

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC)



Fotoquímica de compuestos heteroaromáticos tricíclicos en medios biomiméticos

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Daniel Limones Herrero

Dirigida por:

Prof. M. Consuelo Jiménez Molero

Prof. Miguel A. Miranda Alonso

Valencia, diciembre 2015

Dña. M^a Consuelo Jiménez Molero, Catedrática de Química Orgánica de la Universitat Politècnica de València y D. Miguel Ángel Miranda Alonso, Catedrático de Química Orgánica de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Fotoquímica de compuestos heteroaromáticos tricíclicos en medios biomiméticos”** ha sido desarrollada por Daniel Limones Herrero, bajo su dirección, en el Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València.

Dña. M^a Consuelo Jiménez Molero

D. Miguel A. Miranda Alonso

A mi familia y a Mar

Abreviaturas y símbolos

A	Absorción
α-CD	α -Ciclodextrina
ACE-Cl	Cloroformiato de 1-cloroetilo
Acetona-d₆	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
AGA	α_1 -glicoproteína ácida
AGAB	α_1 -glicoproteína ácida bovina
AGAH	α_1 -glicoproteína ácida humana
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
Arg	Arginina
AS	Albúmina sérica
ASB	Albúmina sérica bovina
ASH	Albúmina sérica humana
ATP	Ácido tiaprofénico
β-CD	β -Ciclodextrina
CBZ	Carbazol
CBZMe	2-(9 <i>H</i> -carbazol-2-il)propanoato de metilo
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases - espectrometría de masas
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
CMZ	Ciamemazina
CMZ-SONO	Ciamemazina <i>N,S</i> -dióxido
CPF	Carprofeno
CPFMe	Éster metílico del carprofeno
CPFOH	2-(6-cloro-9 <i>H</i> -carbazol-2il)propan-1-ol
CPZ	Clorpromazina
CPZ-DD	Clorpromazina didesmetilada
CPZ-MD	Clorpromazina monodesmetilada
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
Cys	Cisteína
δ (ppm)	Desplazamiento químico en partes por millón
ΔA	Incremento de absorbancia
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida

DCM	Diclorometano
ΔE	Incremento de energía
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
ΔG	Incremento de energía libre de Gibbs
ΔG_{EX}	Incremento energía libre de Gibbs para formación de excímero
ΔG_{TEI}	Incremento energía libre de Gibbs para transferencia electrónica
ΔH	Incremento de entalpía
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ε	Coeficiente de absorción molar
E^*	Energía del estado excitado
EM	Espectrometría de masas
E_{ox}	Potencial de oxidación
E_{red}	Potencial de reducción
E_S	Energía de singlete
E_T	Energía de triplete
EX	Exciplejo
EXC	Excímero
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
ϕ_T	Rendimiento cuántico de triplete
FTZ	Fenotiazina
γ -CD	γ -Ciclodextrina
GndCl	Cloruro de guanidinio
H₂O	Agua
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IBU	Ibuprofeno
J	Constante de acoplamiento
k_{CI}	Constante de conversión interna
k_{CIS}	Constante de cruce intersistemas
k_D	Constante de desaparición

k_{EX}	Constante de formación exciplejo
k_{EXC}	Constante de formación excímero
k_F	Constante de fluorescencia
k_q	Constante de desactivación
k_{TE}	Constante de transferencia de energía
k_{TP}	Constante de transferencia de protones
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
LiAlH₄	Tetrahidruro de aluminio y litio
λ_{irr}	Longitud de onda de irradiación
λ_{máx}	Longitud de onda máxima
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MgSO₄	Sulfato magnésico anhidro
MM	Micelas mixtas
μs	Microsegundos
Na₂SO₄	Sulfato sódico anhidro
NaHCO₃	Bicarbonato sódico
P	Fosforescencia
PBS	Disolución de tampón fosfato
PMZ	Promazina
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RV	Relajación vibracional
S	Singlete
SDS	Dodecil sulfato sódico
SP	Suprofeno
T	Triplete
T_{amb}	Temperatura ambiente
TE	Transferencia de energía
Te	Transferencia electrónica
τ_F	Tiempo de vida de fluorescencia
THF	Tetrahidrofurano
TP	Transferencia de protones
t_R	Tiempo de retención

Trp	Triptófano
τ_T	Tiempo de vida de triplete
Tyr	Tirosina
u. a.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
WAR	Warfarina

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Procesos fotoquímicos y fotofísicos.....	3
1.2 Procesos fotoinducidos.....	5
1.2.1 Transferencia de energía.....	6
1.2.2 Transferencia electrónica y formación de exciplexos	7
1.2.3 Otros procesos	8
1.3 Cromóforos carbazol y fenotiazina	10
1.3.1 Carbazol.....	10
1.3.2 Fenotiazina	13
1.4 Sistemas microheterogéneos de tipo biomimético. Generalidades	15
1.5 Proteínas transportadoras	16
1.5.1 Albúmina sérica	18
1.5.2 α_1 -Glicoproteína ácida.....	22
1.6 Ciclodextrinas	25
1.7 Micelas.....	28
1.8 Referencias bibliográficas.....	31
Capítulo 2. Objetivos	41
Capítulo 3. Estereodiferenciación en la unión covalente del éster metílico del carprofeno a proteínas inducida por luz	45
3.1 Introducción	47
3.2 Resultados y discusión	49
3.2.1 Síntesis de (R)- y (S)-CPFMe	49
3.2.2 Comportamiento fotofísico de complejos CPFMe@proteína	50
3.2.3 Irradiaciones en medio proteico	58

3.3 Conclusiones	61
3.4 Procedimiento experimental	62
3.4.1 Reactivos y disolventes	62
3.4.2 Obtención de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-CPFMe	62
3.4.3 Medidas de absorción	62
3.4.4 Medidas de fluorescencia	63
3.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser	63
3.4.6 Irradiación de CPFMe@proteína	63
3.4.7 Tratamiento con GndCl y filtrado sephadex	64
3.4.8 Caracterización espectroscópica de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-CPFMe	64
3.4.9 Espectros RMN- ¹ H y - ¹³ C	65
3.5 Referencias bibliográficas.....	67

Capítulo 4. Diadas conteniendo dos unidades de carprofeno para profundizar en el mecanismo de fotodeshalogenación de CPFMe..... 69

4.1 Introducción	71
4.2 Resultados y discusión	72
4.2.1 Síntesis de los sustratos	72
4.2.2 Reactividad fotoquímica	72
4.2.3 Comportamiento fotofísico	78
4.3 Conclusiones	83
4.4 Procedimiento experimental	85
4.4.1 Reactivos y disolventes	85
4.4.2 Síntesis de las diadas	85

4.4.3 Fotólisis en estado estacionario	86
4.4.4 Medidas de fluorescencia	87
4.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser	87
4.4.6 Medida de potenciales por voltamperometría	88
4.4.7 Caracterización espectroscópica de las diadas	89
4.4.8 Espectros RMN- ¹ H y - ¹³ C	92
4.5 Referencias bibliográficas.....	98

Capítulo 5. Oxidación retardada de ciamemazina en medios biomiméticos..... 99

5.1 Introducción	101
5.2 Resultados y discusión	103
5.2.1 Estudio del proceso de unión al hospedador por medidas de fluorescencia	103
5.2.2 Fotodegradación de CMZ.....	107
5.2.3 Espectroscopía de absorción transitoria	110
5.3 Conclusiones	113
5.4 Procedimiento experimental	114
5.4.1 Reactivos y disolventes	114
5.4.2 Obtención de (-)- y (+)-CMZ	114
5.4.3 Medidas de fluorescencia	115
5.4.4 Fotólisis en estado estacionario	115
5.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser	115
5.4.6 Caracterización espectroscópica de (-)- y (+)-CMZ	118
5.4.7 Espectros RMN- ¹ H y - ¹³ C	119

5.5 Referencias bibliográficas.....	122
-------------------------------------	-----

Capítulo 6. Estudios fotofísicos y fotoquímicos de los metabolitos de clorpromazina 125

6.1 Introducción	127
6.2 Resultados y discusión	129
6.2.1 Síntesis de los metabolitos de CPZ.....	129
6.2.2 Comportamiento fotofísico de complejos metabolito@proteína.....	130
6.2.3 Irradiaciones en medio proteico	138
6.3 Conclusiones	142
6.4 Procedimiento experimental	142
6.4.1 Reactivos y disolventes	142
6.4.2 Obtención de CPZ-MD y CPZ-DD	143
6.4.3 Medidas de fotólisis de destello láser	144
6.4.4 Medidas de fluorescencia	144
6.4.5 Fotólisis en estado estacionario	144
6.4.6 Tratamiento con GndCl y filtrado sephadex	144
6.4.7 Caracterización espectroscópica de CPZ-MD y CPZ-DD	145
6.4.8 Espectros RMN- ¹ H y - ¹³ C	146
6.5 Referencias bibliográficas.....	148

Capítulo 7. Instrumentación..... 151

7.1 Instrumentación general	153
7.2 Instrumentación fotoquímica.....	154

Conclusiones generales / Conclusions	157
Resúmenes.....	163
ANEXO I. Contribuciones a congresos.....	173
ANEXO II. Publicaciones	177

Capítulo 1. Introducción

1.1 Procesos fotoquímicos y fotofísicos

La fotoquímica es la ciencia encargada de estudiar las reacciones químicas y cambios físicos que se producen al interaccionar materia y luz (fotones).

Un proceso fotoquímico se inicia por absorción de luz. 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 estados electrónicos excitados. Su estudio puede ayudar a comprender e interpretar la reactividad fotoquímica y las propiedades fotofísicas de los compuestos.

Cuando un fotón es absorbido, la molécula pasa a un estado electrónicamente excitado superior, inestable respecto al estado fundamental. Pueden ocurrir entonces dos situaciones: que la molécula excitada transforme su estructura química mediante un proceso fotoquímico o que busque otra forma de perder su energía para volver a su estado fundamental, dando lugar a un proceso fotofísico. Así, los procesos por los que una molécula se desactiva al encontrarse en su estado excitado se agrupan en fotoquímicos y fotofísicos.¹

A su vez, los procesos fotofísicos se agrupan en dos tipos: radiativos y no radiativos. Un proceso *radiativo* consiste en la vuelta al estado electrónico fundamental desde un estado excitado con emisión de radiación electromagnética, mientras que en un proceso *no radiativo* la vuelta al estado fundamental no se encuentra asociada a la emisión de luz.

Los procesos radiativos más comunes son:

- Absorción (A): caracterizada por un coeficiente de absorción molar (ϵ), constante relacionada con el área de incidencia del cromóforo y la probabilidad de que se produzca la absorción a una longitud de onda (λ) determinada. La absorción está asociada a transiciones electrónicas entre diferentes niveles energéticos en determinados grupos de la molécula. Pueden ser permitidas (p. ej.

singlete-singlete, $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$) o prohibidas (p. ej. singlete-triplete, $S_0 + h\nu \rightarrow T_1$) por la regla del espín.

- Fluorescencia (F): emisión de radiación ultravioleta o visible permitida por la regla de espín, en la cual se produce la desactivación del estado excitado singlete al estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$). Está caracterizada por una constante de velocidad k_F .

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

Entre los procesos no radiativos más comunes se encuentran:

- Conversión interna (CI) del estado excitado singlete al estado fundamental con liberación de calor a las moléculas del entorno ($S_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$). Estos dos estados son de la misma multiplicidad, por lo que se trata de una transición permitida.

- Cruce intersistemas (CIS), como $S_1 \rightarrow T_1 + \text{calor}$ o $T_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$. Se encuentra favorecida en moléculas con átomos pesados.

- Relajación vibracional (RV): paso desde un nivel vibracional excitado a otro de menor energía.²

Estos procesos se muestran en el diagrama simplificado de Jablonski de la Figura 1.1. Además, cada proceso tiene una duración diferente; los rangos típicos de tiempo se resumen en la Tabla 1.1.

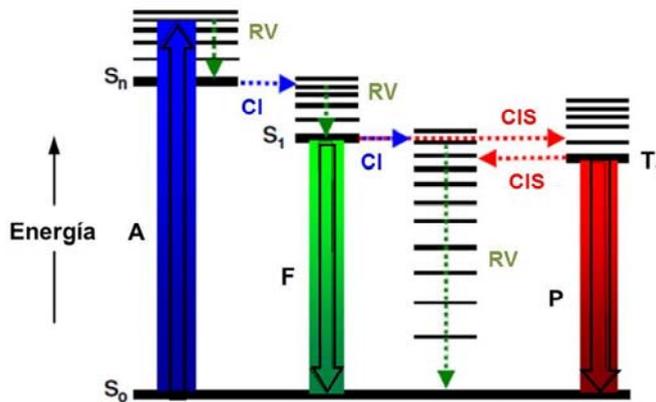


Figura 1.1. Diagrama simplificado de Jablonski en el que se encuentran representados los diferentes estados electrónicos (S = singlete, T = triplete) y los principales procesos fotofísicos. **A** = absorción; **F** = fluorescencia; **P** = fosforescencia; **CI** = conversión interna; **CIS** = cruce intersistemas; **RV** = relajación vibracional.

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^{-7} – 10^{-5}

Tabla 1.1. Tiempos de los principales procesos fotofísicos.

1.2 Procesos fotoinducidos

Cuando dos cromóforos se encuentran en un mismo medio y se produce la absorción de luz, pueden ocurrir entre ellos una serie de procesos, como transferencia de energía (TE), transferencia de electrones (Te), formación de excíplejos (EX), transferencia de protones (TP) o formación de excímeros (EXC).

1.2.1 Transferencia de energía

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

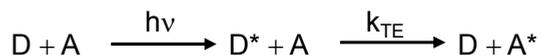


Figura 1.2. Proceso de transferencia de energía.

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.

$$\Delta G \approx \Delta H = E_D^* - E_A^* \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde ΔG es la variación de la energía libre del proceso, ΔH es la entalpía del mismo, E_D^* es la energía del estado excitado del dador y E_A^* es la energía del estado excitado del aceptor.

Estos procesos generalmente tienen lugar siguiendo dos mecanismos: *coulómbico* (tipo Förster), o de *intercambio electrónico* (tipo Dexter).³ El primero implica una interacción dipolo-dipolo y actúa a largas distancias (de hasta 100 Å). Por el contrario, el mecanismo tipo Dexter requiere solapamiento efectivo entre los orbitales del dador y el aceptor, teniendo lugar a distancias cortas (menores de 10 Å). En la Figura 1.3 se ilustra esquemáticamente el mecanismo de estos procesos.

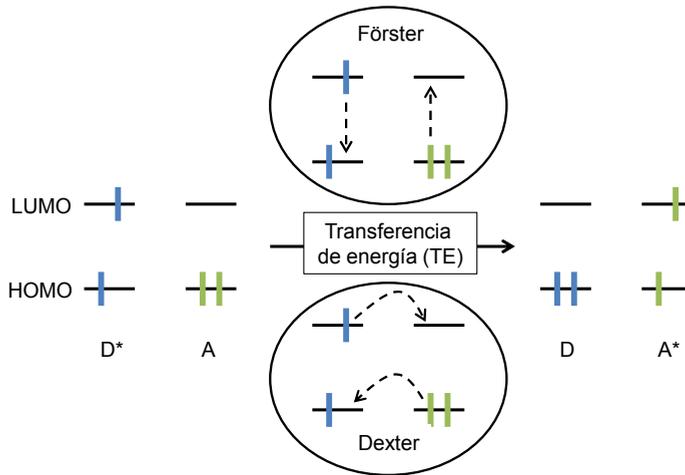


Figura 1.3. Mecanismos de transferencia de energía Förster y Dexter.

1.2.2 Transferencia electrónica y formación de exciplejos

El proceso de transferencia electrónica (Te), tiene lugar cuando una molécula en su estado excitado cede o acepta un electrón de otra molécula en su estado fundamental. En ciertos casos se puede formar un complejo entre uno de los cromóforos en su estado excitado y otro cromóforo distinto en su estado fundamental, es decir entre D^* y A o entre D y A^* . Este complejo, llamado exciplejo (EX), posee carácter de carga parcial en cada cromóforo y un elevado momento dipolar.

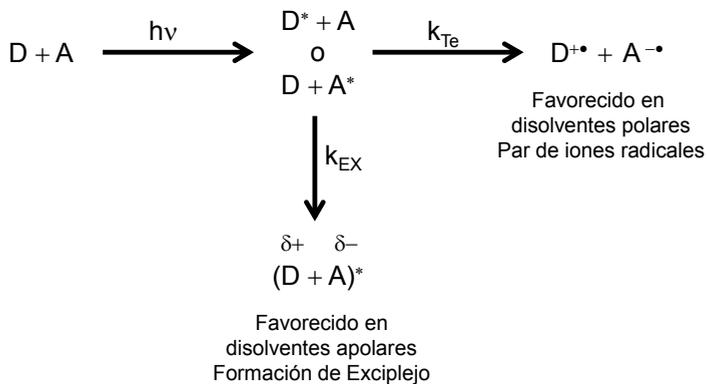


Figura 1.4. Mecanismo de transferencia electrónica.

La termodinámica de estos procesos se puede determinar mediante la ecuación de Rehm-Weller^{4,5} (Ecuación 1.2).

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

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. En disolventes polares se estabiliza el par de iones radicales generado por transferencia electrónica, mientras que en disolventes apolares está favorecida la formación de exciplexo (Figura 1.4).

Los exciplexos pueden detectarse haciendo uso de la técnica de fluorescencia y suelen darse entre moléculas planas capaces de formar complejos de tipo sándwich y que viven lo suficiente como para emitir luz en la escala de nanosegundos.⁶⁻⁸

1.2.3 Otros procesos

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

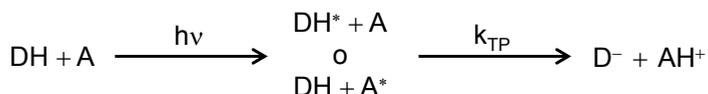


Figura 1.5. Proceso de transferencia de protón por excitación del dador (DH) o del aceptor (A).

Un excímero (EXC) es un complejo que se forma entre un cromóforo en su estado excitado con otro cromóforo idéntico en su estado fundamental. La formación de este complejo puede provocar en ocasiones la desactivación de la fluorescencia del monómero al generarse un dímero en el estado excitado. Como ocurría con los EX, también los EXC pueden ser detectados por fluorescencia.^{9,10}

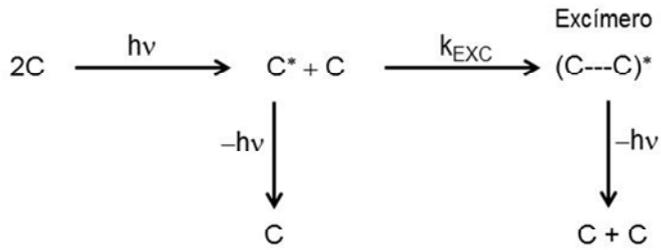


Figura 1.6. Proceso de formación de EXC para un cromóforo (C).

Hay que destacar también que los procesos de transferencia electrónica, protónica y de energía que se han expuesto pueden ocurrir de modo encadenado durante una misma reacción fotoquímica; así, una transferencia de protón puede seguir a una transferencia electrónica, o una transferencia electrónica a una de energía, etc, como se muestra en la Figura 1.7.

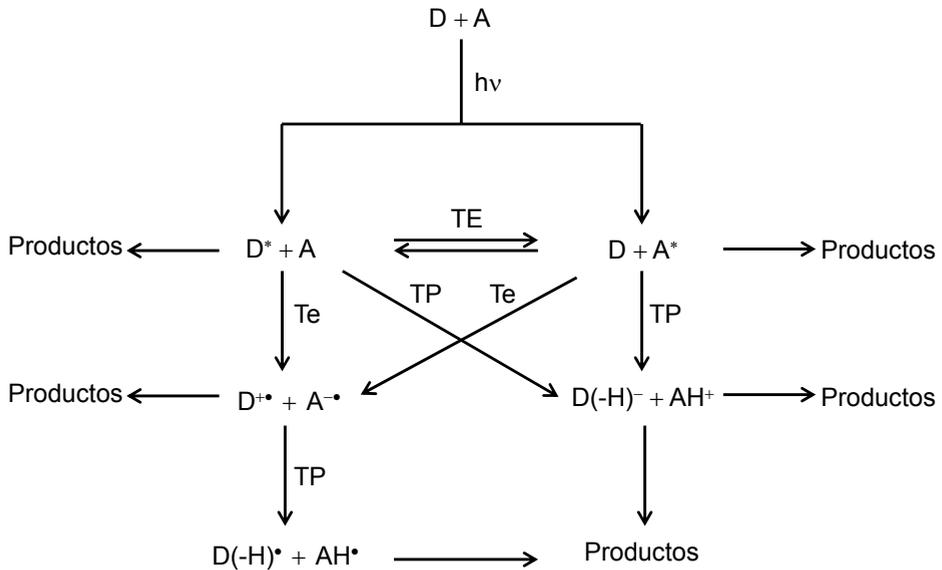


Figura 1.7. Procesos fotofísicos encadenados.

1.3. Cromóforos carbazol y fenotiazina

En esta tesis se estudia la fotoreactividad de fármacos como el carprofeno (**CPF**), la ciamemazina (**CMZ**) y la clorpromazina (**CPZ**) (Figura 1.8) en medios microheterogéneos. El **CPF** es un antiinflamatorio usado en tratamientos veterinarios principalmente en perros y gatos, mientras que **CMZ** y **CPZ** son conocidos antipsicóticos; todos ellos han demostrado presentar fototoxicidad y ocasionar fotoalergias en pacientes.¹¹⁻¹³ A continuación se describen brevemente las propiedades fotofísicas de los cromóforos carbazol (**CBZ**) y fenotiazina (**FTZ**) presentes en estos fármacos, mientras que las de los fármacos propiamente dichos se describen en cada capítulo.

