure of (S)-BPOH, which actually crystallizes with a water molecule (Figure 4A). This effect should be, in principle, avoided by preventing water-mediated bridging between carboxy and hydroxy group.

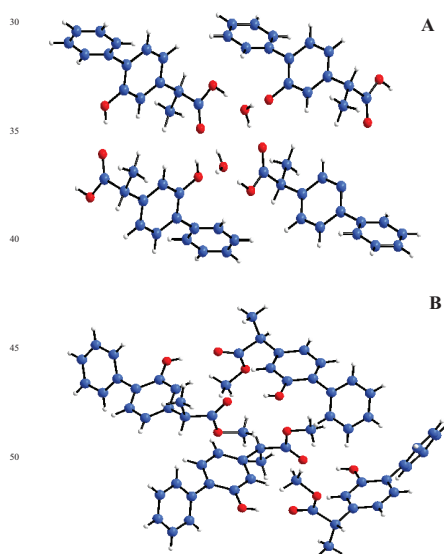


Figure 4. Fragment of the unit cell for A: (S)-BPOH and B: (S)-BPOHMe.

With this purpose, we synthesized the methyl ester (S)-BPOHMe. As anticipated, the fluorescence quantum yields of this model remained practically constant in the presence and absence of water (Table 1). Accordingly, water molecules were absent in the X-ray structure of (S)-BPOHMe (Figure 4B). In the case of the dyads, the acidity of the phenolic group is not enhanced as in (S)-BPOH, because the carboxy group is employed in the construction of the amide linker and is not available for coordination with water. In fact, no water molecules were found in the crystalline samples.

The fluorescence lifetimes were determined by the time-correlated single photon counting (TCSPC) technique (Figure 5). In dry acetonitrile, τ_{F} of (S)-BPOH was found to be 1.67 ns, while τ_{F} values of 0.95 and 0.46 ns were measured for (S,S)-1 and (S,R)-1, respectively (Table 1). This indicates that most of the overall quenching observed in the steady-state experiments is indeed dynamic, as expected for a charge transfer process (compare the two sets of values in Table 1). In the presence of water, a decrease of the (S)-BPOH fluorescence lifetime was noticed, confirming again a dynamic quenching, in agreement with an enhanced participation of the ESIPT route. As discussed above, this deactivation channel does not operate in the dyads, where the carboxylate function is involved in formation of the amide bond.

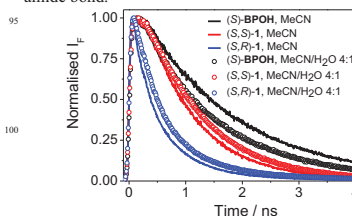


Figure 5. Kinetic decay traces ($\lambda_{\text{exc}} = 267$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm, $A_{267} = 0.2$) for (S)-BPOH (black), (S,S)-1 (red) and (S,R)-1 (blue) under air, in MeCN (solid line) and MeCN/H₂O 4:1 (open circles).

The quenching rate constants (k_{Q}), determined from the fluorescence lifetimes τ_{F} , were in the range 10^8 - 10^9 s⁻¹; as regards the radiative rate constants k_{F} , they were obtained from the values of τ_{F} and ϕ_{F} and found to be in the order of 10^8 s⁻¹ (Table 1).

In order to get insight into the geometrical arrangement of the two chromophores in the dyads, which is closely related with the fluorescence quenching by charge transfer, simple molecular modelling (PM3) was performed with both (S,S)-1 and (S,R)-1 (see Figure 6).

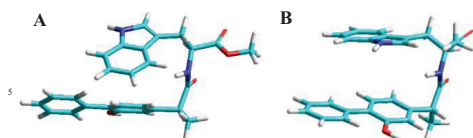


Figure 6. Geometry optimized (HyperChem Release 8.0.3 for Windows Molecular Model System, PM3) structure for (S,S)-1 (A) and (S,R)-1 (B).

Thus, (S,R)-1 (Figure 6B) presented a more favourable geometric arrangement of the two interacting chromophores compared to the (S,S)-dyad (Figure 6A), whose geometry is more distorted, with the indole chromophore nearly orthogonal to the biphenyl moiety, which makes more difficult the interchromophoric interaction. This is in good agreement with the steady-state and time-resolved observations of lower ϕ_F and shorter τ_F values for the (S,R)-diastereomer.

Conclusions

The (S)-BPOH chromophore dominates the fluorescence spectra of diastereomeric dyads (S,S)-1 and (S,R)-1 in acetonitrile, which reveal a substantial intramolecular charge transfer quenching with remarkable stereodifferentiation. In the presence of water (20%), the fluorescence quantum yield of (S)-BPOH decreases; by contrast, only minor changes are observed for (S,S)-1 and (S,R)-1. Being (S)-BPOH a phenol, this is attributed to a water-assisted enhancement of its excited state acidity, a hypothesis that is supported by the presence of water molecules linking the carboxy and hydroxy groups in the crystalline structure. This effect is prevented in the dyads, whose fluorescence quantum yields do not depend on the presence or absence of water. The dynamic nature of the observed quenching is evidenced by a configuration-dependent shortening of the fluorescence lifetimes in (S,S)-1 and (S,R)-1 compared to (S)-BPOH. In agreement with the steady-state and time-resolved experimental results, molecular modelling points to a more favourable geometric arrangement of the two interacting chromophores in (S,R)-1 than in (S,S)-1; this is validated by the X-ray analysis, indicating that the former dyad exhibits a folded conformation in the solid state.