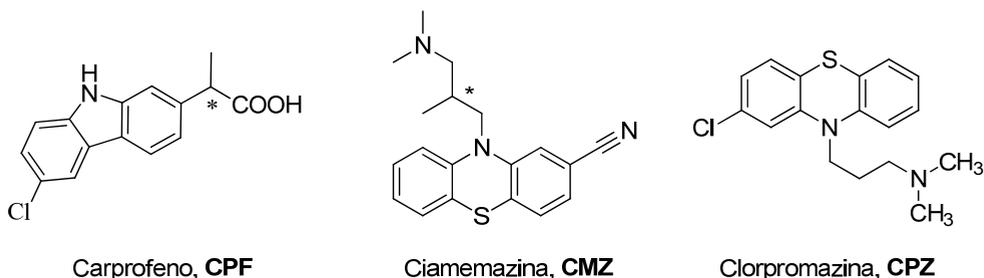


Figura 1.8. Estructuras químicas de los fármacos estudiados.

1.3.1 Carbazol

El 9H-carbazol (**CBZ**, Figura 1.9), también llamado 9-azafluoreno o dibenzopirrol, fue aislado del alquitrán de hulla por primera vez en 1872.¹⁴ Ya en la segunda mitad del siglo XX se aisló un derivado del carbazol (murrayanine) del árbol de hojas de curry que resultó tener propiedades antibióticas.¹⁵ Desde entonces este compuesto despertó el interés tanto de químicos como de biólogos por las características estructurales de su cromóforo, así como por la asombrosa actividad biológica que mostraban muchos derivados del mismo.



Figura 1.9. Estructura del cromóforo carbazol (**CBZ**).

El espectro de absorción UVA-UVB del carbazol presenta distintas bandas, con máximos a 232, 292 y 320 nm (Figura 1.10).

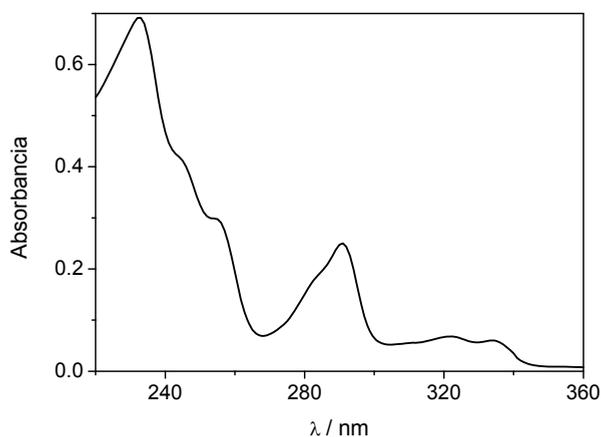


Figura 1.10. Espectro UVA-UVB del carbazol en acetonitrilo.

En acetonitrilo, la banda de emisión por fluorescencia presenta estructura fina con dos máximos a 343 y 358 nm (Figura 1.11). En este disolvente, el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) es 0.62, el tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) 15.1 ns;¹⁶ y la energía de singlete (E_S) 85.1 kcal/mol.

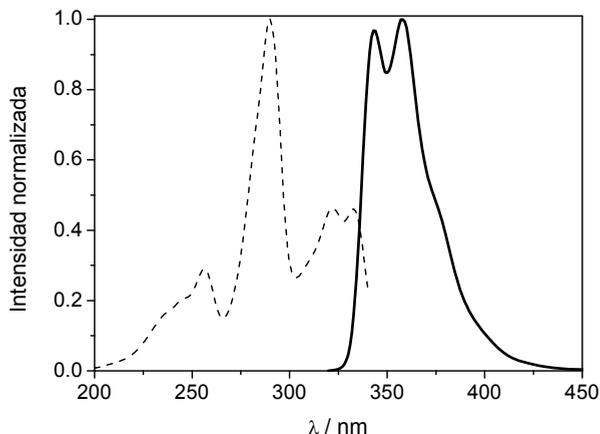


Figura 1.11. Espectro de excitación y emisión por fluorescencia ($\lambda_{exc} = 300$ nm) del carbazol en acetonitrilo.

En el espectro de absorción transitoria obtenido por fotólisis de destello láser (FDL) se detecta el triplete del **CBZ** con un máximo a 420 nm (Figura 1.12), y un tiempo de vida (τ_T) de 40 μ s en etanol/nitrógeno.¹⁷ La energía de triplete (E_T) es de 70.3 kcal/mol determinada mediante fosforescencia.¹⁸

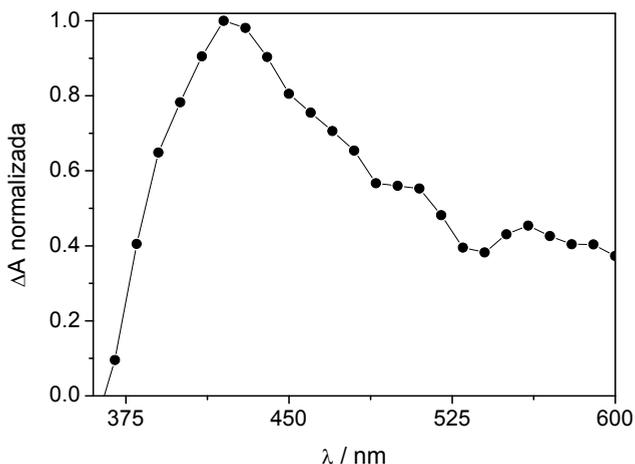


Figura 1.12. Espectro de absorción transitoria de **CBZ** ($\lambda_{exc} = 308$ nm) en etanol y nitrógeno.

1.3.2 Fenotiazina

El compuesto 10*H*-fenotiazina (**FTZ**, Figura 1.13) fue sintetizado por primera vez en 1883.¹⁹ Desde entonces han sido obtenidos más de 5000 derivados de fenotiazina siendo de gran interés por sus propiedades químicas y actividad biológica.²⁰

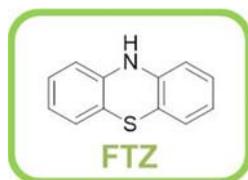


Figura 1.13. Estructura del cromóforo fenotiazina (**FTZ**).

El espectro de absorción UV del cromóforo fenotiazina presenta dos bandas con máximos a 253 y 318 nm (Figura 1.14).

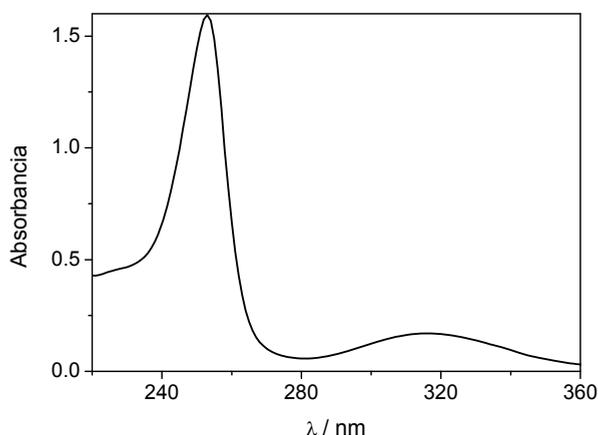


Figura 1.14. Espectro UVA-UVB del cromóforo **FTZ** en acetonitrilo.

La banda de emisión por fluorescencia está centrada a 446 nm en acetonitrilo (Figura 1.15). Posee un rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) de 0.0094 en acetonitrilo y un tiempo de vida de singlete (τ_F) de 1.5 ns en metanol.²¹ Su energía de singlete (E_S) es de 72.4 kcal/mol en acetonitrilo.

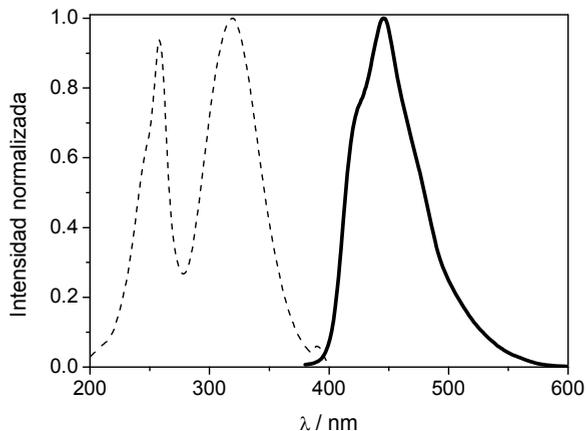


Figura 1.15. Espectro de excitación y emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) de la fenotiazina en acetonitrilo.

En el espectro de absorción transitoria de FDL se detecta el triplete del **FTZ** con un máximo a 460 nm (Figura 1.16) y un tiempo de vida (τ_T) de 10.9 μs en acetonitrilo/argón²² y una energía de triplete (E_T) de 60.4 kcal/mol determinado mediante FDL.²³

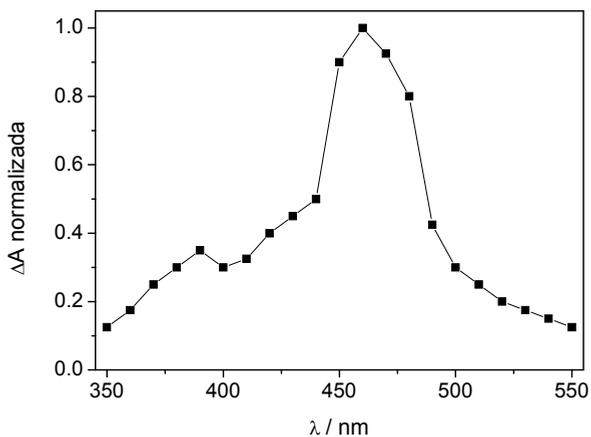


Figura 1.16. Espectro de absorción transitoria de **FTZ** ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) en acetonitrilo/argón.²²

1.4 Sistemas microheterogéneos de tipo biomimético. Generalidades

Se puede definir un sistema microheterogéneo como aquel capaz de encapsular en un ambiente, por lo general hidrofóbico, a compuestos orgánicos pequeños y solubilizarlos en medio acuoso. Por ello se puede definir como heterogéneo a nivel microscópico pero homogéneo a nivel macroscópico.²⁴

El estudio de sistemas microheterogéneos (micelas, zeolitas, ciclodextrinas, proteínas, liposomas, etc.) resulta más sencillo que el de los medios biológicos reales a los que pueden mimetizar y en los que se lleva a cabo procesos como transporte de nutrientes, medicamentos, etc., a través de interfaces en las membranas celulares.

Por otra parte, el uso de microambientes también permite modular el curso de un proceso y obtener información sobre mecanismos de reacción. Ello resulta de gran interés en química sintética moderna, ya que la naturaleza del entorno que experimenta el reactivo puede inducir cambios en la evolución de los procesos a los que dé lugar. Así, mientras que en condiciones convencionales (disolventes orgánicos, presión y temperatura ordinarias) la predicción y control de los rendimientos cuánticos de los distintos procesos es difícil, la utilización de sistemas microheterogéneos ofrece la oportunidad de controlar el desarrollo de los procesos químicos y entre ellos los iniciados por luz (fotoinducidos) gracias a la existencia de fuerzas intermoleculares sustrato-anfitrión. En un caso límite, la restricción espacial generada por la estructura tridimensional de una cavidad de la entidad anfitriona puede orientar hacia un único fotoproceso.

Además del interés intrínseco de los estudios en su faceta sintética y mecanística, el uso de microambientes también puede tener aplicación en la fotorreactividad de fármacos, cosméticos o agentes endógenos. En este contexto en las últimas décadas se ha investigado la influencia de los ambientes microheterogéneos en la fotofísica de diversos sustratos de interés biológico como por ejemplo la safranina (usada como contraste en citologías coloreando de rojo los núcleos celulares)²⁵ o el flavonoide quercetina (con actividad antioxidante y

antihistamínica empleado en tratamientos de obesidad, cáncer o asma)²⁶ entre otros muchos.^{24,27,28}

Los ambientes microheterogéneos que se han utilizado en esta tesis son los proporcionados por proteínas, micelas y ciclodextrinas (Figura 1.17) por lo que a continuación se realiza una breve descripción de los mismos tanto a nivel estructural como de interacción sustrato-anfitrión.

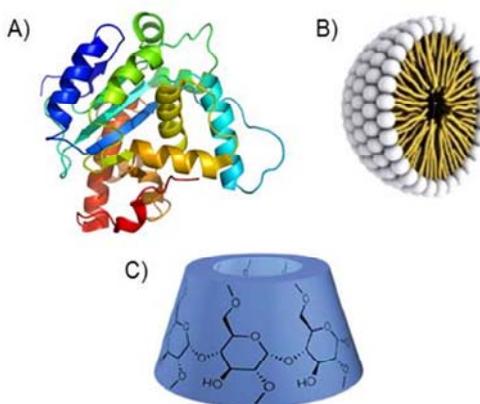


Figura 1.17. Representación esquemática de: A) Proteína, B) Micela, C) Ciclodextrina.

1.5 Proteínas transportadoras

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes de los organismos vivos, cumpliendo con diversas funciones vitales: actúan como enzimas, hormonas, anticuerpos, o son vehículo de transporte de sustancias endógenas (ácidos grasos, bilirrubina, etc.) o exógenas (nutrientes, fármacos, etc.).²⁹ Desde un punto de vista estructural, pueden considerarse como polímeros lineales constituidos por aminoácidos, cuya estructura tridimensional es capaz de fijar específicamente ligandos en el denominado sitio de unión o centro activo y desarrollar así sus funciones.³⁰

El sitio activo de las proteínas no es un receptáculo pasivo para la unión del sustrato, sino una maquinaria molecular muy compleja que emplea una amplia

diversidad de mecanismos químicos que facilitan la interacción sustrato-proteína. Está formado por cadenas laterales de residuos de aminoácidos específicos, lo que ocasiona que tenga una disposición tridimensional particular, diferente al resto de la proteína.³¹

Las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo son las proteínas transportadoras, entre ellas la albúmina sérica (AS) y la α_1 -glicoproteína ácida (AGA). Ambas son responsables de numerosos procesos relevantes (como la estabilización de la presión osmótica y el mantenimiento del pH en el plasma), además del transporte de sustancias,³²⁻³⁵ siendo susceptibles de unir fármacos en el torrente sanguíneo para su liberación posterior en blancos concretos.^{33,36} En este contexto, la unión fármaco-proteína es un proceso clave que está implicado en la modulación de la solubilidad del fármaco en el plasma, toxicidad, susceptibilidad a la oxidación y vida media *in vivo*.^{33,35} Por ello, la unión de fármacos a proteínas transportadoras se ha estudiado durante años utilizando diferentes técnicas, con el propósito de entender el proceso y descubrir la base estructural que permita el diseño de nuevos agentes terapéuticos.³⁷

Cuando un fármaco está unido a una proteína, su tiempo de acción se ve prolongado debido a que se retarda su metabolización. El grado de unión depende de la concentración total de fármaco y de su afinidad por la proteína.³⁸ El proceso es normalmente reversible y se establece un equilibrio entre el fármaco unido y el libre. Sólo los fármacos no unidos son farmacológicamente activos; por ello una alta afinidad por la proteína resulta en una mejora de la solubilidad y en un incremento de su tiempo de vida media. Al contrario, una baja afinidad se asocia con una limitación para traspasar los tejidos y por tanto mayor dificultad para alcanzar el lugar de actuación.^{38,39}

Desde el punto de vista de la reactividad fotoquímica en proteínas, hasta el momento sólo un reducido número de estas reacciones fotoquímicas han aprovechado los microambientes proporcionados por los sitios de unión. Los ejemplos descritos hasta ahora en la literatura se incluyen en el área de fotoquirogénesis supramolecular,⁴⁰⁻⁴⁴ la hidrólisis de glucurónidos,⁴⁵ la reacción de foto-Fries⁴⁶ y la protección frente a reacciones de fotooxidación.^{47,48}

1.5.1 Albúmina sérica

La albúmina sérica (AS) es una proteína transportadora que se encuentra presente en todas las especies de vertebrados. Se puede extraer de humanos (ASH), bovinos (ASB), caballos, ratas, cerdos, ovejas, etc., aunque las que mayor interés han suscitado son la ASH y la ASB. Ambas son de fácil adquisición y bajo coste.³³

La ASH es sintetizada y secretada por el hígado. Se encuentra presente prácticamente en todos los tejidos, sobretodo en la piel y los músculos, aunque también puede encontrarse en cualquier fluido corporal, como el fluido vítreo y acuoso ocular, el sudor, las lágrimas, la saliva y la sangre, donde es la proteína transportadora más abundante (3,5-4 g en 100 mL).

Debido a la gran similitud encontrada en las secuencias de aminoácidos en ASs de diversas especies, otras albúminas se han usado como modelos de ASH para estudios de interacción con fármacos y de farmacocinética, fundamentalmente ASB que estructuralmente es muy similar a ASH.^{49,50}

- Función de la albúmina sérica

Como ya se ha comentado, la función principal de la AS es actuar como vehículo de diferentes sustancias en el torrente sanguíneo,⁵¹ aunque también juega un papel activo manteniendo el pH y la presión osmótica estables en sangre.³⁴

La interacción de ligandos con AS puede producir un incremento de su solubilidad en sangre (p.ej. de los ácidos grasos), así como una disminución de su toxicidad o una protección frente a la oxidación.³² También puede actuar como almacén de ciertas toxinas (como en el caso del transporte de la bilirrubina hasta el hígado para su excreción biliar) y es capaz de interactuar con toxinas exógenas, haciendo que sean menos nocivas para el organismo.⁵² Finalmente, la AS también puede presentar actividad enzimática (enolasa, esterasa, glucuronidasa), muy interesante desde un punto de vista clínico-farmacéutico, ya

que en algunos casos es una etapa clave en el proceso de activación de fármacos.⁵³⁻⁵⁵

- Estructura general de la albúmina sérica

La albúmina es una proteína globular que consiste en una cadena polipeptídica simple sin grupos prostéticos u otros aditivos y un peso molecular aproximado de 66 kDa. Contiene 9 logos dobles formados por 17 puentes disulfuro que envuelven a los residuos de cisteína adyacentes. El 67% de su estructura secundaria está formada por una hélice- α de seis vueltas, un 10% de giro β y un 23% de cadena extendida. La estructura tridimensional puede ser descrita en términos de tres dominios, cada uno constituido por dos subdominios. Por tanto, en las albúminas existe un amplio y variado número de sitios de unión donde los sustratos pueden interaccionar.^{33,34,36,56}

En el caso de la ASH (Figura 1.18), ésta constituye alrededor del 60% en peso del total de proteína en sangre. La componen 585 aminoácidos, entre los que se encuentran un único triptófano (Trp-214);⁵⁷ y una cisteína libre (Cys-34).

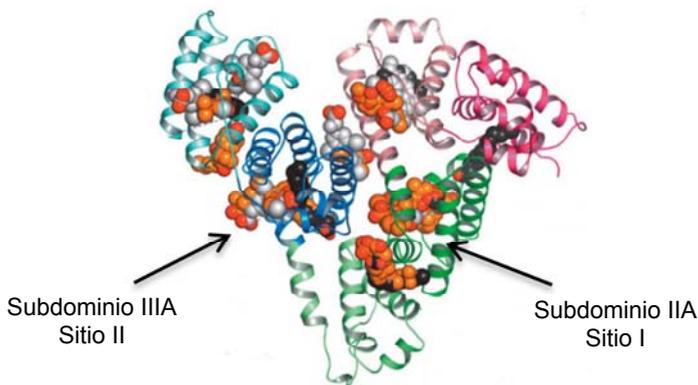


Figura 1.18. Estructura de la ASH donde se observan los dos sitios principales de unión para compuestos orgánicos pequeños (sitio I y sitio II).

La ASB está formada por 583 aminoácidos⁵⁸ y presenta una secuencia coincidente con la ASH al 76%. Sin embargo, la ASB contiene dos residuos de Trp (en posiciones 213 y 134) en lugar de uno. El Trp-134 posee 7 residuos de tirosina

(Tyr) próximos; no ocurre lo mismo en el Trp-213 ni en el Trp-214 de la ASH. Las diferencias en la aromaticidad vecinal pueden contribuir a que existan diferencias en las propiedades de los dos Trp de ASB.³³ Debido a su similitud estructural, gran variedad de estudios fármaco-proteína han utilizado la ASB como modelo en lugar de la ASH.⁵⁹⁻⁶¹

- Interacción con sustratos

Como ya se ha indicado anteriormente, las AS presentan gran afinidad por fármacos, ácidos grasos, aminoácidos, metabolitos, etc. En esta tesis doctoral nos centraremos en su interacción con fármacos que poseen en su estructura cromóforos de tipo carbazol (**CBZ**) o fenotiazina (**FTZ**).

El estudio de la interacción fármaco/AS permite profundizar en la farmacocinética (biodistribución, metabolismo, eliminación) y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo. Esta interacción es generalmente reversible con unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M^{-1} .³³ Es de tipo electrostático, por enlaces de hidrógeno, puente salino o fuerza de Van der Waals. En ocasiones, la interacción es irreversible, como ocurre con ciertos metabolitos de tipo glucurónido³² o con fármacos que poseen un grupo tiol capaz de unirse covalentemente al residuo de aminoácido cisteína de la posición 34.⁶² Este hecho es importante porque puede alterar el destino metabólico del fármaco en cuestión y cambiar las propiedades estructurales y funcionales de la proteína. Los aductos así formados podrían causar hipersensibilidad y toxicidad hepática y renal aguda.