Materials and Methods

Commercial (S)-FBP, (S)- and (R)-TrpMe, 1-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and 1-hydroxybenzotriazole (BtOH) were purchased from Sigma-Aldrich. Their purity was checked by ^1H NMR and HPLC analysis. Spectrophotometric, HPLC or reagent grade solvents were obtained from Scharlab and used without further purification. Solutions of phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.4) were prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets (from Sigma) in Milli-Q water. The ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively, using a Varian Gemini instrument; chemical shifts are reported in ppm. Exact mass values were obtained in Servicio de Espectroscopia de Masas de la Universidad de Valencia. The X-ray structures were determined at Unidade de Raios X, at the Universidade de Santiago de Compostela. Crystallographic data

(excluding structure factors) for the structures of (S)-BPOH, (S)-BPOHMe and (S,R)-1 have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication numbers CCDC 662956, CCDC 910283 and CCDC 910284, respectively. Isolation and purification were done by conventional column chromatography on silica gel Merck 60 (0.063-0.200 mm), or by preparative layer chromatography on silica gel Merck 60 PF254, using hexane/ethyl acetate as eluent.

Synthesis of the new compounds

(S)-BPOH. A solution of (S)-FBP (100 mL, 5 mM) in PBS was irradiated for 9 h through quartz, inside a Luzchem multilamp photoreactor, with the light from ten 8W lamps emitting mainly at 254 nm. The photomixture was acidified with HCl, extracted with methylene chloride and dried over MgSO_4 . The organic phase was evaporated *in vacuo* and purified by preparative layer chromatography, using hexane/ethyl acetate 40/60 (v/v) as eluent, affording (S)-BPOH as white powder (60 % yield).

(S)-BPOHMe. A solution of (S)-BPOH (59 mg, 0.23 mmol) and SOCl_2 (2.4 mL) in MeOH (10 mL) was maintained under reflux for 2 h. The crude was rotavaporated, dissolved in methylene chloride and washed consecutively with saturated NaHCO_3 , 1 M HCl and brine, then dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated *in vacuo*. Purification was done by preparative layer chromatography (hexane/ethyl acetate 70/30, v/v), affording (S)-BPOHMe as a white powder in nearly quantitative yield.

Dyads (S,S)-1 and (S,R)-1. To a solution of (S)-BPOH (56 mg, 0.23 mmol) in acetonitrile (20 mL), 0.23 mmol of EDC and 0.23 mmol of BtOH in acetonitrile were added. The mixture was maintained under stirring, and then 0.23 mmol of (S)- or (R)-TrpMe in 2 mL of acetonitrile were added. After 3 h, the solvent was evaporated; the crude was dissolved in methylene chloride and washed consecutively with diluted NaHCO_3 , 1 M HCl, and brine, then dried over MgSO_4 . Final purification was performed by preparative layer chromatography (methylene chloride/ethyl acetate, 60/40, v/v), followed by recrystallization. The yields were 50 % and 47 % for (S,S)-1 and (S,R)-1, respectively.

Characterisation of the new compounds

All new compounds were characterised by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, as well as by high resolution mass spectrometry (HRMS). Their purity was confirmed by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). A summary of the most relevant data follows.

Methyl (S)-2-(2-hydroxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoate

^1H -NMR (CDCl_3) (δ , ppm) 1.53 (d, 3H, $J = 8.0$ Hz), 3.70 (s, 3H), 3.73 (q, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.19 (s, 1H), 6.92-6.94 (m, 1H), 7.18-7.21 (m, 1H), 7.37-7.51 (m, 6H). ^{13}C -NMR (CDCl_3) (δ , ppm) 18.5, 45.2, 52.1, 114.9, 119.4, 127.0, 127.9, 129.0, 129.3, 130.8, 136.8, 141.8, 152.5, 174.7. Exact Mass (ESI) [MH^+] Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3$: 257.1172; Found: 257.1181.

N-[2-(S)-2-(2-Hydroxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-L-tryptophan methyl ester.

^1H -NMR (CDCl_3) (δ , ppm) 1.46 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.13-3.26 (m, 2H), 3.45 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz), 3.64 (s, 3H), 4.90 (m, 1H), 6.05 (d,

1H, $J = 8.0$ Hz), 6.28 (s, 1H), 6.50 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.80 (m, 2H), 7.01-7.23 (m, 4H), 7.36-7.53 (m, 10H), 8.11 (bs, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 18.3, 27.5, 46.8, 52.6, 52.8, 109.5, 111.4, 115.1, 118.6, 119.7, 120.2, 122.2, 123.2, 127.5, 127.9, 129.0, 129.2, 130.9, 136.1, 137.5, 142.2, 153.3, 172.5, 173.9. Exact Mass (EI) [M⁺] Calcd. for C₂₇H₂₆N₂O₄: 442.1893; Found: 442.1897.

***N*-[2-(*S*)-(2-Hydroxy-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-(*S*)-tryptophan methyl ester.**

¹H-NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 1.47 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 3.19-3.32 (m, 2H), 3.47 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.61 (s, 3H), 4.85 (m, 1H), 6.05 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.12 (s, 1H), 6.73-6.79 (m, 3H), 7.05-7.47 (m, 9H), 8.13 (bs, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃) (δ , ppm) 18.1, 27.4, 46.7, 52.4, 52.9, 109.9, 111.2, 115.1, 118.6, 119.7, 120.0, 122.2, 122.3, 127.2, 127.6, 127.7, 129.1, 130.7, 136.0, 137.1, 141.7, 152.9, 172.3, 173.3. Exact Mass (EI) [M⁺] Calcd. for C₂₇H₂₆N₂O₄: 442.1893; Found: 442.1891.