Aunque las AS poseen varios sitios de unión con sustratos, se acepta la existencia de dos sitios específicos en ASH, para compuestos orgánicos pequeños, denominados por Sudlow sitio I (o sitio de unión de la warfarina) y sitio II (o sitio de unión del diazepam).⁶³

El sitio I se encuentra situado en el subdominio IIA⁵⁷ y en él las interacciones predominantes son de tipo hidrofóbico.⁶⁴ Como ejemplo de ligandos con gran afinidad por el sitio I se pueden citar la warfarina, la indometacina y la fenilbutazona. El hecho de que compuestos grandes como la bilirrubina

interaccionen con él pone en evidencia que es flexible y de gran tamaño. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son Trp-214 y Arg-218.

El sitio II se encuentra ubicado en el subdominio IIIA⁵⁷ y las interacciones que predominan en él son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas.⁶⁴ Es de menor tamaño y menos flexible que el sitio I,⁵⁷ por tanto, cabe esperar que se observen en mayor grado las interacciones estereoselectivas en este sitio de unión. Un ejemplo clásico es el L-triptófano, cuya afinidad por el sitio II es 100 veces mayor que la del isómero D-triptófano. Los ácidos carboxílicos aromáticos presentan alta afinidad por este sitio. Los aminoácidos Arg-410 y Tyr-411 desempeñan un papel importante en la interacción con ligandos.⁵⁷

- Albúmina sérica como microrreactor

Se han descrito investigaciones en las que se establecen ventajas de usar albúmina sérica como microrreactor para reacciones fotoquímicas. Así, se han estudiado la transposición de foto-Fries de hidrógenosuccinato- y glutarato de 4-metoxi-1-naftilo y su correspondiente éster metílico,⁴⁶ la reacción Norrish II en derivados de avobenzona⁶⁵ y la fotoelectrociclización $[6\pi]$ de *N*-difenilmetilamina⁶⁶ en el interior de proteínas (Figura 1.19).

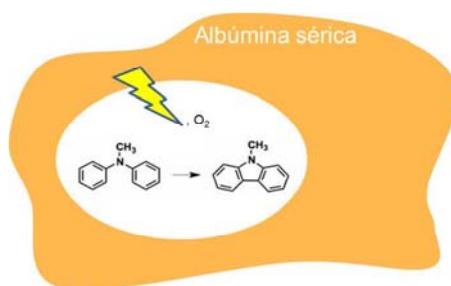


Figura 1.19. Esquema de la fotociclización de *N*-difenilmetilamina a *N*-metilcarbazol en el interior del microambiente que proporciona el sitio I de unión en las albúminas séricas.

Las restricciones conformacionales de la proteína pueden proporcionar un microambiente favorable para optimizar la eficiencia de una reacción. En el caso del reordenamiento de foto-Fries, la reacción mejora en cuanto a su selectividad con respecto al proceso en disolución, reduce el número de subproductos indeseables y es fácil de seguir por técnicas espectroscópicas.

En el caso del fármaco cinacalcet (CIN) y el ácido antracenoacético (AAAC), la proteína proporciona protección del ataque por oxígeno, lo que reduce los efectos fototóxicos causados por la formación de oxígeno singlete.^{47,48}

1.5.2 α_1 -Glicoproteína ácida

La α_1 -glicoproteína ácida (AGA) es también una proteína transportadora presente en el plasma e igualmente sintetizada en el hígado. Es secretada principalmente por los hepatocitos, aunque puede ser expresada en tejidos extrahepáticos, como células endoteliales o macrófagos alveolares y constituye una de las proteínas de fase aguda mayoritarias,⁶⁷ de aquí que su concentración en suero aumente como respuesta a un daño de los tejidos sistémico, inflamación o infección. Se distingue de otras glicoproteínas por el hecho de tener una elevada solubilidad en agua y en algunos disolventes orgánicos polares.⁶⁸

La AGA se encuentra presente en muchas especies de vertebrados y puede extraerse de humanos (AGAH), bovinos (AGAB), ratas, conejos, etc.

- Función de la α_1 -glicoproteína ácida

La AGA se encuentra presente en casi todos los tejidos y fluidos biológicos como plasma, jugos gástricos, líquido sinovial, etc.⁶⁹ Su vida media es de aproximadamente 5 días y su eliminación renal es baja.⁷⁰⁻⁷³

Aunque su función biológica no está totalmente definida, se conocen muchos procesos donde su participación es importante. Así, en las células endoteliales, la AGA es un componente importante de la barrera capilar.⁷⁴ También puede servir como agente protector de infecciones y contra toxinas, por unión a lecitinas tóxicas,⁷⁵ endotoxinas⁷⁶ y lipopolisacáridos bacterianos.⁷⁶ Inhibe

la adherencia de la bacteria *Mycoplasma pneumonia* a los macrófagos alveolares,⁷⁷ así como la replicación del rotavirus SA-II actuando directamente sobre el virus.⁷⁸

La AGA, además de estimular a las células mononucleares y los macrófagos para secretar el factor- α de necrosis de tumores (TNF- α),⁷⁹ también inhibe la apoptosis inducida por TNF de hepatocitos⁸⁰ y proporciona protección contra otros efectos tóxicos de TNF.⁸¹ Posee también actividad inmunosupresiva, demostrada en pacientes con cáncer,⁸² que puede deberse a interacciones electrostáticas entre los grupos ácidos siálicos de la AGA y fosfolípidos.⁸³

Su principal función es como proteína transportadora. Debido a sus propiedades físico-químicas, la AGA se une principalmente a compuestos básicos o neutros de origen tanto endógeno como exógeno, aunque también es capaz de transportar fármacos ácidos.

- Estructura general de la α_1 -glicoproteína ácida

La AGAH (Figura 1.20) consiste en una cadena polipeptídica de 183 aminoácidos, contiene dos puentes disulfuro y su peso molecular de 44 kDa. Esta proteína exhibe un alto grado de glicosilación, aproximadamente el 45 % de su masa total es debida a carbohidratos⁸⁴ y constituye entre el 1–3 % de proteína total en sangre. Atendiendo a diferentes pruebas de desplazamiento se podría decir que AGAH contiene un solo sitio de unión grande y flexible para la mayoría de compuestos orgánicos pequeños. Debido fundamentalmente al alto contenido en ácido siálico (11 %) en su parte carbohidratada está cargada negativamente, tiene un pK_a de 2.6, y un punto isoeléctrico de 2.7.⁶⁸ Su estructura es conocida ya que ha sido cristalizada como sal de Pb^{2+} en forma de bipirámide hexagonal.⁸⁵

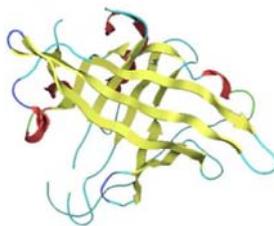


Figura 1.20. Estructura de la AGAH.

Posee 3 residuos de triptófano (en posiciones 25, 122 y 160), y sólo los dos últimos estarían implicados en el proceso de unión de ligando. En el caso de fármacos básicos, el principal aminoácido involucrado es Trp-160, mientras que con los ácidos y neutros intervienen His-97, Tyr-91, Arg-105 y Trp-122.

En el caso de la AGAB el número de aminoácidos que la forman es de 185.⁸⁶ Se trata de una proteína menos glicosilada que su análoga humana ya que sólo un 26.6 % de su masa total está formada por carbohidratos.⁸⁷ Asimismo, puesto que el contenido de ácido siálico en su parte carbohidratada también es menor (8.3 %), su punto isoeléctrico aumenta, variando entre 3.2–3.7.⁸⁷

- Interacción con sustratos

A pesar de que se han descrito hasta 7 sitios de unión en AGAH, sólo uno de ellos es de alta afinidad y es el que transporta la gran mayoría de moléculas que interaccionan con ella.^{67,88,89} El resto de sitios son de baja afinidad y su influencia en la función de transporte de sustratos se considera despreciable.

El primer fármaco para el que se describió la unión a AGAH fue el dipiridamol, un inhibidor de agregación plaquetaria.⁹⁰ Como ejemplo de fármacos básicos y neutros se pueden citar el tamoxifen⁹¹ y el propranolol.⁹² Puede transportar heparina, un anticoagulante natural, neurotransmisores como la serotonina,⁹¹ o esteroides endógenos como el cortisol.⁹³ También es capaz de unir moléculas ácidas para su transporte, como fenobarbital⁹⁴ o ácido retinoico.⁹⁵

Son escasos los ejemplos de fármacos que se unen a la AGAB. Algunos de ellos son el antibiótico eritromicina⁹⁶ y el antipsicótico clorpromazina (CPZ).⁹⁷ La AGAB también puede interaccionar con hormonas esteroideas como la progesterona.⁹⁷

Aunque generalmente se asume que en el plasma los fármacos se unen principalmente a AS, la AGA puede contribuir significativamente a la concentración total de fármaco unido a proteínas plasmáticas, especialmente en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas, en la que disminuye la concentración de AS y aumenta la de AGA, como ocurre en los procesos inflamatorios.

1.6 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos formados por una serie de 6, 7 u 8 glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4). Se denominan α -CD, β -CD y γ -CD en función al n° de unidades de glucosa.⁹⁸ En general, se obtienen mediante la degradación del almidón por hidrólisis enzimática.⁹⁹ Fueron descubiertas a finales del siglo XIX¹⁰⁰ y poseen una cavidad apolar que proporciona una matriz hidrofóbica ideal para la unión de determinados huéspedes (formación de complejos) y una parte exterior hidrofílica gracias a los grupos hidroxilo que les permiten el anclaje directo de huéspedes o bien la adhesión de un grupo funcional que modifique el tipo de anclaje de éstos.¹⁰¹

En cuanto a las dimensiones de α -CD, β -CD y γ -CD, la altura es igual para las tres, mientras que el número de glucosas que posee cada una es lo que determina el diámetro interno de la cavidad y su volumen (Figura 1.21). La α -CD suele complejar preferentemente compuestos de bajo peso molecular o compuestos con cadenas alifáticas, la β -CD complejos aromáticos y heterociclos y la γ -CD interacciona con moléculas más grandes como macrociclos y esteroides.¹⁰²

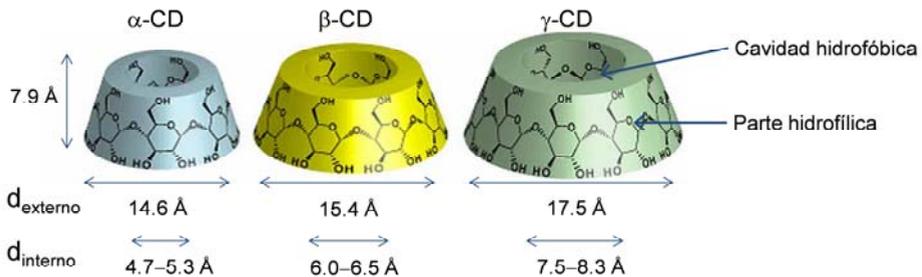


Figura 1.21. Estructuras 3D de las ciclodextrinas y sus dimensiones.

La inclusión de sustratos en CDs modifica sus propiedades fisicoquímicas.¹⁰³ Por ejemplo, mediante el uso de CDs se puede inicialmente conseguir un aumento considerable de solubilidad de sustratos insolubles en

medio acuoso, estabilidad y/o protección frente a degradación por oxidación, luz (visible o UV), calor, control de la volatilidad o sublimación del huésped.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ También encuentra aplicación en la separación cromatográfica, modificación de sabores u olores por enmascaramiento de estos¹⁰⁷ y la liberación controlada de fármacos.^{108,109}

- Fotofísica de complejos huésped-CD

Existe un cambio de polaridad del huésped en el interior de la CD con respecto a la disolución acuosa. La inclusión del sustrato en la cavidad del macrociclo produce una restricción de su libre rotación. Las interacciones entre el sustrato y el agua se ven inhibidas, al mismo tiempo que el huésped está más protegido contra agentes desactivantes como el O₂. También puede ocurrir que se favorezca o inhiba la formación de dímeros,¹¹⁰ la transferencia de energía (TE)¹¹¹ la transferencia electrónica (Te)¹¹² o la abstracción de hidrógeno,¹¹³ etc.

El efecto más común es el producido por el cambio de polaridad (solvatocromismo). Consiste en el desplazamiento de la posición del máximo del espectro de fluorescencia.¹¹⁴ Suponiendo que la E del estado fundamental no varíe (lo que no es siempre así), la polaridad puede modificar la E del primer estado excitado singlete. Puede ocurrir que $\Delta E_{(S_1-S_0)}$ aumente, con lo que la fluorescencia se desplaza hacia el azul o que $\Delta E_{(S_1-S_0)}$ disminuya y se desplaza hacia el rojo (Figura 1.22).¹¹⁵

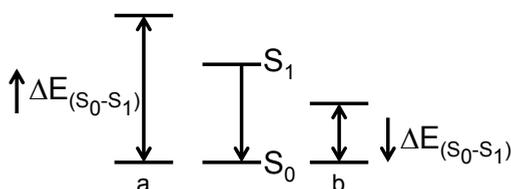


Figura 1.22. Efectos de la polaridad en la desestabilización (a) y estabilización (b) del primer estado excitado singlete.

En la literatura se encuentra descritos ejemplos de la susceptibilidad del estado singlete de huéspedes encapsulados en CD;¹¹⁶⁻¹¹⁸ la situación puede ser extrapolable al estado excitado triplete, donde una restricción de la movilidad del sustrato puede dar lugar a un aumento de su tiempo de vida de triplete (ϕ_T) así como a un aumento de la señal de absorción triplete-triplete (T_1-T_n).¹¹⁹ Un ejemplo descrito recientemente muestra que en un complejo de inclusión γ -CD/fulereno (2:1) (Figura 1.23) las propiedades del estado excitado triplete (determinados mediante la técnica de fotólisis de destello láser), son similares a las del fulereno en un disolvente orgánico (tolueno).¹¹⁷



Figura 1.23. Complejo de inclusión γ -CD/fulereno (2:1).

- Fotoquímica de complejos huésped-CD

Una de las aplicaciones más destacadas de las CDs en fotoquímica es la del reconocimiento quiral, que consiste en la discriminación entre los dos estereoisómeros de una molécula quiral. Esta aplicación es muy importante en fármacos quirales, puesto que los efectos de un fármaco pueden ser radicalmente diferentes dependiendo del enantiómero empleado. El reconocimiento quiral con CD es posible gracias a la funcionalización de éstas con un grupo adecuado para cada caso. En este ámbito son destacables los trabajos en los que se controla la fotodimerización del ácido 2-antracencarboxílico de manera enantioselectiva¹²⁰⁻¹²⁶ o los que estudian la estereodiferenciación en la reacción de fotoisomerización del ciclooctano¹²⁷⁻¹²⁹ y del ciclooctadieno.¹³⁰ Además, se han realizado investigaciones sobre el control enantio o diastereoselectivo para diferentes fotorreacciones en medio CD como la fotociclación de éteres alquílicos de la tropolona,¹³¹ la

fotoisomerización de difenilciclopropano y sus derivados¹³² o la conversión fotoquímica de α -oxoamidas en derivados β -lactama.¹³³

En cuanto a las reacciones fotoquímicas en las que no interviene el reconocimiento quiral; como las reacciones de foto-Fries y foto-Claisen, se ha observado que en el interior de las cavidades de CDs tiene lugar cierto grado de regioselectividad.¹³⁴⁻¹³⁶

1.7 Micelas

Las micelas son agregados supramoleculares constituidos por asociación de moléculas bipolares (surfactante) que se forma a partir de un valor de concentración micelar crítica (cmc).

En disolución acuosa una micela forma un agregado con “cabeza” hidrofílica en contacto con el agua, mientras que las regiones hidrofóbicas o “colas” se orientan hacia el centro de la micela (Figura 1.24).

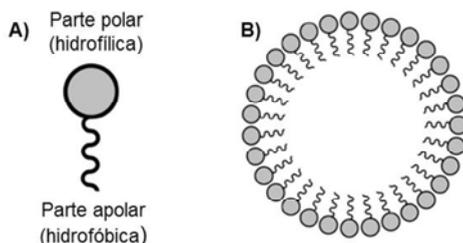


Figura 1.24. A) Molécula de surfactante. B) Esquema de una micela.

En disolventes apolares podemos encontrar micelas inversas, las cuales tienen grupos con la cabeza en el centro y las colas extendidas hacia fuera.¹²⁹

Por lo general, las micelas son esféricas, aunque también pueden ser elipsoides o cilíndricas. Su tamaño y forma son función de la geometría molecular de las moléculas del surfactante y de condiciones tales como la concentración de surfactante, temperatura, pH y fuerza iónica.

En algunos trabajos se ha profundizado sobre el comportamiento de los medios heterogéneos micelares como modelo simple de membrana celular, debido

a su capacidad para solubilizar tanto sustancias hidrófilas como lipófilas.^{137,138} A continuación, se muestra la estructura química de dos micelas ampliamente descritas en la literatura: una aniónica (dodecil sulfato sódico, SDS) y otra catiónica (bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB).¹³⁹⁻¹⁴¹

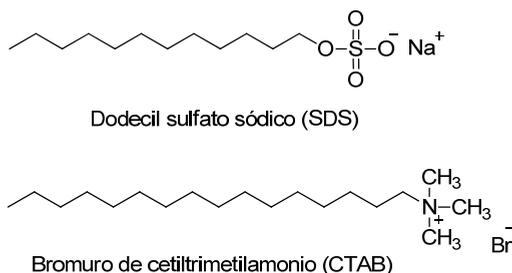


Figura 1.25. Esquema de la estructura química de SDS y CTAB.

- Fotoquímica de sistemas huésped-micela

Las condiciones experimentadas en el interior de las micelas han hecho que sean utilizadas para llevar a cabo reacciones químicas, analizando el efecto que la estructura supramolecular tiene sobre estos procesos.¹⁴²⁻¹⁴⁸ Se han estudiado reacciones como hidrólisis,^{149,150} solvólisis,^{151,152} o *N*-alquilaciones¹⁵³ en las que normalmente la reacción ha resultado estar más favorecida en el interior de las micelas que en disolución.

El empleo de la luz en reacciones que se llevan a cabo en micelas resulta ser especialmente interesante ya que en las reacciones térmicas convencionales la agitación o la calefacción pueden destruirlas.¹⁵⁴ Por ello las micelas se pueden emplear como microrreactores de reacciones fotoquímicas. En este contexto, están descritas las reacciones de foto-Fries de ésteres naftilo, la ruptura alfa de sustratos tipo 1-fenil-3-*p*-tolilpropan-2-ona y las reacciones de Norrish de tipo I y tipo II en éteres alquílicos de la benzoina.¹⁵⁵ También se ha abordado el comportamiento del cromóforo benzofenona en presencia de micelas SDS, mediante fotólisis de destello láser.¹⁵⁶ En estas condiciones, se ha detectado una especie transitoria que corresponde al radical benzhidrilo, lo que demuestra que la

benzofenona abstrae hidrógeno del SDS. Dentro de la micela se ha encontrado que el grupo carbonilo interactúa con el medio acuoso exterior de la micela y los grupos fenilo quedan orientados hacia el interior.¹⁵⁷

El estudio de la fotoquímica de fármacos como cinacalcet (CIN), naproxeno (NPX) o el propranolol (PPN) tras encapsulación en micelas mixtas (MM, compuestas por fosfolípidos y sales biliares, Figura 1.26) demuestra que este medio biomimético es capaz de influenciar en la cinética de los estados excitados y dificultar su desactivación por especies como yoduro o nitrito con una constante de velocidad un orden de magnitud inferior a la observada en ausencia de micela.¹⁵⁸ También se han encapsulado compuestos que contienen ácido cólico o colesterol, sirviendo el microambiente micelar para solubilizar a los mismos, lo que de otro modo resultaría inviable.¹⁵⁹

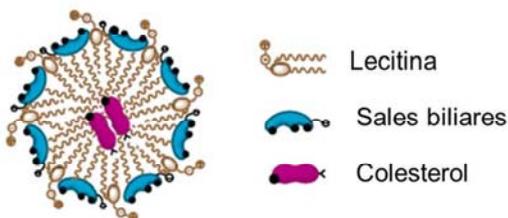


Figura 1.26. Estructura de una micela mixta (MM).

1.8 Referencias bibliográficas

- (1) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; University Science Books: Sausalito, California, 1991.
- (2) Larson, R. A.; Weber, E. J. *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*; Lewis Publishers: Boca Raton, Florida, 1994.
- (3) Speiser, S. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1953.
- (4) Rehm, D.; Weller, A. *Isr. J. Chem.* **1970**, 8, 259.
- (5) Weller, A. *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93.
- (6) Mataga, N.; Chosrowjan, H.; Taniguchi, S. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2005**, 6, 37.
- (7) Ranjan Bangal, P.; Chakravorti, S. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, 55, 2447.
- (8) Rosenblum, G.; Zaltsman, I.; Stanger, A.; Speiser, S. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, 143, 245.
- (9) Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*; Wiley: New York, 1970.
- (10) Birks, J. B.; Christophorou, L. G. *Nature* **1962**, 194, 442.
- (11) Cornilleau, V.; Dompmartin, A.; Michel, L.; Verneuil, L.; Leroy, D. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2000**, 16, 62.
- (12) Kochevar, I. E. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, 77, 59.
- (13) Ljunggren, B.; Lundberg, K. *Photodermatol.* **1985**, 2, 377.
- (14) Graebe, C.; Glazer, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1872**, 5, 12.
- (15) Chakraborty, D. P.; Barman, B. K.; Bose, P. K. *Tetrahedron* **1965**, 21, 681.
- (16) Bonesi, S. M.; Erra-Balsells, R. *J. Lumin.* **2002**, 97, 83.
- (17) Encinas, S.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 640.
- (18) Heckman, R. C. *J. Mol. Spectrosc.* **1958**, 2, 27.
- (19) Bernthsen, A. *Ann.* **1884**, 224, 1.
- (20) Pluta, K.; Morak-Mlodawska, B.; Jelen, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3179.
- (21) Petrushenko, K. B.; Vokin, A. I.; Turchaninov, V. K.; Frolov, Y. L. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1983**, 32, 2151.
- (22) Gao, Y.; Chen, J.; Zhuang, X.; Wang, J.; Pan, Y.; Zhang, L.; Yu, S. *Chem. Phys.* **2007**, 334, 224.

- (23) Murov, S. L.; Charnichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (24) Mallick, A.; Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *J. Photochem. Photobiol. C* **2007**, *8*, 109.
- (25) Das, P.; Chakrabarty, A.; Mallick, A.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11169.
- (26) Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biopolymers* **2003**, *72*, 427.
- (27) Guharay, J.; Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *43*, 75.
- (28) Mallick, A.; Haldar, B.; Maiti, S.; Bera, S. C.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14675.
- (29) Barrett, G. C.; Davies, J. S. *Amino Acids, Peptides and Protein*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004; Vol. 34.
- (30) Petsko, G.; Ringe, D. *Protein Structure and Function*; Blackwell: Oxford, 2003.
- (31) Branden, C.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*; Taylor and Francis: New York, 1999.
- (32) Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 695.
- (33) Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: New York, 1995.
- (34) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439.
- (35) Wybranowski, T.; Cyrankiewicz, M.; Ziomkowska, B.; Kruszewski, S. *BioSystems* **2008**, *94*, 258.
- (36) Carter, D. C.; Ho, J. X. *Advances in Protein Chemistry*; Academic Press: New York, 1994; Vol. 45.
- (37) Vuignier, K.; Schappler, J.; Veuthey, J.-L.; Carrupt, P.-A.; Martel, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 53.
- (38) Lin, J. H.; Lu, A. Y. H. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 403.
- (39) Vaya, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4102.

- (40) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Bosca, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- (41) McDonagh, A. F.; Agati, G.; Fusi, F.; Pratesi, R. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 305.
- (42) Nishijima, M.; Wada, T.; Mori, T.; Pace, T. C. S.; Bohne, C.; Yoshihisa, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3478.
- (43) Nishijima, M.; Wada, T.; Mori, T.; Pace, T. C. S.; Bohne, C.; Yoshihisa, I. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2707.
- (44) Ouchi, A.; Zandomeneghi, G.; Zandomeneghi, M. *Chirality* **2002**, *14*, 1.
- (45) Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861.
- (46) Marin, M.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2910.
- (47) Alonso, R.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3860.
- (48) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158.
- (49) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- (50) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694.
- (51) Dockal, M.; Carter, D. C.; Ruker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.
- (52) Ewaskiewicz, J. I.; Devlin, T. M.; Ch'ih, J. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 1095.
- (53) Drmanovic, Z.; Voyatzi, S.; Kouretas, D.; Sahpazidou, D.; Papageorgiou, A.; Antonoglou, O. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4113.
- (54) Dubois-Presle, N.; Lopicque, F.; Maurice, M.-H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47*, 647.
- (55) Ikeda, T. *Proceeding of the International Symposium on Serum Albumin and α_1 -Acid Glycoprotein* Kumamoto, Japan, 2001.
- (56) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 827.
- (57) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
- (58) Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 639.

- (59) Kwong, T. C. *Clin. Chim. Acta* **1985**, *151*, 193.
- (60) Li, B. X.; Zhang, Z. J.; Zhao, L. X. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*, 65.
- (61) Svensson, C. K.; Woodruff, M. N.; Baxter, J. G.; Laika, D. *Clin. Pharmacokinet.* **1986**, *11*, 450.
- (62) Keire, D. A.; Mariappan, S. V. S.; Peng, J.; Rabenstein, D. L. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1059.
- (63) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- (64) Lopicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois, N.; Netter, P. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *25*, 115.
- (65) Marin, M.; Lhiaubet-Vallet, V.; Paris, C.; Yamaji, M.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1474.
- (66) Marin, M.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1788.
- (67) Hochepped, T.; Berger, F. G.; Baumann, H.; Libert, C. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 25.
- (68) Schmid, K. *In The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*; 2nd ed.; Academic Press: New York, 1975; Vol. 1.
- (69) Lentner, C. *Documenta Geigy Scientific Tables. Physical Chemistry. Blood, Somatometric Data*; Ciba Geigy Corporation: West Caldwell, NJ, 1984.
- (70) Carpentier, V.; Midoux, P.; Monsigny, M.; Roche, A. C. *Biol. Cell.* **1993**, *77*, 187.
- (71) Jakab, L.; Kalabay, L. *Acta Microbiol. Immunol. Hung* **1998**, *45*, 409.
- (72) Rolan, P. E.; Muihead, M.; Clarkson, A. R. *Nephron.* **1986**, *42*, 345.
- (73) Weisman, S.; Goldsmith, B.; Winzler, R.; Lepper, M. H. *J. Lab. Clin. Med.* **1961**, *57*, 7.
- (74) Haraldsson, B.; Rippe, B. *Acta Physiol. Scand.* **1987**, *129*, 127.
- (75) Frantz, M.; Jung, M.-L.; Ribereau-Gayon, G.; Anton, R. *Arzneim.-Forsch.* **2000**, *50*, 471.
- (76) Moore, D. F.; Rosenfeld, M. R.; Gribbon, P. M.; Winlove, C. P.; Tsai, C. M. *Inflammation* **1997**, *21*, 69.
- (77) Athamna, A.; Kramer, M. R.; Kahane, I. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1996**, *15*, 135.

- (78) Superti, F.; Marziano, M. L.; Tinari, A.; Donelli, G. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1993**, *16*, 55.
- (79) Su, S.-J.; Yang, B.-C.; Wang, Y.-S.; Yeh, T.-M. *Immunopharmacology* **1999**, *41*, 21.
- (80) Van, M. W.; Libert, C.; Fiers, W.; Brouckaert, P. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 3555.
- (81) Libert, C. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* **1997**, *59*, 515.
- (82) Cheresh, D. A.; Haynes, D. H.; Paul, R. D.; Lopez, D. M.; Silverman, M. A.; Distasio, J. A. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1982**, *23*.
- (83) Cheresh, D. A.; Haynes, D. H.; Distasio, J. A. *Immunology* **1984**, *51*, 541.
- (84) Schmid, K.; Nimberg, R. B.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *492*, 291.
- (85) Schmid, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 60.
- (86) Ceciliani, F.; Pocacqua, V.; Lecchi, C.; Fortin, R.; Rebucci, R.; Avallone, G.; Bronzo, V.; Chelli, F.; Sartorelli, P. *J. Dairy Res.* **2007**, *74*, 374.
- (87) Tamura, K.; Yatsu, T.; Itoh, H.; Motoi, Y. *Jpn. J. Vet. Sci.* **1989**, *51*, 987.
- (88) Kopecky, V.; Ettrich, R.; Hofbauerova, K.; Baumruk, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 41.
- (89) Rojo-Dominguez, A.; Hernandez-Arana, A. *Protein Sequences Data Anal.* **1993**, *5*, 349.
- (90) Kopitar, V. Z.; Weisenberger, H. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1971**, *21*, 859.
- (91) Schmid, K.; Kaufmann, H.; Isemura, S.; Bauer, F.; Emura, J.; Motoyama, T.; Ishiguro, M.; Nanno, S. *Biochemistry* **1973**, *12*, 2711.
- (92) Albani, F.; Riva, R.; Contin, M.; Baruzzi, A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *18*, 244.
- (93) Grimaldi, B.; Hamberger, C.; Tremblay, D.; Barre, J.; Tillement, J. P. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *300*, 445.
- (94) Schley, J.; Mueller-Oerlinghausen, B. *Pharmacopsychiatria* **1983**, *16*, 82.
- (95) Israili, Z. H.; El-Attar, H. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1983**, *33*, 255.
- (96) Walker, J. L.; Clarke, C. R.; Hague, C. M.; Bourne, D. W. A.; Lessley, B. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2392.

- (97) Matsumoto, K.; Sukimoto, K.; Nishi, K.; Maruyama, T.; Suenaga, A.; Otagiri, M. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17*, 300.
- (98) Dass, C. R.; Jessup, W. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 731.
- (99) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- (100) Villiers, A. *Compt. Rendu.* **1891**, *112*, 536.
- (101) Szejtli, J. *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 171.
- (102) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033.
- (103) Schmid, G. *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 244.
- (104) Hedges, R. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035.
- (105) Holland, L.; Rizzi, G.; Malton, P.
- (106) Lezcano, M.; Ai-Soufi, W.; Novo, M.; Rodriguez-Nunez, E.; Tato, J. V. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 108.
- (107) Fujishima, N.; Kusaka, K.; Umino, T.; Urushinata, T.; Terumi, K. Japan, 2001; Vol. 136, p 898.
- (108) Bhardwaj, R.; Dorr, R. T.; Blanchard, J. *Pharm. Sci. Technol.* **2000**, *54*, 233.
- (109) Dufosse, L.; Souchon, I.; Feron, G.; Latrasse, A.; Spinnler, H. E. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 135.
- (110) Anand, R.; Ottani, S.; Manoli, F.; Manet, I.; Monti, S. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 2346.
- (111) Krishnaveni, R.; Ramamurthy, P.; Padma Malar, E. J.; Divya, P. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2012**, *229*, 60.
- (112) Hariharan, M.; Neelakandan, P. P.; Ramaiah, D. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11940.
- (113) Cho, D. W.; Fujitsuka, M.; Sugimoto, A.; Yoon, U. C.; Chod, D. W.; Majima, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 5779.
- (114) Suppan, P. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1990**, *50*, 293.
- (115) Wagner, B. D. *Cyclodextrin Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology*; Elsevier: Toledo, 2006.
- (116) Pal, K.; Chandra, F.; Mallick, S.; Koner, A. L. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2015**, *306*, 47.

- (117) Quaranta, A.; Qu, H.; Vencel, T.; Zhang, Y.; Leibl, W.; Leach, S.; Bensasson, R. V. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *614*, 234.
- (118) Salomatova, V. A.; Pozdnyakova, I. P.; Yanshole, V. V.; Wud, F.; Grivina, V. P.; Bazhina, N. M.; Plyusnina, V. F. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2014**, *274*, 27.
- (119) Bartovsky, P.; Domingo, L. R.; Jornet, D.; Tormos, R.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *525*, 166.
- (120) Ke, C. F.; Yang, C.; Mori, T.; Wada, T.; Liu, Y.; Inoue, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6675.
- (121) Qiu, H. B.; Yang, C.; Inoue, Y.; Che, S. N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1793.
- (122) Yan, C.; Nishijima, M.; Nakamura, A.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4357.
- (123) Yang, C.; Fukuhara, G.; Nakamura, A.; Origane, Y.; Fujita, K.; Yuan, D. Q.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, *173*, 375.
- (124) Yang, C.; Mori, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5786.
- (125) Yang, C.; Nakamura, A.; Fukuhara, G.; Origane, Y.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3126.
- (126) Yang, C.; Nakamura, A.; Wada, T.; Inoue, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3005.
- (127) Fukuhara, G.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *Chem. Commun.* **2005**, 4199.
- (128) Fukuhara, G.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8233.
- (129) Lu, R. H.; Yang, C.; Cao, Y. J.; Tong, L. H.; Jiao, W.; Wada, T.; Wang, Z. Z.; Mori, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7695.
- (130) Yang, C.; Mori, T.; Wada, T.; Inoue, Y. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 697.
- (131) Koodanjeri, S.; Joy, A.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7003.
- (132) Koodanjeri, S.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9229.
- (133) Natarajan, A.; Wang, K.; Ramamurthy, V.; Scheffer, J. R.; Patrick, B. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1443.
- (134) Koodanjeri, S.; Pradhan, A. R.; Kaanumalle, L. S.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3207.
- (135) Syamala, M. S.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7223.
- (136) Syamala, M. S.; Rao, B. N.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7234.

- (137) Fendler, J. H. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1485.
- (138) Balasubramanian, D.; Kumar, C. *Water-in-Oil Microemulsions: Structural Features and Application as Biological Models, in Solution Behaviour of Surfactants.*; Plenum Press: New York, 1982; Vol. 2.
- (139) Nigam, S.; Belletete, M.; Sarpal, R. S.; Durocher, G. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **1995**, *91*, 2133.
- (140) Quina, F. H.; Alonso, E. O.; Farah, J. P. S. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11708.
- (141) Witte, F. M.; Engberts, J. B. F. N. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4767.
- (142) Chechik, V. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2006**, *102*, 357.
- (143) Chechik, V. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2007**, *103*, 352.
- (144) Chechik, V. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2008**, *104*, 331.
- (145) Onel, L.; Buurma, N. J. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2009**, *105*, 363.
- (146) Onel, L.; Buurma, N. J. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2010**, *106*, 344.
- (147) Buurma, N. J. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2011**, *107*, 328.
- (148) Buurma, N. J. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B: Org. Chem.* **2012**, *108*, 316.
- (149) Satnami, M. L.; Dhritlahre, S.; Nagwanshi, R.; Karbhal, I.; Ghosh, K. K.; Nome, F. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 16759.
- (150) Faria, A. C.; Mello, R. S.; Orth, E. S.; Nome, F. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2008**, *289*, 106.
- (151) Campos-Rey, P.; Cabaleiro-Lago, C.; Herves, P. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14004.
- (152) Pastoriza-Gallego, M. J.; Bravo-Diaz, C. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 390.
- (153) Lee, J. J.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2009**, 1962.
- (154) Tascioglu, S. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11113.
- (155) Arumugam, S.; Vutukuri, D. R.; Thayumanavan, S.; Ramamurthy, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13200.
- (156) Scaiano, J. C.; Albuin, E. B.; Stewart, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5673.

(157) Fedler, J. H.; Fendler, E. J.; Infante, G. A.; Shih, P. S.; Larry, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 89.

(158) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Andreu, I.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 9327.

(159) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2013**, 15, 298.

Capítulo 2. Objetivos

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el uso de microambientes para profundizar en los mecanismos de reacción por los que los fármacos carprofeno, ciamemazina y clorpromazina producen reacciones fototóxicas y/o fotoalérgicas en pacientes. Para ello se ha investigado la fotoquímica y la fotofísica de los citados fármacos y de algunos derivados en medios biomiméticos (proteínas, ciclodextrinas y micelas). Con ese fin se han utilizado técnicas espectroscópicas como fotólisis de destello láser y fluorescencia.

Los objetivos concretos de la tesis son los siguientes:

- A) Estudiar la fotoquímica del éster metílico del carprofeno (**CPFMe**, 2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoato de metilo) en presencia de proteínas transportadoras (ASB y AGAB), con especial interés en la posible estereodiferenciación en la unión fotoquímica covalente a las mismas, como origen de procesos fotoalérgicos.
- B) Profundizar en los procesos fotofísicos que ocurren tras irradiación de carprofeno (**CPF**) con el fin de proponer un mecanismo de reacción para la fotodeshalogenación. Para ello, se han sintetizado diadas diastereoméricas basadas en dos unidades de **CPF** unidas covalentemente.
- C) Investigar la fotofísica de los enantiómeros (+) y (-) de ciamemazina (**CMZ**) en medios biomiméticos (AGAs, β - y γ -CD, SDS) con el fin de profundizar en el mecanismo de formación del fotoproducto responsable de sus reacciones fototóxicas.
- D) Investigar si los metabolitos de la clorpromazina (**CPZ**) mono y didesmetilado (**CPZ-MD** y **CPZ-DD**) que mantienen el mismo cromóforo también poseen propiedades fototóxicas como el fármaco de partida. Para ello se determinará su afinidad por proteínas transportadoras y se seguirá los procesos de fotodeshalogenación y fotooxidación en estos medios mediante fotólisis de destello láser.

Capítulo 3. Estereodiferenciación en la unión covalente del éster metílico del carprofeno a proteínas inducida por luz

3.1. Introducción

Algunos fármacos tienen la capacidad de producir cambios en la sensibilidad de un sujeto con respecto a la radiación UV-Vis, bien sea de origen solar o artificial. Este fenómeno de fotosensibilización ocurre cuando el fármaco fotoexcitado es capaz de interactuar con componentes celulares del organismo, especialmente en la piel.¹

En ese contexto, el carprofeno (**CPF**, ácido (*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoico, es un antiinflamatorio no esteroideo (AINES, Figura 3.1) de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos, capaz de producir fotoalergia que se manifiesta como fotodermatitis por contacto. Los efectos fueron observados tanto en trabajadores que fabricaban el propio fármaco como en pacientes que se encontraban bajo tratamiento.²⁻⁸ Además, el **CPF** es un fotosensibilizador exógeno que combinado con la luz UVA es capaz de producir rupturas simples de las cadenas de ADN (SB) así como dímeros ciclobutano pirimidina (CPD) con dosis donde por sí sólo no es genotóxico ni citotóxico.⁹ A finales de los 90 dejó de administrarse en humanos por motivos comerciales, ya que su producción era más costosa que la de otros miembros de la familia como el ibuprofeno; años más tarde emergió de nuevo para tratamientos veterinarios, principalmente en perros.

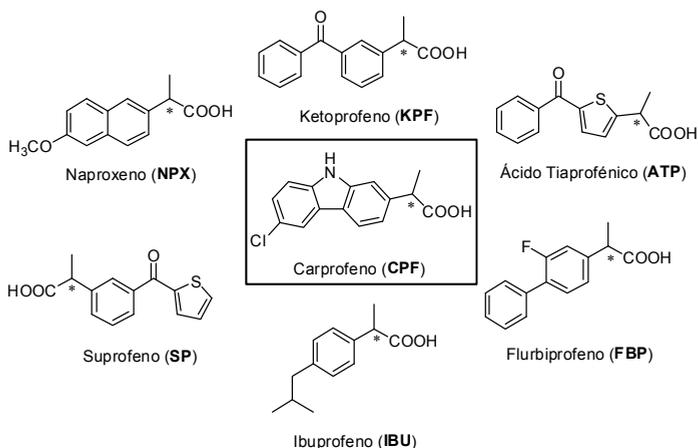


Figura 3.1. Estructuras químicas de algunos fármacos pertenecientes a la familia AINES.

En disolución acuosa, el **CPF** deshalogena, generando radicales altamente reactivos capaces de provocar la ruptura fotosensibilizada de las membranas de los glóbulos rojos; el producto resultante de la deshalogenación es el ácido (*RS*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)propanóico, (**CBZ**, Figura 3.2) que a su vez descarboxila y produce oxígeno singlete.¹⁰

Tras encapsulación en la proteína transportadora ASH, el **CPF** se une de modo estereoselectivo a sitio I y sitio II. Estudios similares con **CPFMe** no resultaron concluyentes debido a su baja solubilidad.¹¹

Una década después, se estudiaron las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete de CPF en presencia de ASH mediante fotólisis de destello láser. Se encontraron dos tiempos de vida para cada enantiómero: para (*R*)-**CPF@ASH** 8.9 y 40 μ s y para (*S*)-**CPF@ASH** 2.3 y 24 μ s. En ambos casos el τ_T más corto se asoció al sitio I (donde **CPF** se desactiva por transferencia electrónica desde el Trp) mientras que el largo se atribuyó al sitio II. El grado de unión se determinó a partir de los factores preexponenciales del ajuste de la cinética de desaparición.¹² En diadas modelo **CPF-Trp** se detectó que ³**CPF*** se desactivaba por transferencia electrónica intramolecular.¹³

Se estudió también la posible fotounión del **CPF** a la proteína. La reacción se monitorizó a través de los cambios en el espectro de fluorescencia a tiempos crecientes de irradiación, valiéndose del hecho que **CPF** y su fotoproducto **CBZ** tienen rendimientos cuánticos de fluorescencia muy distintos (0.067 y 0.431, respectivamente).¹⁰

Tras eliminación de productos y reactivos no unidos covalentemente a la proteína por tratamiento con cloruro de guanidinio (GndCl) y filtrado con sephadex, el espectro de fluorescencia evidenció la formación de un fotoaducto. Ello apunta al papel relevante del **CPF** en un proceso fotoalérgico.¹²⁻¹⁴ Los enantiómeros (*R*)- y (*S*)-**CPF** mostraron un comportamiento diferente indicando estereodiferenciación en la fotounión.

En este capítulo se ha estudiado la fotoquímica del éster metílico del caprofeno (**CPFMe**, Figura 3.2) que puede considerarse un profármaco de CPF (como ocurre con **FBPMe**^{15,16} y **NPXMe**¹⁷), en presencia de ASB y AGAB.

3.2.2 Comportamiento fotofísico de complejos CPFMe@proteína

Antes de abordar los estudios fotofísicos en proteína se intentó caracterizar el comportamiento del **CPFMe** en PBS. Sin embargo, ello no fue posible por problemas de solubilidad en medio acuoso, por lo que se utilizó acetonitrilo como disolvente en lugar de PBS. Como era de esperar, los espectros de absorción de los dos enantiómeros resultaron ser idénticos, con máximos a 239, 299, 330 y 343 nm (Figura 3.4).

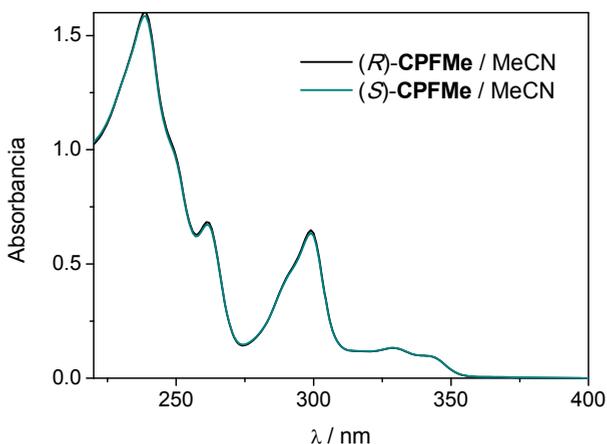


Figura 3.4. Espectros de absorción de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**, [**CPFMe**] = 3.3×10^{-5} M en acetonitrilo/aire.