Fluorescence measurements

Emission spectra were recorded on a spectrofluorometer system which was provided with a monochromator in the wavelength range of 200-900 nm. The solutions were placed into 10 mm \times 10 mm quartz cells. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.2. Steady state experiments were performed at 22 °C. For the fluorescence quantum yield determination, Trp in water/air was used as a reference, with $\phi_F = 0.13$.¹⁷

Time-resolved fluorescence measurements were performed using the time-correlated single photon counting (TCSPC) technique. The excitation source was the third harmonic (267 nm) of a mode-locked Ti:Sapphire laser, delivering 100-fs pulses with a repetition rate of 4.75 MHz. A Schott WG 295 filter was placed in front of a SPEX monochromator. The detector was a microchannel plate (R1564 U Hamamatsu) providing an instrumental response function of 60 ps (fwhm). The average laser power (0.1 mW) was measured with a Melles Griot broadband powermeter. Solutions were contained in a 10 mm \times 10 mm quartz cell and continuously stirred. Successive recordings with the same sample gave identical decays which were eventually merged to improve the signal-to-noise ratio. Such a procedure allowed us to ensure that the measured signals were not altered during the measurements due to a possible accumulation of photoproducts.

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Government (CTQ2010-14882, BES-2008-003314, JCI-2010-06204, PR2011-0581), from the Generalitat Valenciana (Prometeo 2008/090) and from the Universitat Politècnica de València (PAID 05-11, 2766) is gratefully acknowledged.

Notes and references

⁵⁰ ^a Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain. E-mail: mcjimene@qim.upv.es; mmiranda@qim.upv.es

^b CNRS, IRAMIS, SPAM, Francis Perrin Laboratory, URA 2453, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

- a) M. C. Jiménez, U. Pischel and M. A. Miranda, *J. Photochem. Photobiol. C*, 2007, **8**, 128-142; b) S. Abad, U. Pischel and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 2711-2717; c) S. Abad, I. Vayá, M. C. Jiménez, U. Pischel and M. A. Miranda, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 2175-2183.
- a) P. Bonancia, I. Vayá, M. J. Climent, T. Gustavsson, D. Markovitsi, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 8807-8814; b) C. Paris, S. Encinas, N. Belmadoui, M. J. Climent and M. A. Miranda, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 4409-4412; c) N. Belmadoui, S. Encinas, M. J. Climent, S. Gil and M. A. Miranda, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 553-561; d) V. Lhiaubet-Vallet, P. Boscá and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 423-431.
- I. Vayá, R. Pérez-Ruiz, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *Chem. Phys. Lett.*, 2010, **486**, 147-153.
- J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition; Plenum Press: New York, 2006.
- a) N. Seedher and S. Bhatia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **39**, 257-262; b) N. Seedher and S. Bhatia, *Pharmacol. Res.*, 2006, **54**, 77-84; c) R. K. Nanda, N. Sarkar and R. Banerjee, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2007, **192**, 152-158; d) B. Zhou, R. Li, Y. Zhang and Y. Liu, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 453-459; e) H. Vahedian-Movahed, M. R. Saberi and J. Chamani, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2011, **28**, 483-502; f) U. Katrahalli, V. K. A. Kalabandi and S. Jaldappagari, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **59**, 102-108; g) M. El-Kemary, M. Gil and A. Douhal, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 2896-2902; h) L. Tormo, J. A. Organero, B. Cohen, C. Martin, L. Santos and A. Douhal, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 13641-13647; i) S. Tardioli, I. Lammers, J. H. Hooijschuur, F. Ariese, G. van der Zwan and C. Gooijer, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 7033-7039.
- I. Vayá, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 9363-9371.
- a) P. R. Callis and B. K. Burgess, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 9429-9432; b) J. R. Lakowicz, *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 421-437; c) B. Schuler and W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2008, **18**, 16-26; d) X. H. Shen and J. R. Knutson, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 6260-6265.
- a) J. M. Beechem and L. Brand, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 43-71; b) P. R. Callis, *Methods Enzymol.*, 1997, **278**, 113-150.
- a) T. Peters, *All About Albumins: Biochemistry Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1995; b) D. C. Carter, J. X. Ho, in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 45, Academic Press, New York, 1994, pp. 152-203.
- a) N. Basaric and P. Wan, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 2677-2686; b) M. Lukeman and P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1164-1165.
- a) J. Keck, H. E. A. Kramer, H. Port, T. Hirsch, P. Fischer and G. Rytz, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 14468-14475; b) F. Vollmer and W. Rettig, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1996, **95**, 143-155.
- M. Lukeman and P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9458-9464.
- M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos and I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 1038-1041.
- A. Weller, *Z. Phys. Chem.*, 1982, **133**, 93-98.
- a) E_{OX} (2-phenylphenol) = 0.831 V, taken from: P. Winget, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, 2004, **112**, 217; b) E_{RED} (Trp) = -1.55 V, taken from: S. Cakir and E. Bicer, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2010, **55**, 236; c) E_{OX} (indole) = 1.015 V, E_{RED} (biphenyl) = -2.55 V, taken from: S. L. Murov, I. Carmichael, and G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, 1993, 8.
- Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.
- M. Montali, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton FL, 2006.