Los espectros de absorción de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en presencia de albúmina sérica bovina (ASB) mostraron un ligero desplazamiento batocrómico de las bandas, que presentaron máximos a 300, 332 y 346 nm (Figura 3.5). El enantiómero (*S*)-**CPFMe** presentó menor afinidad por ASB, como indica la menor absorción observada en la zona de 300 nm.

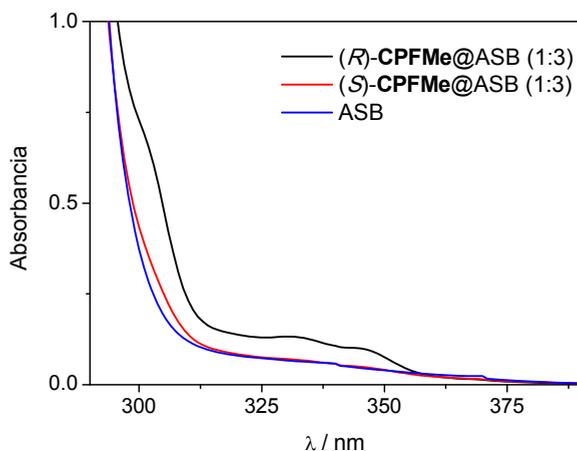


Figura 3.5. Espectros de absorción de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**, ($[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$) en presencia de tres equivalentes de ASB. Disolvente: PBS.

En presencia de α_1 -glicoproteína ácida bovina (AGAB) se observó también un ligero desplazamiento de las bandas, con máximos a 300, 334 y 348 nm (Figura 3.6). En esta ocasión la absorbancia de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** fue similar, indicando afinidad similar por esta proteína.

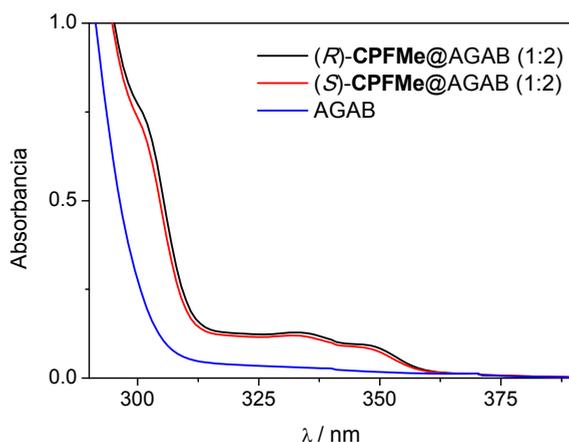


Figura 3.6. Espectros de absorción de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**, ($[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$) en presencia de dos equivalentes de AGAB. Disolvente: PBS.

La fluorescencia en estado estacionario de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en MeCN mostró dos máximos a 355 y 370 nm (Figura 3.7).

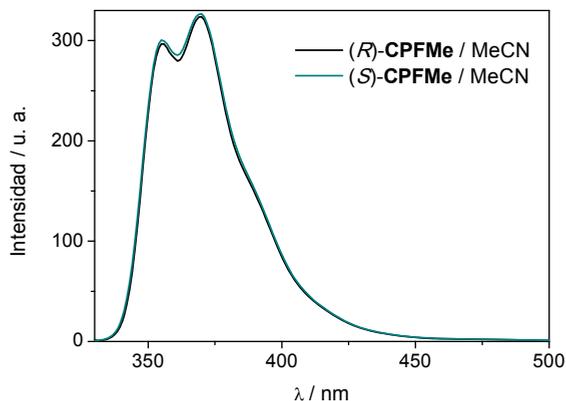


Figura 3.7. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**, ($[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5}$ M) en MeCN/aire.

En presencia de ASB, los máximos se desplazaron ligeramente hacia longitudes de onda mayores (359 y 371 nm). La menor afinidad de (*S*)-**CPFMe** por ASB observada en los espectros de absorción se traduce en una menor emisión, ya que la parte no complejada que permanece en PBS no se encuentra disuelta y por tanto no emite (Figura 3.8).

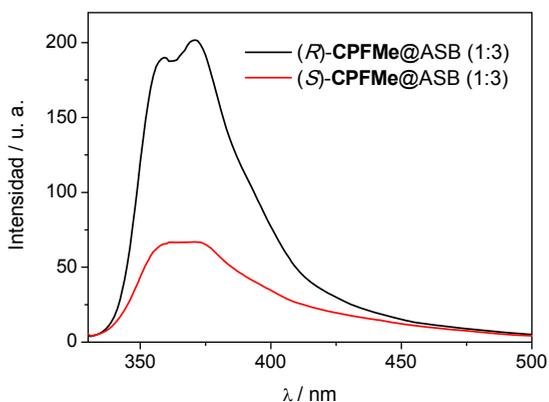


Figura 3.8. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**, ($[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5}$ M) en presencia de tres equivalentes de ASB. Disolvente: PBS.

En cambio, en AGAB ambos enantiómeros mostraron espectros de fluorescencia similares con máximos de emisión a 360 y 375 nm (Figura 3.9).

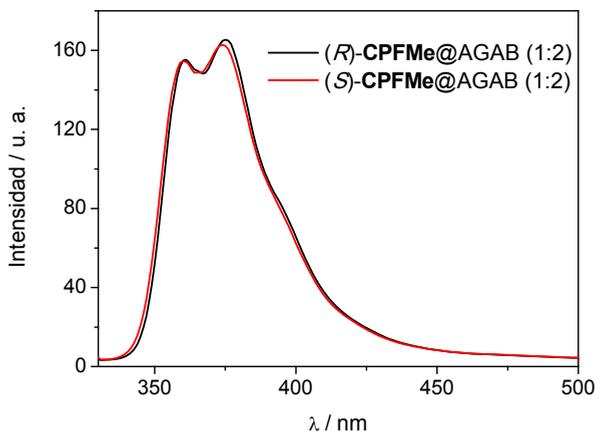


Figura 3.9. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$) de (*R*)- y (*S*)-CPFMe, $[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ en presencia de dos equivalentes de AGAB. Disolvente: PBS.

Además se realizaron medidas de tiempo de vida de fluorescencia para (*R*)- y (*S*)-CPFMe@AGAB (1:2) (Figura 3.10).

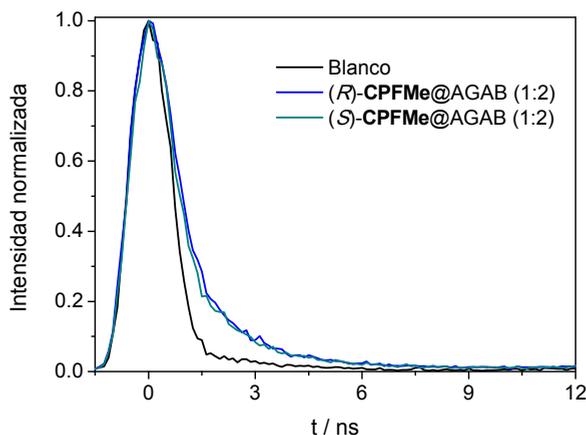


Figura 3.10. Cinéticas de desaparición del estado excitado singlete para los complejos (*R*)- y (*S*)-CPFMe@AGAB (1:2) ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, aire). $[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$. Disolvente: PBS.

Los τ_F obtenidos tras excitación a 340 nm (donde sólo absorbe **CPFMe**) fueron idénticos para ambos complejos, no se observó estereodiferenciación. El valor preciso de los tiempos no se pudo determinar debido a estar dentro del error experimental de la lámpara.

En los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL), el espectro de absorción transitoria fue registrado nuevamente en MeCN (Figura 3.11) por problemas de solubilidad. El compuesto mostró una banda de absorción con máximo a 430 nm, asignado al estado excitado triplete.

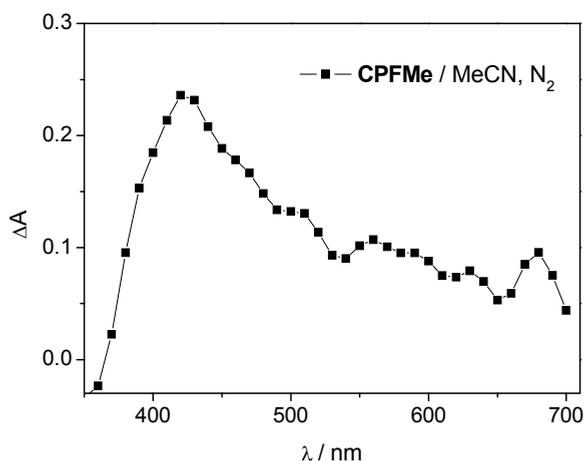


Figura 3.11. Espectro de absorción transitoria de $[\text{CPFMe}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ en MeCN/ N_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$) registrado $1 \mu\text{s}$ después del pulso del láser.

El ajuste monoexponencial de la cinética de desaparición permitió determinar un tiempo de vida del estado excitado triplete de $3.2 \mu\text{s}$ (Figura 3.12).

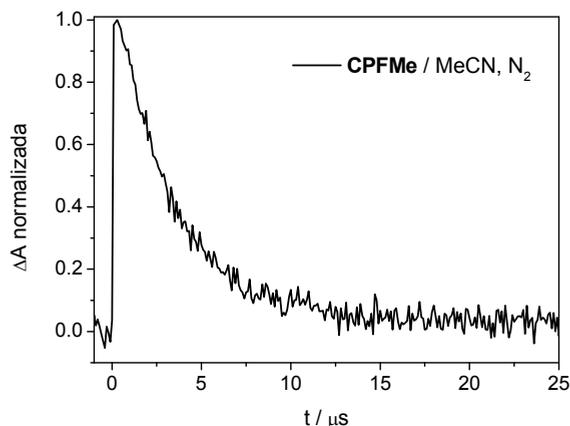


Figura 3.12. Cinética de desaparición de la señal a 430 nm ($\lambda_{exc} = 308$ nm) para $[CPFMe] = 4 \times 10^{-5}$ M en MeCN/N₂.

En presencia de proteínas se produce un desplazamiento de la banda hacia λ mayores (respecto a MeCN), por lo que se puede utilizar una λ_{exc} de 355 nm.

A continuación se investigó el comportamiento de (*R*)- y (*S*)-CPFMe en ASB. Las cinéticas de desaparición de (*R*)-CPFMe@ASB y (*S*)-CPFMe@ASB a relación molar 1:3 ($[CPFMe] = 3.3 \times 10^{-4}$ M), se obtuvieron excitando a 355 nm y monitorizando a 430 nm en atmósfera de nitrógeno (Figura 3.13).

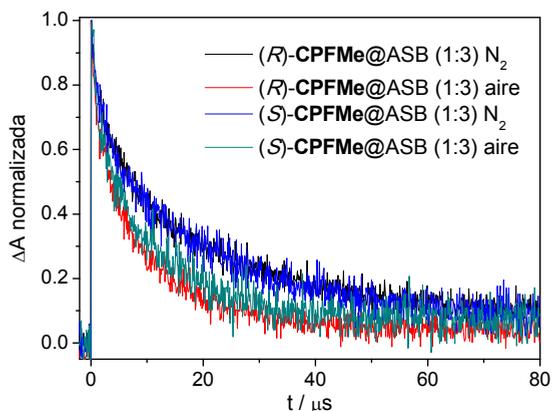


Figura 3.13. Cinéticas de desaparición de la señal a 430 nm ($\lambda_{exc} = 355$ nm) en aire y N₂ para (*R*)- y (*S*)-CPFMe en presencia de ASB (1:3) de relación molar. Disolvente: PBS.

En cada caso, para obtener τ_{τ} fue necesaria una ecuación con dos términos monoexponenciales, indicando dos sitios de unión en ASB, uno corto que se asoció al sitio I por ser donde se encuentra el residuo de Trp y por tanto se produce transferencia electrónica y otro largo asignado al sitio II (valores en Tabla 3.1) como sucedió en el caso de **CPF**.¹² Se observó una desactivación similar por oxígeno, para los dos sitios de unión y en ambos enantiómeros, por lo que no se detectó estereodiferenciación entre las cinéticas en presencia de ASB.

Tabla 3.1. Tiempos de vida de triplete para (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en presencia de ASB (1:3) de relación molar, en atmósfera de nitrógeno y aire.

	τ_I (μs) / N_2	τ_{II} (μs) / N_2	τ_I (μs) / aire	τ_{II} (μs) / aire
(<i>R</i>)- CPFMe @ASB (1:3)	2.4	20.8	0.7	9.7
(<i>S</i>)- CPFMe @ASB (1:3)	2.0	21.4	0.8	11.0

τ_I y τ_{II} (en sitio I y II de la ASB respectivamente)

Se realizaron experimentos similares en AGAB. En el espectro de absorción transitoria de (*R*)-**CPFMe**@AGAB (1:2) en aire, se observa una banda ancha entre 300 y 600 nm con máximo a 430 nm, asignado a ³**CPFMe*** (Figura 3.14).

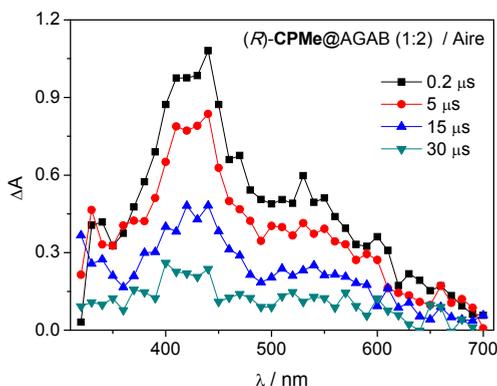


Figura 3.14. Espectros de absorción transitoria de (*R*)-**CPFMe** en presencia de dos equivalentes de AGAB ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, aire). Disolvente: PBS.

Las cinéticas a 430 nm y a 530 nm resultaron coincidentes (Figura 3.15), lo que indicó que se trataba de la misma especie transitoria, y se ajustaron con una función monoexponencial, lo que indicó un único sitio de unión.

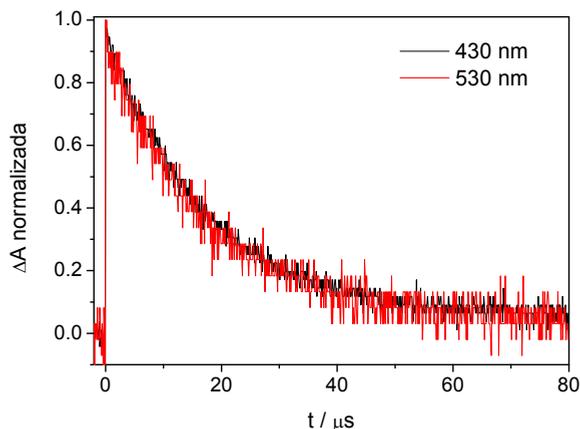


Figura 3.15. Cinéticas de desaparición monitorizadas a $\lambda = 430$ y 530 nm para (R)-**CPFMe@AGAB** (1:2) a $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm. Disolvente: PBS.

Se observó estereodiferenciación en las cinéticas de desaparición de (R)-**CPFMe@AGAB** y (S)-**CPFMe@AGAB** (1:2) ($[\text{CPFMe}] = 3.3 \times 10^{-4}$ M) tanto en atmósfera aeróbica como en nitrógeno (Figura 3.16); el menor valor de τ_T para el (S)-**CPFMe** puede deberse a que se encuentre más próximo a Trp que (R)-**CPFMe** y por transferencia electrónica se produzca una desactivación más eficiente (valores en Tabla 3.2).

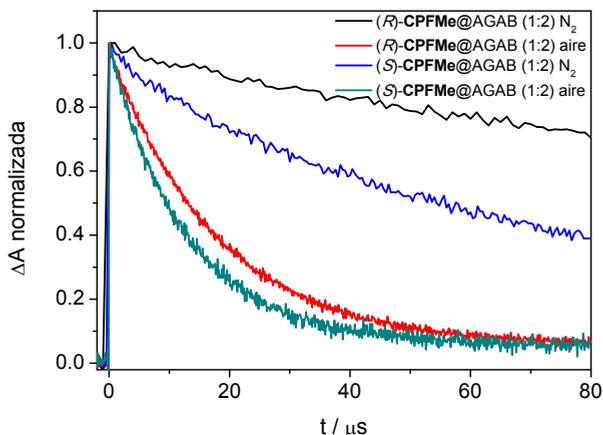


Figura 3.16. Cinéticas de desaparición de la señal a 430 nm ($\lambda_{exc} = 355$ nm) en aire y nitrógeno para (R)- y (S)-**CPFMe@AGAB** (1:2). Disolvente: PBS.

Tabla 3.2. Tiempos de vida de triplete para los enantiómeros (R)- y (S)-**CPFMe** en presencia de AGAB (1:2) de relación molar, en atmósfera de nitrógeno y aire.

	τ_u (μ s) / N ₂	τ_u (μ s) / aire
(R)- CPMe@AGAB (1:2)	243.0	17.8
(S)- CPMe@AGAB (1:2)	71.5	13.0

τ_u (unido a AGAB)

3.2.3 Irradiaciones en medio proteico

Puesto que la complejación en ASB no era cuantitativa, la fotoquímica de (R)- y (S)-**CPFMe** se investigó únicamente en AGAB. Así, (R)- y (S)-**CPFMe** se irradiaron a $\lambda_{irr} = 320$ nm en presencia de AGAB (1:2) y se compararon sus espectros de fluorescencia a 0 y 15 minutos de irradiación (Figura 3.17).

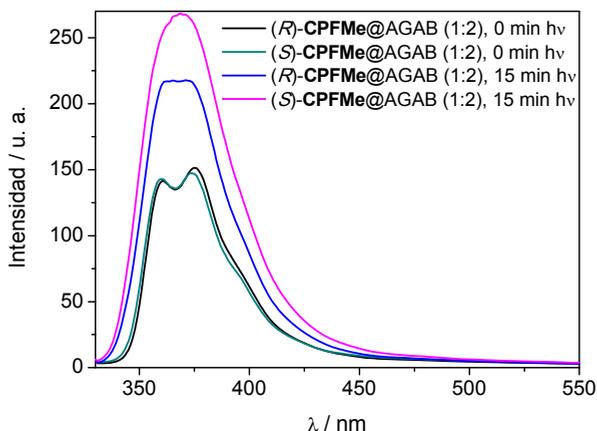


Figura 3.17. Espectros de fluorescencia de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en presencia de AGAB (2 eq.) antes y después de ser irradiados. [**CPFMe**] = 3.3×10^{-5} M y $\lambda_{exc} = 320$ nm. Disolvente: PBS.

En AGAB, la emisión inicial correspondiente a **CPFMe** aumentó de modo significativo tras 15 minutos de irradiación, ya que el fotoproducto formado (**CBZMe**) tiene un ϕ_F mayor y no presenta estructura fina. Posteriormente, para comprobar si se había producido unión covalente a la proteína, se llevó a cabo un tratamiento con GndCl 6M y posterior filtrado con sephadex (Parte experimental). Ello permitió eliminar las especies no unidas covalentemente a la proteína. En paralelo, muestras de **CPFMe@AGAB** no irradiadas se sometieron a este mismo tratamiento, y como era de esperar no mostraron emisión, lo que confirmó que el proceso permite la eliminación completa de los cromóforos no unidos covalentemente (Figura 3.18).

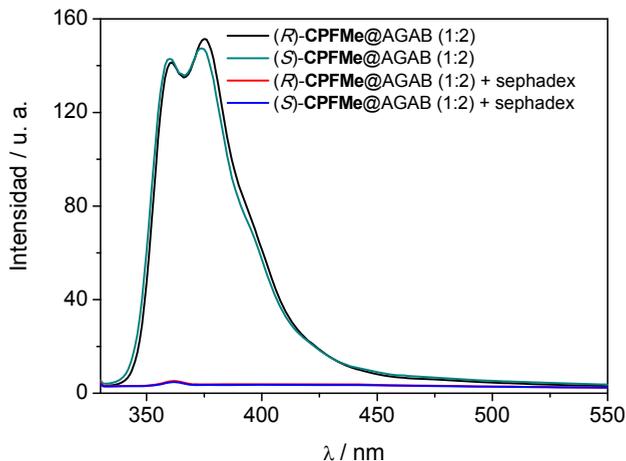


Figura 3.18. Espectros de fluorescencia de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en presencia de AGAB (2 eq.) no irradiados antes y después de tratamiento con GndCl y filtrado a través de sephadex. [CPFMe] = 3.3×10^{-5} M y $\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm. Disolvente: PBS.

En el caso de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe**@AGAB (1:2), irradiados 15 minutos y tratados con GndCl y sephadex, las muestras mostraron una fluorescencia sin estructura fina (Figura 3.19).

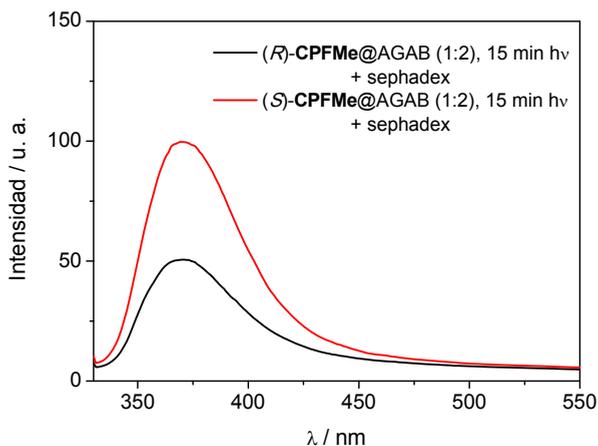
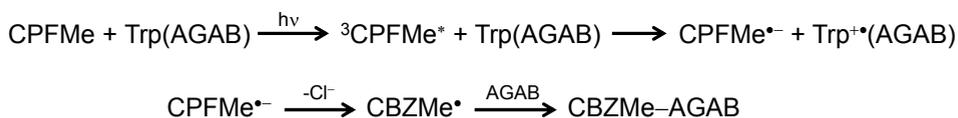


Figura 3.19. Espectros de fluorescencia (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en presencia de AGAB (2 eq.) tras 15 min de irradiación, tratados con GndCl y filtrados a través de sephadex. [CPFMe] = 3.3×10^{-5} M y $\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm. Disolvente: PBS.