**Intraprotein formation of a long wavelength absorbing
complex and inhibition of excited state deprotonation in a
chiral hydroxybiphenyl**

Paula Bonancía, Ignacio Vayá, M. Consuelo Jiménez, Miguel A. Miranda**

† Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat
Politécnica de València, 46022 Valencia, Spain. Phone +34963877344, fax
+34963879349

CORRESPONDING AUTHORS EMAIL ADDRESS: mmiranda@qim.upv.es.
mcjimene@qim.upv.es

Keywords: Fluorescence, laser flash photolysis, photoacid, singlet excited state,
sterodifferentiation, transient absorption spectroscopy

Abstract

The two enantiomers of 2-(2-hydroxybiphenyl-4-yl)propanoic acid ((*S*)- and (*R*)-**BPOH**) have been selected as probes for human serum albumin (HSA). Photophysical characterization in the absence of protein led to emission maxima, singlet energies, quantum yields and fluorescence lifetimes values of 91 kcal mol⁻¹, 332 nm, 0.28 and 1.8 ns for **BPOH** or 414 nm, 79 kcal mol⁻¹, 0.31 and 3.3 ns for the corresponding phenolate **BPO⁻**; the pK_a^{*} was found to be 1.17. In the presence of HSA, a light absorbing ground state complex (*S*)-**BPOH@HSA** was detected (maximum at *ca.* 300 nm), whose intensity increased with increasing protein concentration. The fluorescence spectra of (*S*)-**BPOH** in PBS, after addition of HSA, revealed a progressive diminution of the phenolate band, indicating that excited state deprotonation is disfavored within the hydrophobic protein cavities. A similar trend was observed for (*R*)-**BPOH**, but the extent of deprotonation was significantly lower for this enantiomer. Addition of increasing amounts of the site II displacement probe (*S*)-ibuprofen ((*S*)-**IBP**) to **BPOH@HSA** led to a significant decrease of the absorption maximum at *ca.* 300 nm and to a recovery of the phenolate emission band at *ca.* 410 nm, which were again configuration-dependent. The transient absorption spectrum of (*S*)-**BPOH** consisted on a broad band centered at 380 nm, attributed to the first triplet excited state. A dramatic enhancement of the triplet lifetimes within HSA was observed (19.0 μs within protein *vs.* 1.3 μs in bulk PBS), although no stereodifferentiation was noticed in this case.

Introduction

Transport proteins are responsible for carrying endogenous and exogenous agents in the bloodstream, for their delivery to specific targets. In particular, human serum albumin (HSA) is the most abundant transport protein in human blood and plasma, where it reaches concentrations of *ca.* 0.6 mM.^{1,2} The three-dimensional structure of HSA has been determined crystallographically to a resolution of 2.8 Å. It is composed of 585 amino acids and comprises three homologous domains that assemble to form a heart-shaped molecule; each domain includes two subdomains that possess common structural motifs. The principal regions of ligand binding are located in hydrophobic cavities of subdomains IIA and IIIA (called by Sudlow sites I and II, respectively).³⁻⁵ A large number of agents can be transported by HSA, including fatty acids and pharmaceutical drugs;⁶ therefore, binding to HSA constitutes a key process, which is relevant for the modulation of a number of phenomena, such as drug solubility in plasma, toxicity, susceptibility to oxidation, *in vivo* half-life, etc.

The binding sites of serum albumins provide an exceptional milieu, which can modify the physicochemical properties of the bound ligand. For example, the photophysics and photochemistry of some drugs,⁷ dyes (rose bengal, methylene blue),⁸ anthracene carboxylates^{9,10} or acetates,¹¹ naphthyl esters,¹² or diphenylamines¹³ are strongly influenced by this medium.

In this context, the intrinsic photophysical properties of an encapsulated ligand can be employed to obtain relevant information on the intraprotein microenvironment. Thus, from the quantum yields and lifetimes of the singlet or triplet excited states of a bound ligand, it is possible to determine key issues, such as the stoichiometry of the complex, the binding constant or the extent of site occupation.¹⁴

For investigation of the specific characteristics of the protein binding sites, the proper choice of an appropriate ligand is essential. In this work, we have selected 2-(2-hydroxybiphenyl-4-yl)propanoic acid (**BPOH**, Chart 1) as probe, based on diverse structural and physicochemical considerations. Thus, **BPOH** is the main photoproduct of the non-steroidal antiinflammatory drug flurbiprofen (**FBP**) in aqueous medium and is structurally related to the main **FBP** metabolite, 2-(2-fluoro-4'-hydroxy-4-biphenyl)propanoic acid.¹⁵ It contains a biphenyl nucleus as active chromophore (that should generate short-lived species detectable by fluorescence or transient absorption spectroscopy). The presence of a hydroxy substituent results in a bathochromic shift of the absorption spectrum (which extends beyond 300 nm), with possible photobiological implications. Moreover, being a phenol, **BPOH** is expected to display a stronger acid character in the first singlet excited state (S_1) than in the ground state ($pK_a^* > pK_a$),¹⁶ a useful property that can be employed to gather information on the nature of the microenvironment experienced by **BPOH** within the HSA binding sites. Finally, due to the presence of a chiral center, stereodifferentiation in the protein binding process is possible.

In this work, UV-absorption spectroscopy, as well as steady-state and time-resolved fluorescence combined with laser flash photolysis, have been applied to the study of **BPOH** in the absence and in the presence of HSA. The results provide clear evidence for intraprotein formation of a long wavelength absorbing complex and for inhibition of excited state deprotonation.

Insert Chart 1

Experimental Section

Materials and Solvents. (*S*)- and (*R*)-**FBP**, HSA and (*S*)-**IBP** were commercially available. Their purity was checked by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Spectroscopic and HPLC-grade solvents were used without further purification. Solutions of phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH = 7.4) were prepared by dissolving the commercial tablets in deionized water. The ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra were recorded in CDCl_3 as solvent at 300 and 75 MHz, respectively, using a Varian Gemini instrument; chemical shifts are reported in ppm. Isolation and purification were done by conventional column chromatography on silica gel Merck 60 (0.063-0.200 mm), or by preparative layer chromatography on silica gel Merck 60 PF254, using hexane/ethyl acetate as eluents.

Synthesis of (*S*)- and (*R*)-BPOH**.**¹⁷ A solution of (*S*)- or (*R*)-**FBP** (5 mM) in PBS was irradiated for 9 h through quartz, inside a Luzchem multilamp photoreactor, with the light from ten 8 W lamps emitting mainly at 254 nm. The photomixture was acidified with HCl, extracted with methylene chloride, and dried over MgSO_4 . The organic layer was evaporated *in vacuo* and purified by preparative chromatography, using hexane/ethyl acetate, 40/60 (v/v), as eluent, affording (*S*)- or (*R*)-**BPOH** as white powder (60 % yield).

Fluorescence experiments. Emission spectra were recorded on a JASCO FP-8500 spectrofluorometer system, provided with a monochromator in the wavelength range of 200-850 nm. Time-resolved measurements were performed with a TimeMaster fluorescence lifetime spectrometer TM-2/2003 from PTI by means of the stroboscopic technique, which is a variation of the boxcar technique. A hydrogen/nitrogen flashlamp was used as excitation source. The solutions were placed into 10 mm \times 10 mm quartz

cells. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.2. Experiments were performed at 22 °C.

Laser flash photolysis experiments. The solutions of (*S*)- or (*R*)-**BPOH** and HSA at different molar ratios ($A_{308} = 0.2$) were placed in a quartz cuvette and submitted to laser flash photolysis. In general, samples received between 5 and 10 pulses for all of the kinetic experiments. This light dose did not result in any detectable decomposition of the sample, as revealed by UV-Vis absorption measurements prior to and after photolysis. Experiments were carried out with a pulsed XeCl excimer laser ($\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, ~17 ns pulse width, <100 mJ per pulse). A pulsed Lo255 Oriel xenon lamp was used as a detecting light source. The observation wavelength was selected with a 77200 Oriel monochromator, and the signal was amplified by an Oriel photomultiplier tube (PMT) system made up of a 77348 side-on tube, 70680 housing, and a 70705 power supply. The signal was registered with a TDS-640A Tektronix oscilloscope and subsequently transferred to a personal computer. All experiments were done in 10×10 mm² quartz cells with 4 mL capacity.

Phosphorescence measurements. Emission spectra were recorded on a spectrofluorometer system, which was provided with a monochromator in the wavelength range of 200-900 nm. The solutions were placed into a quartz tube and introduced into liquid nitrogen prior the measurements. The absorbance of the samples was 0.3 at the excitation wavelength (308 nm).

Results and discussion

Photophysical behavior of (*S*)-BPOH in the absence of protein. The UV absorption spectrum of (*S*)-**BPOH** in acetonitrile (5.5×10^{-5} M) is shown in Figure 1A, together with that of (*S*)-**FBP** for comparison. As expected, replacement of the **FBP**

fluorine by hydroxyl induces changes on the spectral properties of the chromophore; thus, the most salient feature in the (*S*)-**BPOH** spectrum is the presence of a well-defined band at relatively long wavelengths, which extends beyond 300 nm. The same trend was observed in phosphate buffered media (PBS 0.01 M, pH = 7.4). By contrast, the spectrum was clearly different in basic medium (0.1 M NaOH), which displayed a bathochromic shift, as expected for the corresponding phenolate (*S*)-**BPO**⁻.

Insert Figure 1

The excitation and emission spectra of (*S*)-**BPOH** are shown in Figure 1B, whereas selected photophysical parameters are presented in Table 1. In acetonitrile, the fluorescence spectrum consisted basically in a band centered at *ca.* 330 nm. The quantum yield (ϕ_F) was found to be 0.28, using carprofen in MeCN/N₂ as standard ($\phi_F = 0.05$).¹⁸ A singlet energy value (E_S) of 91 kcal mol⁻¹ was obtained from the intersection between the excitation ($\lambda_{em} = 330$ nm) and emission ($\lambda_{exc} = 308$ nm) normalized bands. By contrast, the fluorescence spectrum in NaOH displayed a broad band centered at *ca.* 410 nm, corresponding to ¹((*S*)-**BPO**⁻)*. The ϕ_F and E_S values for this species were found to be 0.31 and 79 kcal mol⁻¹, respectively. An intermediate behavior was observed in PBS, where the emission displayed two maxima, peaking at $\lambda = 343$ and 412 nm, attributed to ¹((*S*)-**BPOH**)* and ¹((*S*)-**BPO**⁻)*, respectively. Besides, the coincidence of excitation spectra corresponding to both emission maxima in neutral aqueous medium indicates that (*S*)-**BPOH** is a photoacid, so under these conditions deprotonation is a singlet excited state reaction. The pK_a* value was estimated according to a Förster cycle,¹⁹ using equation 1, where pK_a corresponds to the ground state,²⁰ and $E_{S(OH)}$ and $E_{S(O^-)}$ are the singlet energies of phenol and phenolate (see above).

$$pK_a^* = pK_a - \frac{E_{s(OH)} - E_{s(O^-)}}{2.303RT} \quad \text{equation (1)}$$

With these data, the pK_a^* value was found to be 1.17, indicating a clearly stronger acidity of (*S*)-**BPOH** in the first singlet excited state than in the ground state. This is in good agreement with the reported value of $pK_a^* = 1.15$ for the closely related compound 2-hydroxybiphenyl.²¹

The fluorescence lifetimes (τ_F) at the emission maxima are given in Table 1. When comparing MeCN with PBS, the τ_F of the free phenol dropped dramatically in the latter medium (from 1.8 ns to less than 1 ns), indicating a strong dynamic quenching. By contrast, a τ_F value of 3.3 ns was obtained for the phenolate at $\lambda_{em} = 412$ nm, both in PBS and in alkaline solution.