Es decir, (S)-**CPFMe** se une en mayor grado a AGAB. Como la deshalogenación implica la participación del estado excitado triplete que por transferencia electrónica da lugar al correspondiente radical, ello estaría de acuerdo con los resultados de FDL, donde con el menor tiempo de vida de triplete del enantiómero (S)-**CPFMe** indica que está más cerca del triptófano; por tanto su fotoproducto (S)-**CBZMe** se une en mayor extensión a la proteína que en el caso de (R)-**CBZMe**. Así pues, la proteína y concretamente el residuo de Trp llevaría a cabo el papel de dador de electrones como explica el siguiente mecanismo:



3.3 Conclusiones

Se ha investigado el comportamiento fotofísico y fotoquímico de (R)- y (S)-**CPFMe** en presencia de ASB y AGAB. En ASB, para cada enantiómero, la presencia de dos términos monoexponenciales en el ajuste de la desaparición del triplete se asocia con la complejación del profármaco en los dos sitios de unión de la proteína. El tiempo de vida menor se asocia al sitio I, teniendo en cuenta que **CPFMe** se desactiva por el Trp presente en ese sitio de la proteína por transferencia electrónica mientras que **CPFMe** en el sitio II presentó un valor de τ_T mayor. No se observó estereodiferenciación. En AGAB, los experimentos de FDL revelaron estereodiferenciación. La diferencia fue más acusada en atmósfera de nitrógeno que en aire, con el complejo (S)-**CPFMe**@AGAB (1:2) con τ_T menor.

De los experimentos de fotólisis en estado estacionario de (R)- y (S)-**CPFMe** en AGAB (1:2) se observó que hubo unión covalente tras 15 minutos de irradiación a $\lambda_{\text{irr}} = 320$ nm, siendo mayor el grado de fotounión para (S)-**CBZMe**. Ello apunta a que el enantiómero (S) se encuentra más cercano al residuo de Trp en la cavidad de la proteína AGAB y se relaciona con su menor valor de τ_T .

3.4 Procedimiento experimental

3.4.1 Reactivos y disolventes

Carprofeno racémico (**CPF**, ácido (*RS*)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il) propanóico), ASB, AGAB y cloruro de guanidinio fueron adquiridos comercialmente. Metanol y ácido sulfúrico fueron de grado analítico; otros disolventes (acetonitrilo, metil tert-butiléter, acetato de etilo y ácido acético) fueron grado HPLC. Las disoluciones de PBS (0.01 M, pH = 7.4) fueron preparadas disolviendo las pastillas comerciales en la cantidad apropiada de agua desionizada. Las columnas para filtrado por tamaño G-25 Sephadex (PD10) fueron adquiridas comercialmente.

3.4.2 Obtención de (*R*)- y (*S*)-CPFMe

En primer lugar, los enantiómeros (*R*)- y (*S*)-**CPF** se separaron de una mezcla racémica 1.8 M en metil tert-butiléter mediante HPLC (columna semipreparativa Kromasil 100-TBB, fase móvil hexano/metil tert-butiléter/ácido acético 45:55:0.1, v/v/v y flujo 2.2 mL/min).

Posteriormente, a una suspensión de (*R*)- o (*S*)-**CPF** puros (50 mg, 0.18 mmol) en MeOH (5 mL) se añadieron 5 gotas de H₂SO₄. La mezcla se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Tras evaporar el MeOH, el residuo se recogió en AcOEt y se hicieron lavados con NaHCO₃ (3 x 20 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el disolvente hasta la obtención cuantitativa de los deseados ésteres (*R*)- o (*S*)-**CPFMe**, sólidos blancos con un rendimiento del 95%.

3.4.3 Medidas de absorción

Los experimentos se realizaron en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm con capacidad máxima de 4 mL, a 22°C. La concentración de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** fue de 3.3×10^{-5} M para posteriores medidas en fluorescencia y de 3.3

$\times 10^{-4}$ M para medir con FDL. Los equipos empleados se describen en el capítulo de instrumentación.

3.4.4 Medidas de fluorescencia

Los experimentos se realizaron en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm con capacidad máxima de 4 mL, a 22°C y en atmósfera aeróbica. La concentración de (R)- y (S)-**CPFMe** fue de 3.3×10^{-5} M a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 320$ nm). Los equipos empleados se describen en el capítulo de instrumentación.

3.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser

Las medidas de FDL se realizaron a temperatura ambiente y la absorbancia de las muestras se fijó a 0.3 a la longitud de onda de excitación del láser (355 nm). La potencia de trabajo fue de 15 mJ por pulso. Se utilizaron celdas de cuarzo de dimensiones 10 x 10 mm² y 4 mL de capacidad máxima. Las cinéticas de desaparición se monitorizaron a 430 nm. El τ_T de **CPFMe** en ASB y AGAB se determinó por ajuste a una ecuación biexponencial (Ecuación 3.1) y monoexponencial (Ecuación 3.2) respectivamente.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_I e^{(t/\tau_I)} + A_{II} e^{(t/\tau_{II})} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_u e^{(t/\tau_u)} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

3.4.6 Irradiación de CPFMe@proteína

Las disoluciones de (R)- y (S)-**CPFMe** de concentración 3.3×10^{-5} M en presencia de proteína se irradiaron a través de cuarzo con luz monocromática de 320 nm. El curso de las reacciones fue monitorizado por los cambios en los espectros de emisión.

3.4.7 Tratamiento con GndCl y filtrado sephadex

A 3 mL de disolución de (*R*)- o (*S*)-**CPFMe** en PBS en presencia de AGAB (2 eq.) se añadieron 1.72 g de GndCl 6 M, con el fin de causar la desnaturalización de la proteína. Posteriormente, la mezcla se filtró mediante una columna P-10 de Sephadex. En primer lugar, se hizo pasar PBS (25 mL), y tras enrasar se añadieron 2.5 mL de la mezcla **CPFMe@AGAB** GndCl. Tras enrasar, se eluyó con 3.5 mL de PBS. De la muestra final se midió su absorción y su emisión. Para corregir la dilución que sucede al seguir el protocolo, se realizó el experimento directamente con AGAB sin sustrato y se obtuvo un factor entre la absorbancia antes de filtrar y después, que fue aplicado a cada experimento.

3.4.8 Caracterización espectroscópica de (*R*)- y (*S*)-CPFMe

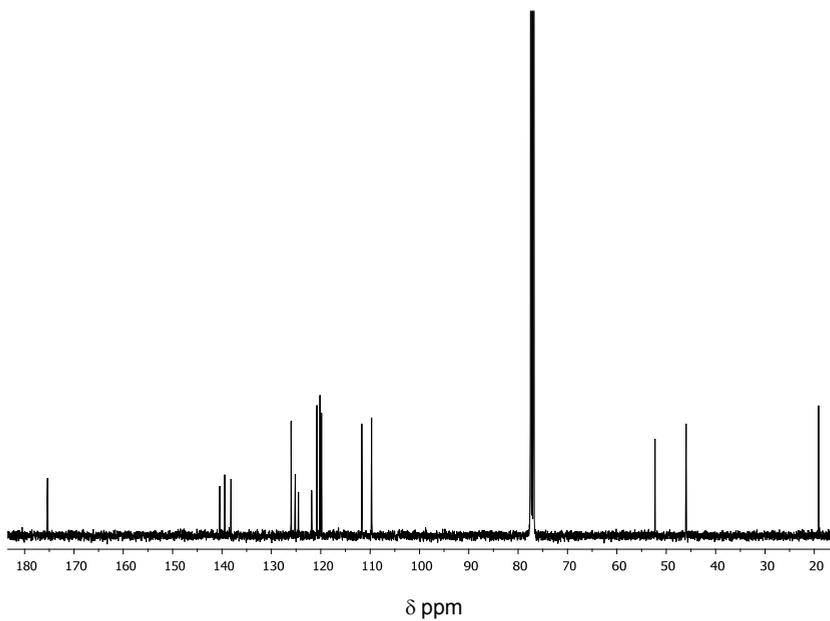
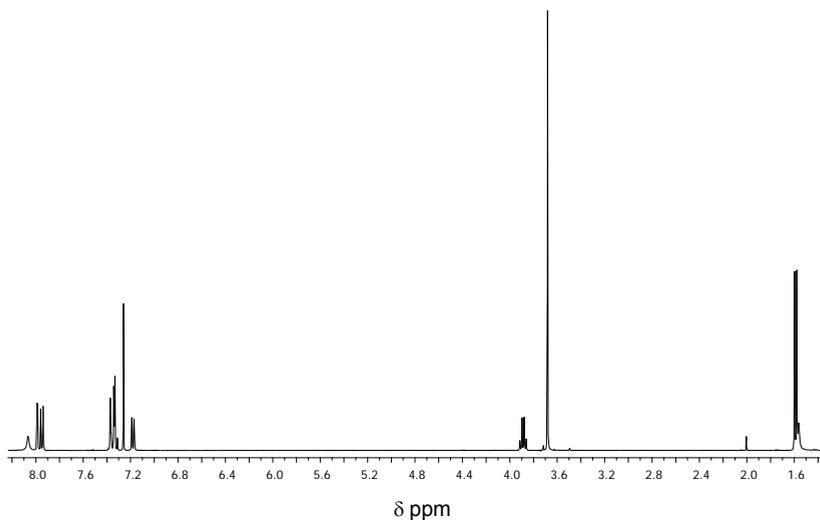
Espectro de absorción UV $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 239 (4.7), 299 (4.3), 330 (3.6) y 343 (3.5).

Espectro RMN-¹H de (*R*)-**CPFMe** (400 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 8.07 (s, 1H), 8.00 – 7.97 (m, 1H), 7.95 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 3H), 7.18 (dd, $J = 8.1$, 1.5 Hz, 1H), 3.91 – 3.86 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.59 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H); **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 175.3, 140.5, 139.5, 138.2, 126.0, 125.2, 124.5, 121.8, 120.8, 120.1, 119.8, 111.7, 109.7, 52.3, 46.0, 19.1; **Masa exacta** calculada para C₁₆H₁₃NO₂³⁵Cl : 286.0635 ([M -H]⁻); encontrada 286.0632.

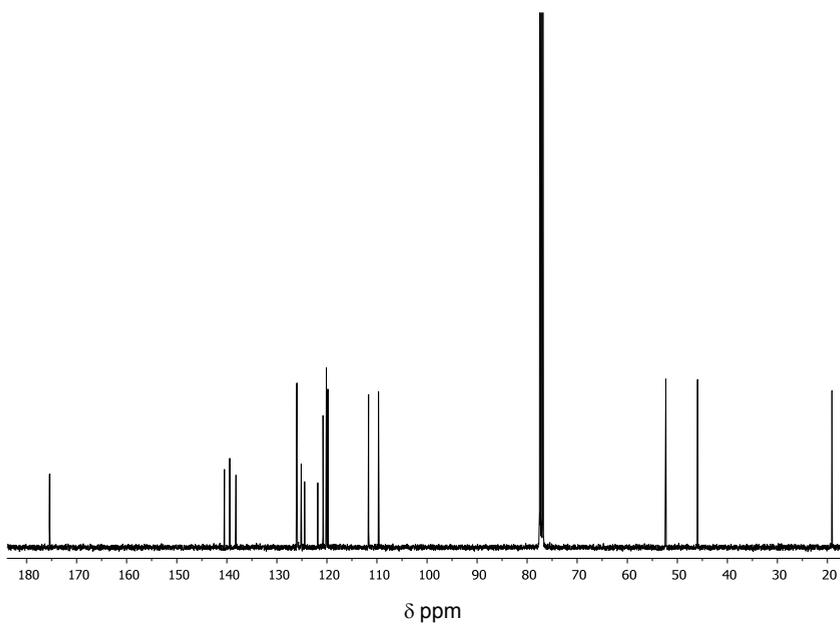
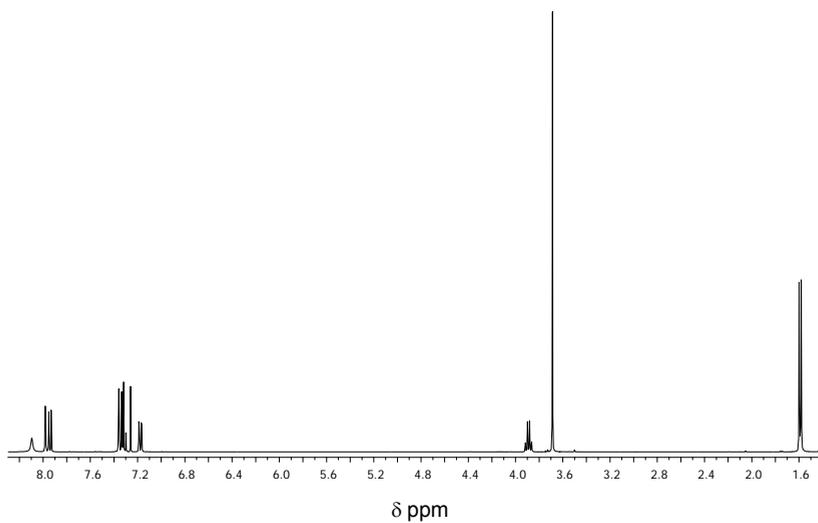
Espectro RMN-¹H de (*S*)-**CPFMe** (400 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 8.10 (s, 1H), 7.99 – 7.97 (m, 1H), 7.94 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 3H), 7.18 (dd, $J = 8.1$, 1.5 Hz, 1H), 3.93 – 3.85 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.59 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H); **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 175.4, 140.5, 139.4, 138.2, 126.0, 125.1, 124.5, 121.8, 120.8, 120.1, 119.8, 111.7, 109.7, 52.3, 46.0, 19.1; **Masa exacta** calculada para C₁₆H₁₃NO₂³⁵Cl : 286.0635 ([M -H]⁻); encontrada 286.0639.

3.4.9 Espectros RMN- ^1H y ^{13}C

Espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de (*R*)-CPFMe (CDCl_3)



Espectros de RMN-¹H y -¹³C de (*S*)-**CPFMe** (CDCl₃)



3.5 Referencias bibliográficas

- (1) Ferguson, J. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2002**, *18*, 262.
- (2) Goh, C. L.; Kwok, S. F. *Dermatologica* **1985**, *170*, 74.
- (3) Holzle, E.; Neumann, N.; Hausen, B.; Przybilla, B.; Schauder, S.; Honigsmann, H.; Bircher, A.; Plewig, G. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1991**, *25*, 59.
- (4) Hoting, E.; Schulz, K. H. *Derm. Beruf Umwelt* **1984**, *32*, 215.
- (5) Kerr, A. C.; Muller, F.; Ferguson, J.; Dawe, R. S. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*.
- (6) Merot, Y.; Harms, M.; Saurat, J. H. *Dermatologica* **1983**, *166*, 301.
- (7) Walker, S.; Ead, R.; Beck, M. *Br. J. Dermatol.* **2006**, *154*, 551.
- (8) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 3rd Edition ed. 2012; Vol. 2, p 1541.
- (9) Robinson, K. S.; Traynor, N. J.; Moseley, H.; Ferguson, J.; Woods, J. A. *Toxicol. In vivo* **2010**, *24*, 1126.
- (10) Bosca, F.; Encinas, S.; Heelis, P. F.; Miranda, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *820*.
- (11) Rahman, M. H.; Maruyama, T.; Okada, T.; Yamasaki, K.; Otagiri, M. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1721.
- (12) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- (13) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Bosca, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- (14) Moser, J.; Bosca, F.; Lovell, W. W.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; Hye, A. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 13.
- (15) Perez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829.
- (16) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694.
- (17) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Andreu, I.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 9327.

(18) Favia, A. D.; Habrant, D.; Scarpelli, R.; Migliore, M.; Albani, C.; Bertozzi, S. M.; Dionisi, M.; Tarozzo, G.; Piomelli, D.; Cavalli, A.; De Vivo, M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8807.

Capítulo 4. Diadas conteniendo dos unidades de carprofeno para profundizar en el mecanismo de fotodeshalogenación de CPFMe

4.1 Introducción

En relación con la fotodeshalogenación de **CPFMe** descrita en el capítulo anterior, se han propuesto una variedad de mecanismos para la fotodeshalogenación de los haluros de arilo,¹⁻⁴ con especial atención al proceso de descloración reductiva.⁵⁻⁹ En el caso de cloroaromáticos, se asume que la reacción tiene lugar desde el estado excitado triplete, aunque a menudo la energía de éste estado excitado es insuficiente para promover una ruptura C-Cl homolítica que daría lugar a radicales arilo y átomos de cloro.^{3,4,10} En este contexto, se ha propuesto la formación de excímeros triplete que estarían involucrados en el mecanismo como un modo de salvar la termodinámica desfavorable de este paso.^{3,4,6,11,12} Sin embargo, no existe una clara prueba experimental que apoye esta hipótesis, en la que habría una relación directa entre el “self-quenching” de los estados excitados triplete observados y la reactividad. Una posible estrategia para obtener evidencias al respecto sería el uso de diadas que contienen dos subunidades idénticas de cloroaromáticos unidos covalentemente por un espaciador. En nuestro caso, el mecanismo propuesto en presencia de proteína (Capítulo 3, p.61) implica que **CPFMe** deshalogena desde el anión radical formado tras transferencia electrónica del Trp. Una diada **CPF-CPF** permitiría investigar la implicación del estado excitado triplete y la transferencia electrónica entre dos unidades de **CPFMe**.

Se sintetizaron las diadas diastereoméricas (*S,R*)-**1** y (*R,R*)-**1** (Figura 4.1). La fotoquímica del **CPF** se haya descrita en literatura, y en ella se apunta a que la deshalogenación reductiva ocurre desde un estado excitado triplete que es detectable.¹³⁻¹⁵ En este capítulo se ha estudiado la fotoquímica y fotofísica de (*S,R*)-**1** y (*R,R*)-**1** y se han comparado los resultados con los obtenidos para **CPFMe** (Figura 4.1).

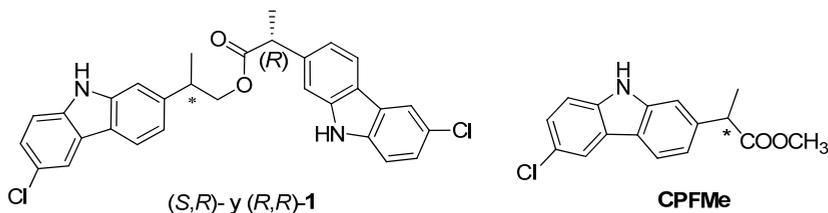


Figura 4.1. Estructuras químicas de las diadas diastereoméricas **1** y de **CPFMe**.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Síntesis de los sustratos

En primer lugar se separaron (S) - y (R) -**CPF** de la mezcla racémica del fármaco comercial por HPLC. A continuación, (S) - y (R) -**CPF** se redujeron por tratamiento con LiAlH_4 a los correspondientes alcoholes, para luego hacerlos reaccionar con (R) -**CPF** y obtener los ésteres (S,R) -1 y (R,R) -1 (Figura 4.2) todo ello detallado en el procedimiento experimental de este capítulo.

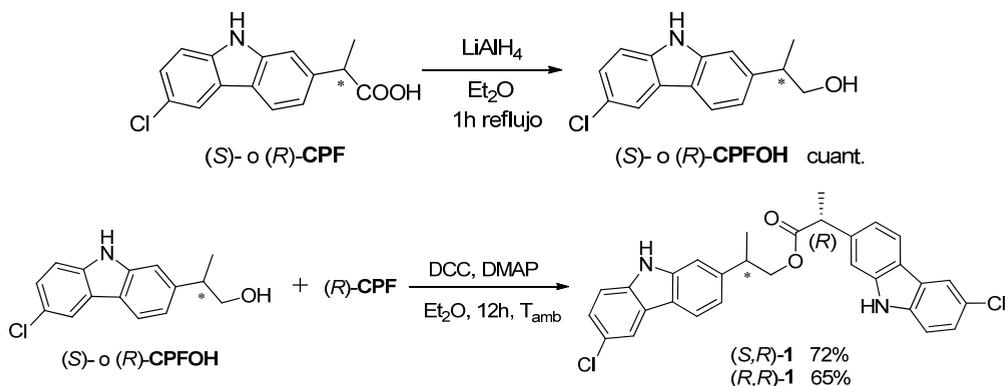


Figura 4.2. Síntesis de (S,R) -1 y (R,R) -1.

4.2.2 Reactividad fotoquímica

Para estudiar la cinética de la fotoreacción de los compuestos (S,R) - y (R,R) -1, éstos se disolvieron en MeCN (10^{-4} M) y se irradiaron en un fotorreactor multilámpara ($\lambda_{\text{max}} = 300$ nm) en atmósfera de N_2 . El curso de la reacción fue

seguido por HPLC (fase reversa, MeCN/H₂O 80:20 v/v como eluyente). Los cromatogramas de los crudos de irradiación obtenidos a distintos tiempos se muestran en la Figura 4.3.