Insert Table 1

The transient absorption spectrum of (*S*)-**BPOH** obtained upon laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 308$ nm, MeCN/N₂), consisted on a broad band centered at 380 nm, which was attributed to the first triplet excited state, by comparison with literature data for 2-hydroxybiphenyl.²² It is shown in Figure 2A, together with the decay trace monitored at $\lambda_{em} = 380$ nm (Inset Figure 2A). The spectrum was similar in PBS, although ³(*S*)-**BPOH*** was markedly longer lived ($\tau_T = 13$ μ s in PBS vs. 2 μ s in MeCN).

Insert Figure 2

As expected, ³(*S*)-**BPOH*** was quenched by O₂ ($k_Q = 2.2 \times 10^9$ M⁻¹ s⁻¹ in PBS). Additional information on the triplet excited state was obtained by recording the phosphorescence spectrum of (*S*)-**BPOH** in ethanol matrix at 78 K (Figure 2B). With

this data, the $^3(S)\text{-BPOH}^*$ energy was determined as 65 kcal mol^{-1} , quite comparable with that of **FBP**.

Studies on (*S*)- and (*R*)-BPOH/HSA systems

After characterization of the photophysical properties of (*S*)-**BPOH** in organic and aqueous media, the studies were extended to (*S*)-**BPOH** and (*R*)-**BPOH** in the presence of HSA. The availability of the two enantiomers allowed us to look for a possible stereodifferentiation in the photophysical behavior of the ligand after encapsulation within the protein binding sites. The solutions were prepared in air-equilibrated PBS, to avoid foam formation associated with nitrogen bubbling.

Figure 3A shows the absorption spectra of equimolar (*S*)-**BPOH**/HSA mixtures (10^{-4} M in PBS), together with those of the separated components. For comparison, a theoretical curve obtained by addition of the traces corresponding to (*S*)-**BPOH** and HSA is also represented. The mismatch between the experimental and theoretical results clearly reveals formation of a light absorbing ground state complex in the region 290-330 nm. For its characterization, a series of (*S*)-**BPOH**/HSA solutions at different molar ratios were prepared. The spectral curves obtained by subtraction of isolated (*S*)-**BPOH** and HSA from the corresponding mixtures are shown in Figure 3B. Operating in this way, clear absorption maxima emerged at *ca.* 300 nm, whose intensity increased with increasing protein concentration; they were ascribed to the (*S*)-**BPOH**@HSA complex.

Insert Figure 3

The fluorescence spectra of 10^{-4} M (*S*)-**BPOH** in PBS, after addition of increasing amounts of HSA, are shown in Figure 4A. The most remarkable observation was the progressive diminution of the phenolate band inside the protein, indicating that excited state deprotonation is disfavored within the hydrophobic HSA cavities. A similar trend

was observed for (*R*)-**BPOH**; however, it was interesting to realize that the extent of deprotonation was significantly lower for this enantiomer under identical conditions (Figure 4B).

Insert Figure 4

In order to obtain additional experimental evidence supporting formation of a light-absorbing ground state complex, the UV-spectral changes of 1:1.4 **BPOH**/HSA mixtures were monitored upon addition of a displacement probe. Taking into account that the parent drug **FBP** binds mainly to site II of HSA and that the presence of an additional hydroxy group in **BPOH** should even enhance this preference, (*S*)-ibuprofen ((*S*)-**IBP**) was selected as displacement probe.⁴ In the presence of (*S*)-**IBP**, a lower contribution of the complexed **BPOH** form should be found, concomitantly with the presence of more **BPOH** in the bulk solution. In the UV-spectra, this would result in a diminished intensity of the long-wavelength absorption band. As a matter of fact, when the differential spectra of the samples were obtained (Figure 5A), the maximum at *ca.* 300 nm exhibited a significant decrease with increasing concentrations of (*S*)-**IBP**, which was configuration-dependent (inset of Figure 5A). In parallel, the fluorescence changes were recorded for the same samples, revealing that displacement of **BPOH** by (*S*)-**IBP** from the protein microenvironment to the solution, where deprotonation is enhanced, leads to a recovery of the phenolate emission band (Figure 5B). Again, a significant stereodifferentiation was observed for this process (inset of Figure 5B).

Insert Figure 5

Finally, the emission decays at 330 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm) in the presence of HSA, occurred within less than 1 ns. By contrast, the kinetics of triplet decay obtained by laser flash photolysis revealed a dramatic enhancement of the τ_T values within HSA

(19.0 μ s in protein vs. 1.3 μ s in bulk PBS, under air), although no stereodifferentiation was observed in this case.

Conclusions

Photophysical studies including UV-absorption spectroscopy, steady-state and time-resolved fluorescence, as well as laser flash photolysis, have been applied to the study of the two enantiomers of **BPOH** in the absence and in the presence of HSA. Intraprotein formation of a long wavelength absorbing complex **BPOH@HSA** is associated with the appearance of a new absorption band at *ca.* 300 nm, whose intensity increases with increasing protein concentration and decreases upon addition of (*S*)-**IBP**, a site II displacement probe. Fluorescence measurements provide clear evidence for inhibition of excited state deprotonation within the hydrophobic protein binding sites, as revealed by the marked diminution of the phenolate band (at λ_{em} *ca.* 410 nm) in the presence of HSA. A significant stereodifferentiation is observed both in formation of the ground state complex and in excited state deprotonation.

Acknowledgments

Financial support from the Spanish Government (CTQ2010-14882, CTQ2009-13699, BES-2008-003314, JCI-2010-06204), from the Generalitat Valenciana (Prometeo 2008/090) and from the Universitat Politècnica de València (PAID 05-11, 2766) is gratefully acknowledged.

References

- (1) Peters, T. *All About Albumins: Biochemistry Genetics and Medical Applications*; Academic Press: San Diego, 1995.

- (2) Carter, D. C.; Ho, J. X. in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 45; Academic Press: New York, 1994, pp. 152-203.
- (3) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824-832.
- (4) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052-1061.
- (5) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209-215.
- (6) Krag-Hansen, U. *Dan. Med. Bull.* **1990**, *37*, 57-84.
- (7) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538-9539.
- (8) Alarcón, E.; Edwards, A. M.; Aspee, A.; Moran, F. E.; Borsarelli, C. D.; Lissi, E. A.; González-Nilo, D.; Poblete, H.; Scaiano, J. C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 93-102.
- (9) Nishijima, M.; Wada, T.; Mori, T.; Pace, T. C. S.; Bohne, C.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3478-3479.
- (10) Wada, T.; Nishijima, M.; Fujisawa, T.; Sugahara, N.; Mori, T.; Nakamura, A.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7492-7493.
- (11) Alonso, M.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3860-3863.
- (12) Marin, M.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2910-2915.
- (13) Marin, M.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1788-1791.
- (14) Alonso, R.; Yamaji, M.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11363-11369.
- (15) Adams, W. J.; Bothwell, B. E.; Bothwell, W. M.; VanGiessen, G. J.; Kaiser D. G. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1504-1509.
- (16) Bartok, W. P.; Lucchesi, J.; Snider, N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1842-1844.

- (17) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038-1041.
- (18) Asíns-Fabra, B.; Andreu, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, *207*, 52-57.
- (19) Förster Th., *Z. Electrochem.* **1950**, *54*, 531-553.
- (20) The pK_a of 2-hydroxybiphenyl has been employed for the calculations. It was taken from: Bridges, J. W.; Creaven, P. J.; Williams R. T. *Biochem. J.* **1965**, *96*, 872-878.
- (21) Lukeman, M.; Wan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9458-9464.
- (22) Mohana, H.; Bredeb, O.; Mittal, J. P. *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, *140*, 191-197.

Chart 1. Chemical structure of **BPOH**.

Table 1. Relevant photophysical parameters for (*S*)-**BPOH** in acetonitrile and PBS at $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$.^a

Figure 1. A: UV absorption spectra of (*S*)-**BPOH** in MeCN (black), 0.01 M PBS (blue) and 0.1 M NaOH (red), together with that of (*S*)-**FBP** in MeCN (green) at $5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ concentration. **B:** Normalized emission (solid lines, $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$) and excitation spectra (dotted lines, λ_{em} at the corresponding maxima) of (*S*)-**BPOH** in MeCN (black), PBS (blue), and NaOH (red), under N_2 .

Figure 2. A: Transient absorption spectrum 0.9 μs after the laser pulse of (*S*)-**BPOH** ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) in deaerated MeCN solution ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$). Inset: Normalized decay traces monitored at 380 nm in MeCN (black) and PBS (blue). **B:** Phosphorescence spectrum in ethanol matrix.

Figure 3. A: UV absorption spectra (in PBS), of (*S*)-**BPOH** (black), HSA (blue), and an equimolar (*S*)-**BPOH**/HSA mixture (green), together with a simulated curve obtained as (*S*)-**BPOH** + HSA (red). The concentration of each component was 10^{-4} M . **B:** Curves obtained as (*S*)-**BPOH**/HSA – (*S*)-**BPOH** – HSA at different (*S*)-**BPOH**/HSA molar ratios: black: 1:0.2, red: 1:0.4, green: 1:0.6, blue: 1:0.8, magenta: 1:1.

Figure 4. A: Fluorescence spectra (normalized at the short-wavelength maximum) of (*S*)-**BPOH** in PBS ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$, air, 10^{-4} M) after addition of increasing amounts of HSA. The (*S*)-**BPOH**/HSA molar ratios are 1:0 (black), 1:0.2 (red), 1:0.4 (blue), 1:0.6 (green), 1:0.8 (magenta) and 1:2 (brown). **B:** Plot of the fluorescence intensity at 409 nm vs. HSA/**BPOH** molar ratio for (*S*)-**BPOH** (black) and (*R*)-**BPOH** (red).

Figure 5. A: Differential UV absorption curves of the ground state complex obtained as (*S*)-**BPOH**/HSA – (*S*)-**BPOH** – HSA – (*S*)-**IBP** in the presence of increasing amounts of (*S*)-**IBP**. Molar ratios (*S*)-**BPOH**/HSA/(*S*)-**IBP**: blue 1:1.4:1, green 1:1.4:0.5, red: 1:1.4:0.2, black: 1:1.4:0. Inset: Plot of the absorbance at 302 nm vs (*S*)-**IBP** concentration for (*S*)-**BPOH**/HSA (black) and (*R*)-**BPOH**/HSA (red). **B:** Normalized fluorescence spectra of (*S*)-**BPOH**/HSA systems after addition of increasing amounts of (*S*)-**IBP**. Inset: Plot of the fluorescence intensity at 405 nm vs **IBP** concentration for (*S*)-**BPOH**/HSA (black) and (*R*)-**BPOH**/HSA (red). For parts A and B, [**BPOH**] was 10^{-4} M and **BPOH**/HSA molar ratio was 1:1.4 in all cases.