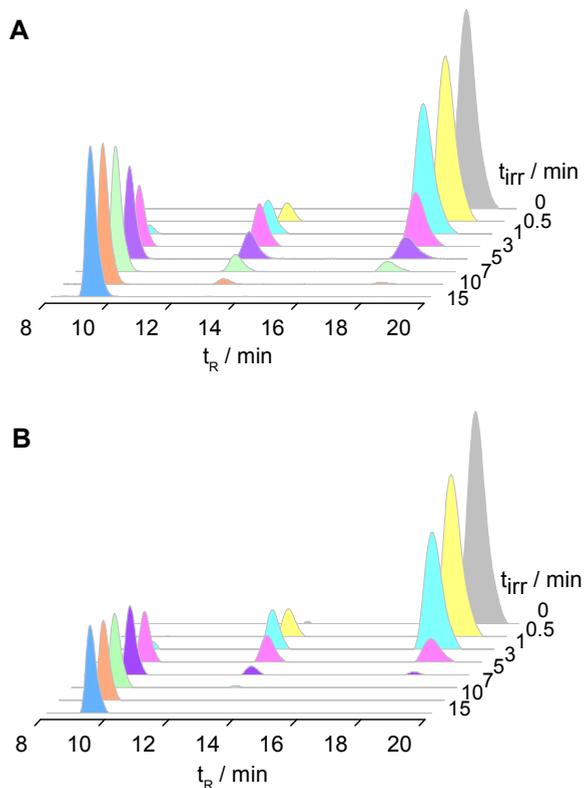


Figura 4.3. Cromatogramas obtenidos durante la irradiación ($\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$, MeCN/N₂, 10^{-4} M) a (S,R)-1 (A) y (R,R)-1 (B).

El producto de partida ($t_R = 18 \text{ min}$) reaccionó hasta que desapareció por completo tras 15 minutos de irradiación. A tiempos cortos de irradiación apareció un primer fotoproducto ($t_R = 13.5 \text{ min}$), que fue consumido completamente tras irradiación prolongada. Esto fue acompañado con la formación de un segundo fotoproducto ($t_R = 9 \text{ min}$), que apareció a tiempos mayores que el primer fotoproducto y que permaneció como el único componente final de la irradiación en ambos casos. Se observó también que la velocidad de reacción de (R,R)-1 fue mayor que para (S,R)-1. Los compuestos con $t_R = 13.5$ y 9 min fueron aislados y

caracterizados completamente como se detalla en la parte experimental. El valor de MH^+ encontrado para el ion molecular del primero fue 481 uma, lo que apunta a una monodeshalogenación reductiva de (S,R) - y (R,R) -**1**. En principio, la sustitución de Cl por H puede ocurrir en cualquiera de los anillos de carbazol, por lo que pueden formarse dos regioisómeros diferentes con patrones espectroscópicos similares. La estructura química de este fotoproducto fue asignada inequívocamente como (S,R) - y (R,R) -**2**, ya que tras metanólisis ácida se detectó la masa correspondiente al **CPFMe** ($M^{+*} = 287$ uma) (Figura 4.4).

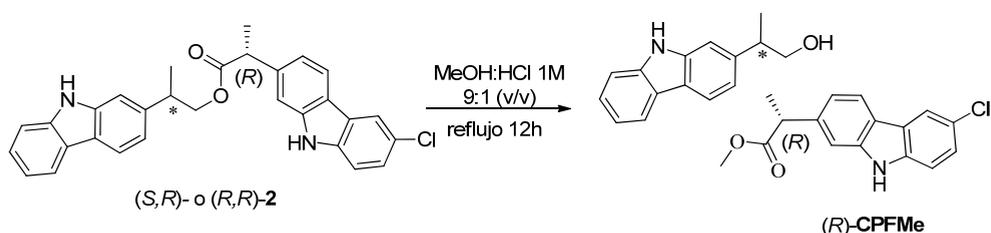


Figura 4.4. Esquema de la metanólisis ácida de (S,R) - o (R,R) -**2**.

Igualmente, la estructura química del fotoproducto con $t_R = 9$ min fue asignada como (S,R) -**3** (Figura 4.5) basándose en su EM ($MH^+ = 447$ uma) y datos de RMN.

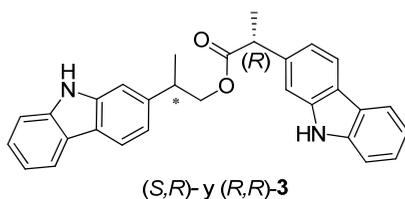


Figura 4.5. Estructura química de las diadas diastereoméricas **3**.

Por tanto, (S,R) - y (R,R) -**2** resultan de una deshalogenación inicial y son formados y consumidos durante el curso de la reacción, mientras que (S,R) - y (R,R) -**3** son el resultado de una doble deshalogenación y se obtienen a partir de (S,R) - y (R,R) -**2**, ya que la fotólisis directa de (S,R) -**2** bajo las mismas condiciones

dio lugar a (S,R) -**3** de modo cuantitativo (Figura 4.6). El fotoproducto **3** resultó ser fotoestable.

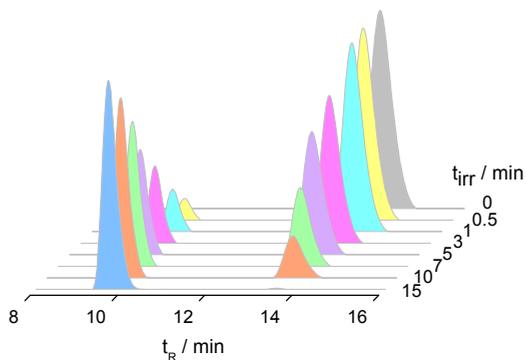


Figura 4.6. Cromatogramas obtenidos durante la irradiación ($\lambda_{\max} = 300$ nm, MeCN/N₂, 10⁻⁴ M) de (S,R) -**2**.

En la siguiente Figura 4.7 se recoge el proceso de la fotorreacción:

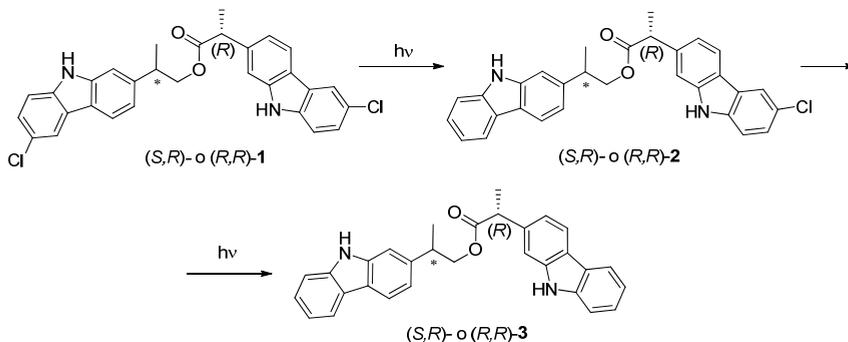


Figura 4.7. Curso de la irradiación de (S,R) - y (R,R) -**1**.

Como referencia se irradió **CPFMe** bajo las mismas condiciones, obteniéndose **CBZMe** como único fotoproducto (Figura 4.8).

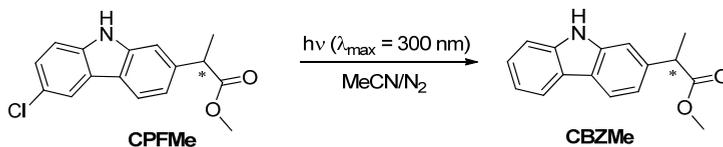


Figura 4.8. Irradiación de **CPFMe**.

A continuación, se investigaron las cinéticas de deshalogenación de **1**, **2** y **CPFMe** a baja concentración (absorbancia de las muestras 0.3), usando luz monocromática ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) hasta conversiones menores al 25%. La distribución de productos a diferentes tiempos se muestra en la Tabla 4.1.

<i>t</i> (s)	<i>(S,R)</i> -1 ^a			<i>(R,R)</i> -1 ^a		
	<i>(S,R)</i> -1	<i>(S,R)</i> -2	<i>(S,R)</i> -3	<i>(R,R)</i> -1	<i>(R,R)</i> -2	<i>(R,R)</i> -3
30	96	4	-	95	5	-
60	95	5	-	93	7	-
280	83	14	3	85	13	2
400	76	19	5	78	19	3

<i>t</i> (s)	<i>(S,R)</i> -2 ^b		<i>(R,R)</i> -2 ^b		CPFMe ^b	
	<i>(S,R)</i> -2	<i>(S,R)</i> -3	<i>(R,R)</i> -2	<i>(R,R)</i> -3	CPFMe	CBZMe
30	98	2	98	2	> 99	< 1
60	93	7	94	6	> 99	< 1
280	80	20	84	16	97	3
400	77	23	81	19	96	4

^a $A_{\text{muestras}} = 0.3$; ^b $A_{\text{muestras}} = 0.1$.

Tabla 4.1. Distribución de productos tras la irradiación monocromática de **1**, **2** y **CPFMe** a diferentes tiempos ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$, MeCN/N₂)

Para la degradación de **1**, el proceso se siguió por HPLC mientras que para **2** y **CPFMe** los cambios en fluorescencia asociados a la reacción de deshalogenación (aumento y desplazamiento de la banda) permitieron seguir el progreso de irradiación directamente por registro de la fluorescencia de los crudos de irradiación.

Los cambios observados en el espectro de fluorescencia durante el curso de la fotoreacción para *(S,R)*-**2** se muestran en la Figura 4.9A. Una representación similar para **CPFMe** se muestra en la Figura 4.9B. La fotorreactividad también fue examinada en un disolvente de menor polaridad como THF. En la Figura 4.9C se representa una comparación entre la cinética de deshalogenación para *(S,R)*-**2** y **CPFMe** en MeCN y THF.

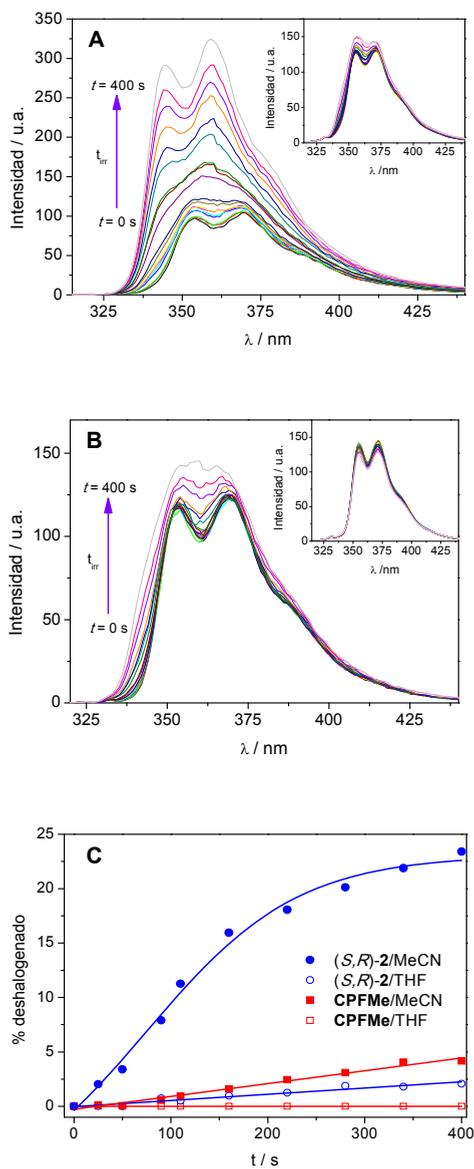


Figura 4.9. **A:** Espectros de fluorescencia obtenidos para (S,R) -2 tras irradiación monocromática a diferentes tiempos ($\lambda_{exc} = 300$ nm) en MeCN/N₂ y THF (Figura interior); **B:** lo mismo para CPFMe; **C:** Porcentaje de deshalogenación para (S,R) -2 y CPFMe en MeCN y THF.

A partir de la Figura 4.9C se puede observar que las diadas **1** y **2** son mucho más reactivas que **CPFMe**, lo que estaría de acuerdo con un mecanismo implicando “self-quenching” que resulta favorecido en sistemas en los que el proceso es intramolecular. Además, el hecho de que la fotodeshalogenación ocurra en mucha menor extensión en THF apoya un mecanismo de transferencia electrónica en el cual hay especies con carga implicadas. Por otra parte, no se observó una estereodiferenciación significativa entre las diadas.

4.2.3 Comportamiento fotofísico

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción UVA-UVB de **1**, **2**, **3**, **CPFMe** y **CBZMe** (Figura 4.10) en MeCN a la misma concentración (2×10^{-5} M).

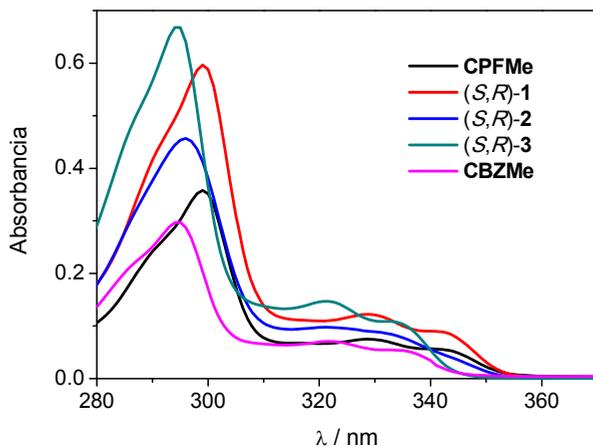


Figura 4.10. Espectros de absorción UVA-UVB de las diadas **1-3**, **CPFMe** y **CBZMe** concentración 2×10^{-5} M en MeCN.

En la Figura 4.10 se observa que las bandas de absorción características en MeCN (290–310 nm y 320–350 nm) se mantienen aunque hay desplazamientos de las bandas debido a la presencia del Cl.

A continuación, se presentan los espectros de fluorescencia de todos los sustratos (Figura 4.11), realizados a las mismas condiciones de absorbancia (0.1 a

la longitud de onda de excitación de 300 nm), MeCN y bajo atmósfera de nitrógeno.

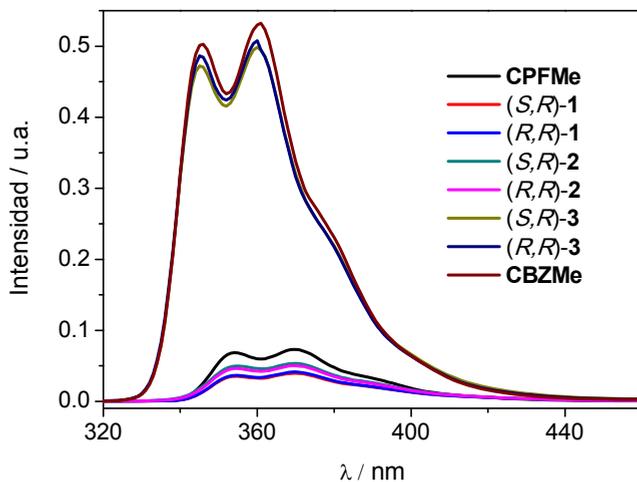


Figura 4.11. Espectros de fluorescencia de las diadas **1–3**, **CPFMe** y **CBZMe** (λ_{exc} = 300 nm, MeCN/N₂, absorbancia a 300 nm = 0.1).

Los máximos de emisión y los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las diadas se recogen en la Tabla 4.2. La coincidencia entre los máximos de emisión y los valores de ϕ_F en **1** y **2** indica que el cromóforo clorocarbazol es el responsable de la emisión. Ello está de acuerdo con una transferencia de energía singlete–singlete (favorecida termodinámicamente) en **2** desde la unidad de carbazol a la de clorocarbazol. En cambio, la ausencia de Cl en las diadas **3** y en **CBZMe** se traduce en un aumento considerable del valor de ϕ_F (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Parámetros fotofísicos de las diadas 1–3 y los modelos **CBZMe** y **CPFMe** en MeCN/N₂.

Compuesto	λ_{\max}^a	ϕ_F^b
CBZMe	343, 358	0.540
CPFMe	354, 369	0.069
(S,R)-1	354, 369	0.045
(R,R)-1	354, 369	0.046
(S,R)-2	354, 369	0.062
(R,R)-2	354, 369	0.059
(S,R)-3	345, 360	0.509
(R,R)-3	345, 360	0.515

^aMáximos de emisión en nm. ^bDeterminados usando **CPF** en MeCN/N₂ como patrón.¹³

Finalmente, se llevaron a cabo experimentos de fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$, MeCN/N₂), para apoyar el mecanismo que implica la participación del estado excitado triplete y del “self-quenching” en el proceso de deshalogenación. Para **1**, **2** y **CPFMe**, el espectro de absorción transitoria mostró la banda de absorción T-T característica del clorocarbazol con máximo a 430 nm. En la Figura 4.12 se muestra el caso de **CPFMe**.

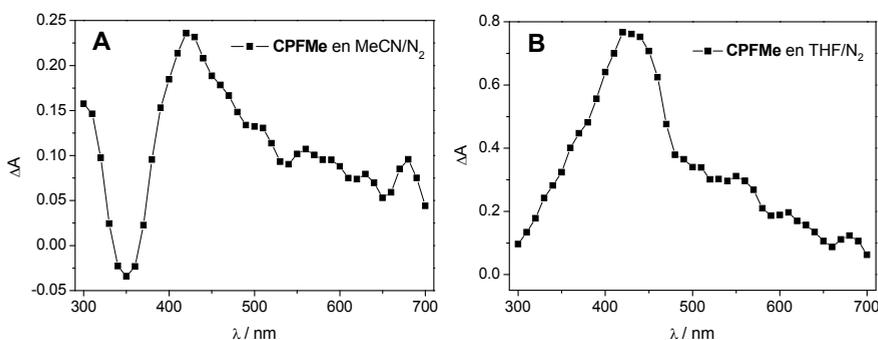


Figura 4.12. Espectro de absorción transitoria de (A) **CPFMe** en MeCN/N₂ y (B) **CPFMe** en THF/N₂, registrados 1 μs después del pulso de láser.

Los ϕ_T y τ_T (Tabla 4.3 y Figura 4.13) proporcionaron información relevante. Así, los tiempo de vida del triplete (τ_T) fueron más altos para **CPFMe** (3.2 μs) que para las diadas mono- (1.7–1.9 μs) y dihalogenadas (0.7–0.9 μs). Las constantes de desactivación (“quenching”) fueron calculadas usando la relación $k_Q = 1/\tau_T(\text{diada}) - 1/\tau_T(\text{CPFMe})$ y están en el rango de 10^5 – 10^6 s^{-1} (Tabla 4.3).

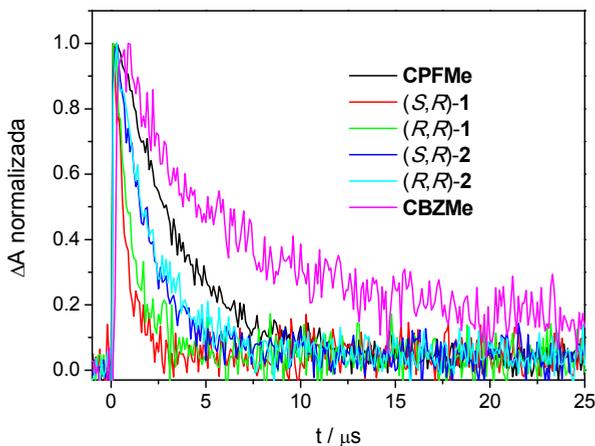


Figura 4.13. Cinéticas de desaparición de la señal a 430 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}/\text{N}_2$) para las diadas y compuestos de referencia en MeCN.

Tabla 4.3. Parámetros fotofísicos de las diadas 1–3 y los modelos **CBZMe** y **CPFMe** en MeCN/ N_2 .

Compuesto	$\tau_T (\mu\text{s})$	$k_Q \times 10^{-5} (\text{s}^{-1})$	ϕ_T^a
CBZMe	5.4	-	0.23
CPFMe	3.2	-	0.43
(S,R)-1	0.7	11.1	0.24
(R,R)-1	0.9	8.0	0.25
(S,R)-2	1.7	2.8	0.30
(R,R)-2	1.9	2.1	0.31
(S,R)-3	6.0	-	0.22
(R,R)-3	6.1	-	0.22

^aDeterminados usando **CPF** en EtOH/ N_2 como patrón.¹³

La desactivación por “self-quenching” puede dar lugar a especies de carga separadas (excímeros/exciplejos o pares de iones radicales). Para discriminar entre ambas posibilidades, se aplicaron las ecuaciones de Rehm–Weller.¹⁶

$$\Delta G_{EX}(\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{ox}^{dador} - E_{red}^{aceptor} - 0.75 \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \right] - E^* \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$\Delta G_{Te}(\text{kcal mol}^{-1}) = 23.06 \left[E_{ox}^{dador} - E_{red}^{aceptor} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \right] - E^* \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Donde 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 ϵ es la permitividad del disolvente.

Teniendo en cuenta el potencial de oxidación del clorocarbazol (1.2 V),¹⁷ el potencial de reducción del **CPFMe** ($E_{red} = -1.8$ V, determinado por voltamperometría cíclica) (Ver parte experimental), la permitividad del MeCN (37.5)¹⁸ y la energía del estado excitado triplete del **CPF** (69 kcal mol⁻¹),¹³ la transferencia electrónica resulta favorecida ($\Delta G_{Te} = -1.2$ kcal mol⁻¹), mientras que la formación de excímero es un proceso endergónico ($\Delta G_{EX} = +3.9$ kcal mol⁻¹).

La disposición geométrica necesaria para el “self-quenching” sólo puede ser lograda en conformaciones plegadas, donde las interacciones intercromofóricas están maximizadas. La estructura de Rayos-X de (*S,R*)-**1** (la única diada que fue obtenida de forma cristalina) exhibió esta conformación plegada (Figura 4.14).