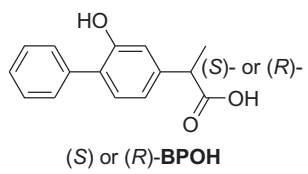


Chart 1

Solvent	ϕ_F	λ_{em} (nm)	E_S (kcal mol ⁻¹) ^b	τ_F (ns) ^b	τ_T (μ s) ^b
MeCN	0.28	332	91	1.8	2
PBS	0.10	343/412	90/84	<1/3.3	13
NaOH	0.31	414	79	3.3	nd ^c

^aAll experiments were performed under N₂. ^bDetermined for the corresponding emission band(s). ^cNot determined.

Table 1

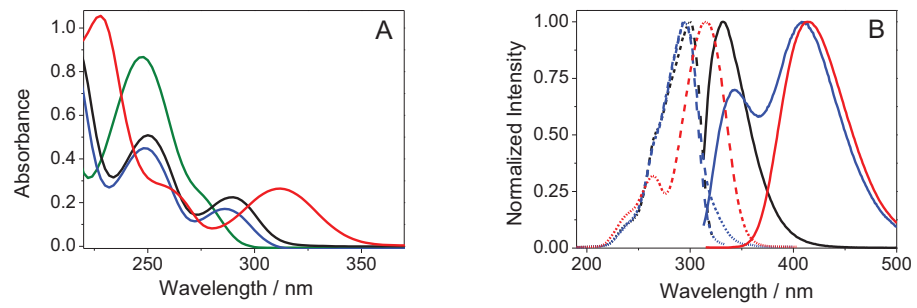


Figure 1

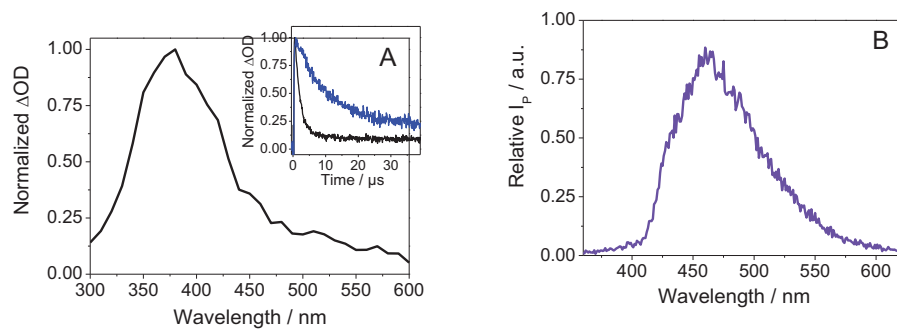


Figure 2

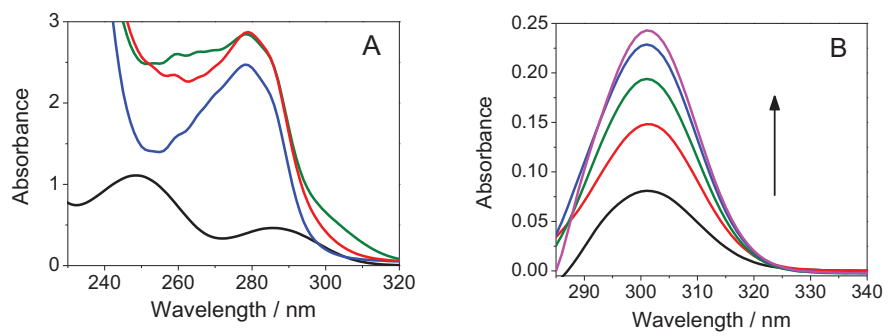


Figure 3

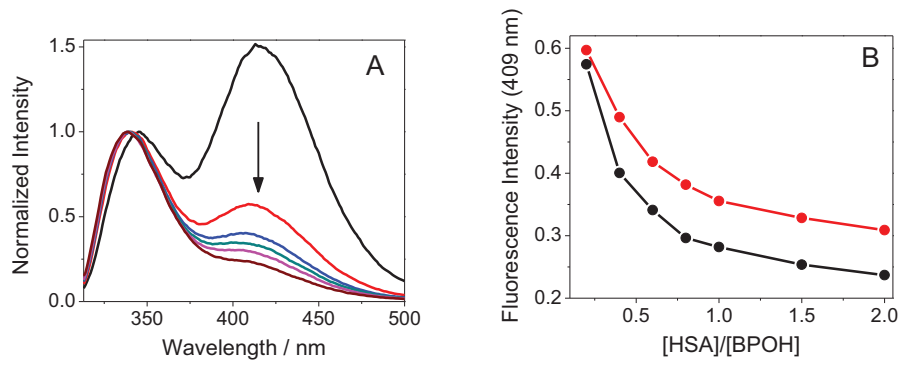


Figure 4

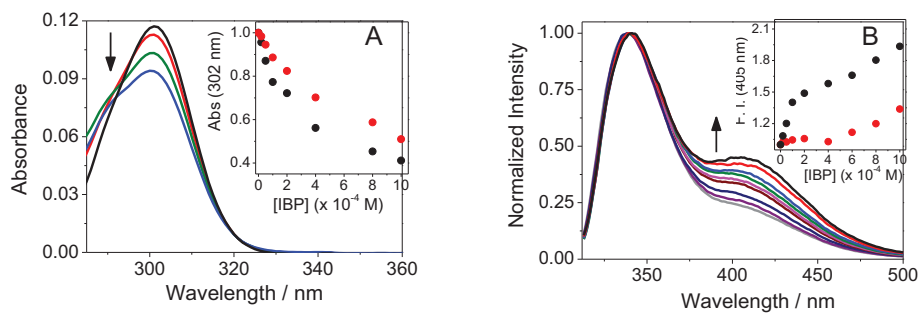


Figure 5

Table of Contents