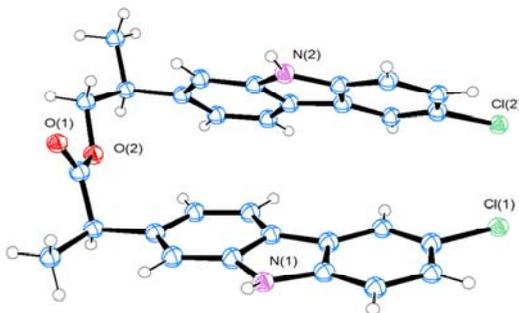


Figura 4.14. Estructura de Rayos-X del compuesto (*S,R*)-**1**.

Como se ha descrito anteriormente, la deshalogenación es mucho menor en THF que en MeCN, de acuerdo con el mecanismo que implica la participación de las especies con separación de carga en la reacción. Las ecuaciones de Rehm–Weller predicen valores endergónicos tanto para transferencia electrónica (+5.1 kcal mol⁻¹) como formación de excímero (+5.2 kcal mol⁻¹) en THF ($\epsilon = 7.6$).¹⁸

En THF, las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete a 430 nm fueron prácticamente coincidentes para **1**, **2** y **CPFMe** (Figura 4.15), nuevamente de acuerdo con la ausencia de especies con separación de carga en este medio.

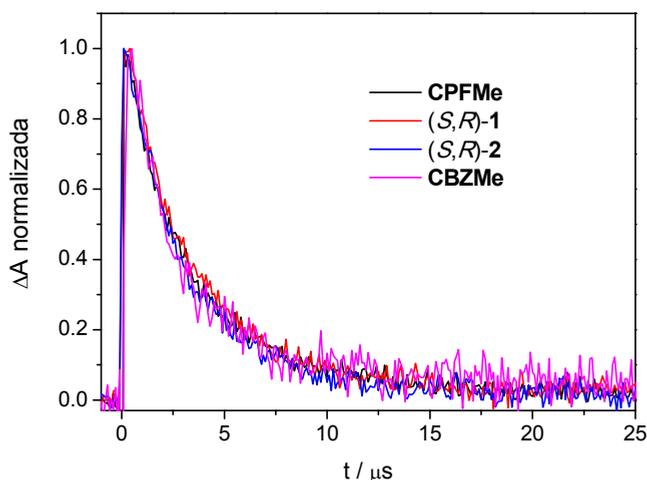


Figura 4.15. Cinéticas de desaparición de la señal a 430 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}/\text{N}_2$) para las diadas y compuestos de referencia en THF. La absorbancia de las muestras fue 0.2 a la longitud de onda de excitación del láser.

4.3 Conclusiones

En resumen, se ha demostrado la participación de “self-quenching” en la deshalogenación a partir de estados excitados triplete de las diadas **1** y **2** basadas en **CPF**. Este proceso puede ser claramente relacionado con la fotodeshalogenación reductiva, que ocurre a través de la formación de especies con separación de carga. Las tendencias observadas en los tiempos de vida de triplete de los distintos sustratos y los efectos del disolvente en la fotorreactividad

(ausencia de reacción en disolvente apolar) están de acuerdo con el mecanismo propuesto (Figura 4.16).

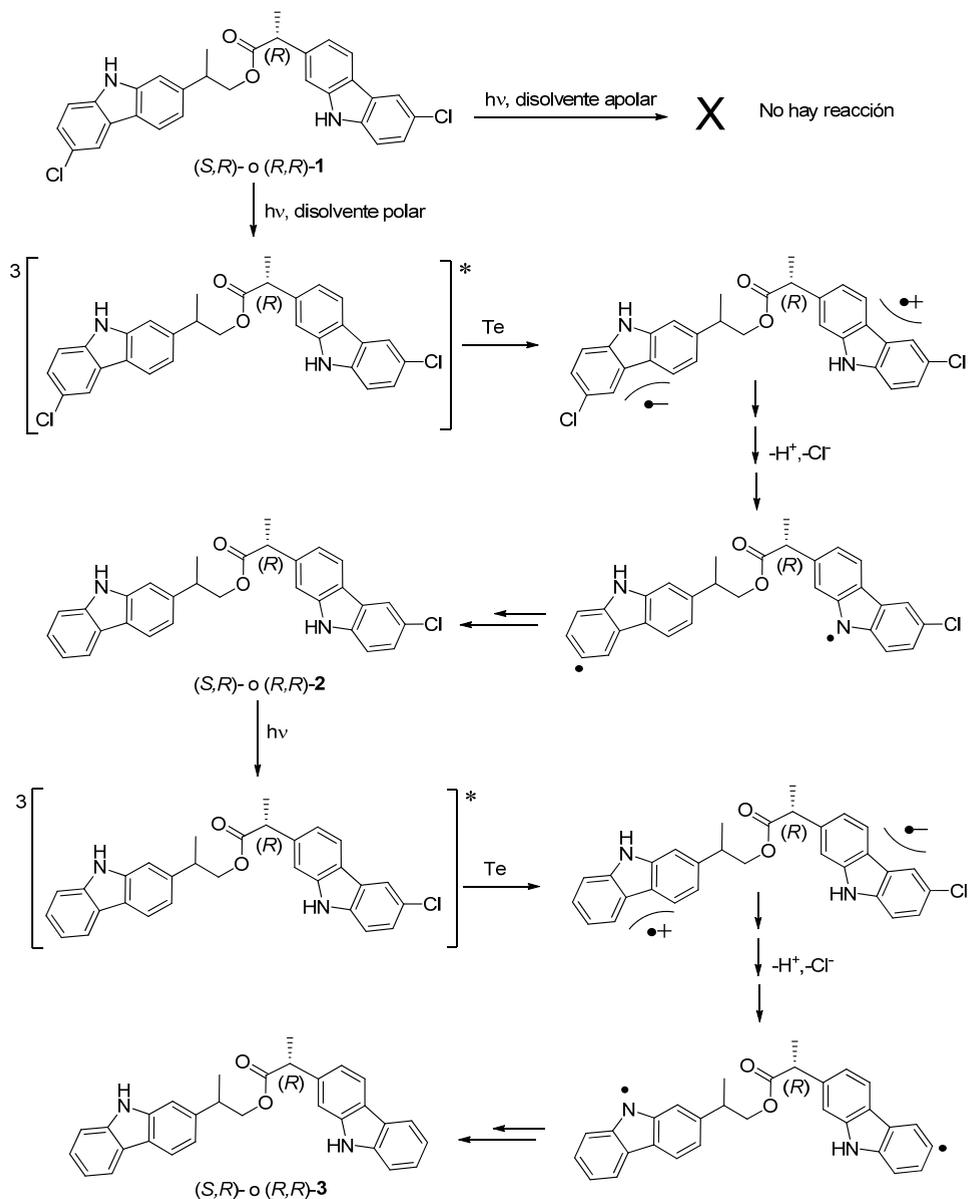


Figura 4.16. Mecanismo de reacción propuesto para la fotodeshalogenación reductiva de **1** y **2**.

4.4 Procedimiento experimental

4.4.1 Reactivos y disolventes

Carprofeno racémico (**CPF**, ácido (*RS*)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il) propanóico), LiAlH_4 1 M en éter etílico, DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Los disolventes utilizados para la síntesis y la purificación (dietil éter, acetato de etilo y hexano) fueron de grado analítico y otros disolventes (acetonitrilo, metil tert-butiléter, ácido acético, metanol y tetrahidrofurano) utilizados en los distintos experimentos fueron de grado HPLC.

4.4.2 Síntesis de las diadas

- Alcoholes (*S*)- o (*R*)-**CPFOH**

Para la síntesis de las diadas **1**, primero fue necesario separar los enantiómeros (*S*)- y (*R*)-**CPF** de la mezcla racémica mediante HPLC (columna semipreparativa Kromasil 100-TBB, con fase móvil hexano/metil tert-butiléter/ácido acético (45:55:0.1, v/v/v) y flujo 2.2 mL/min).

Posteriormente, (*S*)- o (*R*)-**CPF** puros fueron reducidos para obtener los correspondientes alcoholes, como se detalla a continuación: (*S*)- o (*R*)-**CPF** (150 mg, 0.5 mmol) se disolvieron en 10 mL de éter dietílico seco a 0 °C; tras añadir gota a gota 2.2 mL (2.2 mmol) de LiAlH_4 1 M en éter, la reacción se mantuvo a reflujo durante 1 h. El crudo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se hicieron lavados con agua (3x10 mL). La fase orgánica se secó sobre Mg_2SO_4 anhidro y una vez evaporado el disolvente se obtuvieron de modo cuantitativo los correspondientes alcoholes ((*S*)- o (*R*)-**CPFOH**) como sólidos blancos, que fueron utilizados directamente sin purificación adicional en la siguiente etapa de reacción.¹⁹

- Diadas (*S,R*)- y (*R,R*)-**1**

A una disolución de (*S*)- o (*R*)-**CPFOH** (135 mg, 0.5 mmol) en éter (20 mL), se añadió lentamente DCC (235 mg, 1.10 mmol). Después, se adicionó una

disolución de (*R*)-**CPF** (168 mg, 0.6 mmol) y DMAP (cantidad catalítica) en éter etílico (20 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió salmuera y se extrajo tres veces con éter (3x5 mL), la fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro; posteriormente, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación final del producto se llevó a cabo mediante cromatografía en columna a través de gel de sílice 60 (eluyente: hexano/acetato de etilo 70:30, v/v) y fue seguida por cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (eluyente: hexano/acetato de etilo 70:30, v/v), utilizando para revelar la irradiación una lámpara UV con una longitud de onda de 254 nm. Se obtuvieron unos rendimientos de 72 % y 65 % para (*S,R*)-**1** y (*R,R*)-**1**, respectivamente.

- Diadas **2** y **3**

Se irradiaron 200 mL de disoluciones de (*S,R*)- o (*R,R*)-**1** en acetonitrilo (6 x 10⁻⁴ M) en un fotorreactor multilámpara bajo atmósfera de N₂ durante 20 min. El disolvente fue evaporado a presión reducida y los fotoproductos **2** y **3** aislados mediante HPLC en fase reversa (acetonitrilo/agua (80:20), v/v como eluyente, flujo 2 mL/min).

- Metanólisis de **2** por catálisis ácida

Se añadieron 2 mg de (*S,R*)- o (*R,R*)-**2** a una mezcla de metanol y HCl 1M 9:1 (v/v). La mezcla se mantuvo bajo agitación y a reflujo toda la noche. Tras evaporación de los disolventes, se añadió agua y se extrajo con DCM. El análisis por CG-EM nos permitió detectar el pico correspondiente al **CPFMe** (M⁺ = 287 uma).

4.4.3 Fotólisis en estado estacionario

Las irradiaciones preparativas se llevaron a cabo en un fotorreactor equipado con 4 lámparas UVB de 8 W con un máximo de emisión de 300 nm en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm y 4 mL de capacidad máxima, a temperatura ambiente, atmósfera inerte y concentración 10⁻⁴ M.

Para evaluar las cinéticas de fotodeshalogenación se utilizaron las mismas condiciones que en las irradiaciones preparativas, pero se usó luz monocromática de 300 nm y la absorbancia de la muestra fue 0.3 para **1** y 0.1 para **2** y **3**.

4.4.4 Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron a temperatura ambiente en disoluciones de MeCN o THF burbujeadas 10 minutos con nitrógeno, en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm y 4 mL de capacidad máxima; las absorbancias se fijaron a 0.1 a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 300$ nm).

Se empleó **CPF** como patrón ($\phi_F = 0.068$ en MeCN/N₂)¹³ para el cálculo de los rendimientos cuánticos de los distintos compuestos, utilizando la ecuación 4.3:

$$\phi_F = \phi_s \frac{A_s I_i n_i^2}{A_i I_s n_s^2} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

donde A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, I es el área bajo el espectro de fluorescencia y n es el índice de refracción del disolvente. El sufijo “i” se refiere al compuesto cuyo rendimiento queremos calcular y “s” al patrón.

Las medidas de emisión se llevaron a cabo en el rango de 320-500 nm. No fue posible determinar los τ_F de modo preciso, ya que en todos los casos las cinéticas de desaparición fueron muy similares a la de la lámpara de irradiación (~1 ns).

4.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser

Se realizaron a temperatura ambiente utilizando celdas de cuarzo de dimensiones 10 x 10 mm² y 4 mL de capacidad máxima, burbujeados durante 20 min con N₂ antes de cada experimento. La absorbancia de las muestras se fijó a 0.2 a la longitud de onda de excitación de 308 nm.

Las cinéticas de desaparición se monitorizaron a 430 nm (máximo de absorción de ³CPF*) utilizando muestra fresca tras cada disparo.

El τ_T de los productos en MeCN o en THF se determinó por ajuste a una ecuación con un término monoexponencial (Ecuación 4.4).

$$\Delta A = \Delta A_0 + A e^{(t/\tau)} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

El **CPF** ($\phi_T = 0.37$ en etanol)¹³ fue empleado como patrón para determinar los ϕ_T de todos los sustratos con la siguiente ecuación:

$$\phi_T = \phi_s \frac{\Delta A_i}{\Delta A_s} \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

donde A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación. El sufijo “i” se refiere al compuesto cuyo rendimiento queremos calcular y “s” al patrón.

4.4.6 Medida de potenciales por voltamperometría

Para medir el potencial de reducción del **CPFMe** se utilizó un electrodo de trabajo de Pt, un electrodo auxiliar de Pt y un electrodo de referencia de Ag/AgCl_{sat}. El electrolito fue PF₆TBA (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio). Se preparó una disolución de **CPFMe** en MeCN (5×10^{-3} M) y se burbujeó nitrógeno. La velocidad de barrido empleada en la medida fue de 250 mV s^{-1} . El valor se lee en el mínimo (-1.8 V).

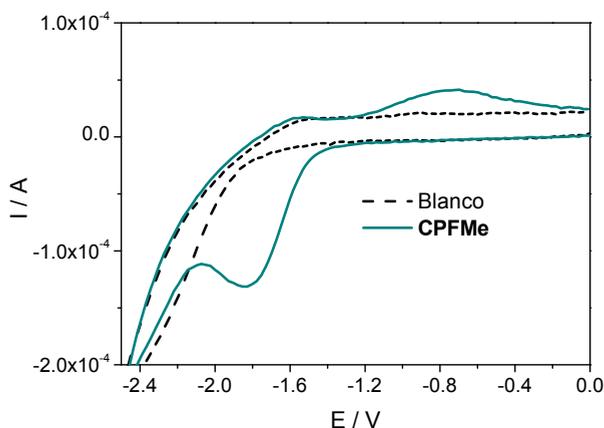


Figura 4.17. Voltamperograma cíclico de **CPFMe**.

4.4.7 Caracterización espectroscópica de las diadas

Espectro de absorción UV de (S,R)-1 $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 238 (4.9), 299 (4.5), 330 (3.8) y 343 (3.6).

Espectro **RMN-¹H** de (R)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoato de (S)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-propilo, (S,R)-1: (300 MHz, Acetona-d₆) (δ , ppm): 10.34 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.05-8.00 (d+d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.49-7.43 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 4H), 7.08-7.01 (m, 2H), 4.32 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H), 3.87 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.28-3.14 (m, 1H), 1.47 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **RMN-¹³C**: (75 MHz, Acetona-d₆) (δ , ppm): 174.7, 143.1, 141.9, 141.7, 140.4, 139.5, 139.4, 126.1, 125.9, 125.1, 125.0, 124.7, 124.6, 121.9, 121.7, 121.2, 121.1, 120.4, 120.3, 119.9, 119.9, 113.0, 112.9, 110.7, 110.5, 70.1, 46.5, 40.2, 19.1, 18.5. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₅N₂O₂³⁵Cl₂: 515.1293 [MH⁺]; encontrada 515.1274.

Espectro de absorción UV de (R,R)-1 $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 238 (4.9), 299 (4.5), 330 (3.8) y 343 (3.6).

Espectro **RMN-¹H** de (R)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoato de (R)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-propilo, (R,R)-1: (300 MHz, Acetona-d₆) (δ , ppm): 10.35 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.1$, 1H), 8.00 (d, $J = 2.1$, 1H), 7.96 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.50-7.29 (m, 6H), 7.06 (dd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.86 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.27-3.13 (m, 1H), 1.46 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **RMN-¹³C**: (75 MHz, Acetona-d₆) (δ , ppm) 174.6, 143.2, 141.9, 141.8, 140.5, 139.6, 139.5, 126.2, 125.9, 125.2, 125.1, 124.8, 124.6, 122.0, 121.7, 121.3, 121.1, 120.5, 120.3, 120.0, 119.9, 113.1, 113.0, 110.9, 110.5, 70.2, 46.6, 40.3, 19.2, 18.6. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₅N₂O₂³⁵Cl₂: 515.1293 [MH⁺]; encontrada 515.1313.

Espectro de absorción UV de (S,R)-2 $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 236 (4.8), 296 (4.4), 332 (3.7).

Espectro **RMN-¹H** de (*R*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoato de (*S*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)-propilo, (*S,R*)-**2**: (400 MHz, DMSO-*d*₆) (δ, ppm): 11.31 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 8.08-7.84 (m, 4H), 7.49-7.28 (m, 6H), 7.13 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.02-6.91 (m, 2H), 4.25 (dd, *J*₁ = 10.7 Hz, *J*₂ = 7.0 Hz, 1H), 4.14 (dd, *J*₁ = 10.7 Hz, *J*₂ = 7.0 Hz, 1H), 3.90 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.18 (m, 1H), 1.43 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). **DEPT RMN-¹³C**: (100 MHz, DMSO-*d*₆) (δ, ppm): 173.9, 140.7, 140.5, 140.0, 139.9, 138.9, 138.3, 125.2, 125.1, 123.5, 122.9, 122.3, 121.1, 120.5, 120.5, 120.3, 119.9, 119.6, 118.7, 118.4, 118.2, 112.4, 110.9, 109.8, 109.3, 69.3, 45.0, 38.7, 18.6, 18.1. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₆N₂O₂³⁵Cl: 481.1683 [MH⁺]; encontrada 481.1683.

Espectro de absorción UV de (*R,R*)-2**** λ_{máx}/nm (log ε): 236 (4.8), 296 (4.4), 332 (3.7).

Espectro **RMN-¹H** de (*R*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoato de (*R*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)-propilo, (*R,R*)-**2**: (400 MHz, DMSO-*d*₆) (δ, ppm): 11.33 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 8.09-7.96 (m, 2H), 7.93-7.83 (m, 2H), 7.50-7.42 (m, 2H), 7.40-7.29 (m, 4H), 7.17-7.10 (m, 1H), 6.97-6.90 (m, 2H), 4.25-4.14 (m, 2H), 3.9 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.17 (m, 1H), 1.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). **DEPT RMN-¹³C**: (100 MHz, DMSO-*d*₆) (δ, ppm): 173.9, 140.8, 140.5, 140.00, 139.9, 139.0, 138.4, 125.2, 125.2, 123.6, 122.9, 122.3, 121.1, 120.6, 120.5, 120.4, 119.9, 119.6, 118.6, 118.5, 118.3, 112.4, 110.9, 110.0, 109.3, 69.4, 45.2, 38.9, 18.7, 18.2. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₆N₂O₂³⁵Cl: 481.1683 [MH⁺]; encontrada 481.1694.

Espectro de absorción UV de (*S,R*)-3**** λ_{máx}/nm (log ε): 235 (4.9), 295 (4.5), 322 (3.9) y 334 (3.7).

Espectro **RMN-¹H** de (*R*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)propanoato de (*S*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)-propilo, (*S,R*)-**3**: (400 MHz, DMSO-*d*₆) (δ, ppm): 11.14 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 8.00 (d+d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.47-7.42 (m, 2H), 7.38-7.29 (m, 4H), 7.17-7.09 (m, 2H), 6.97 (td, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, 2H), 4.25 (dd, *J*₁ = 10.7 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz, 1H), 4.15 (dd, *J*₁ = 10.7 Hz, *J*₂

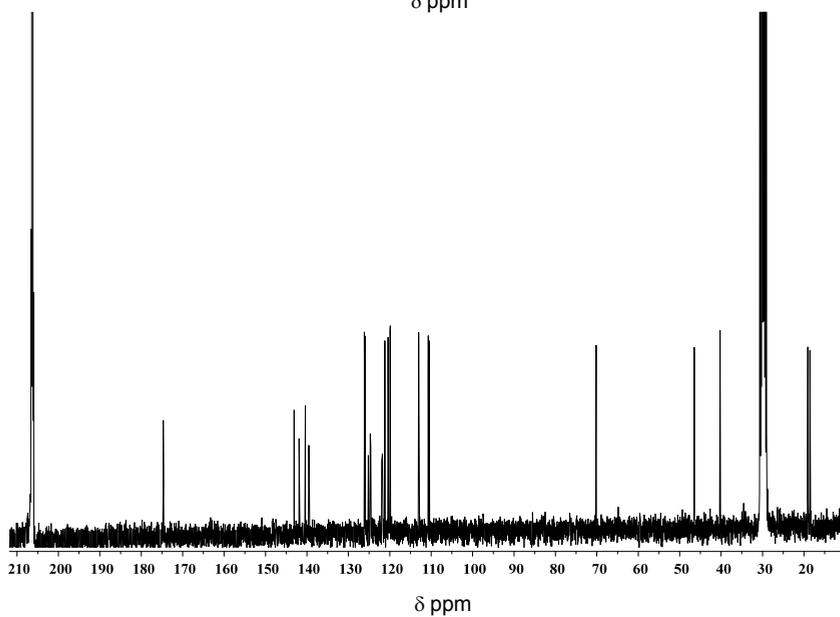
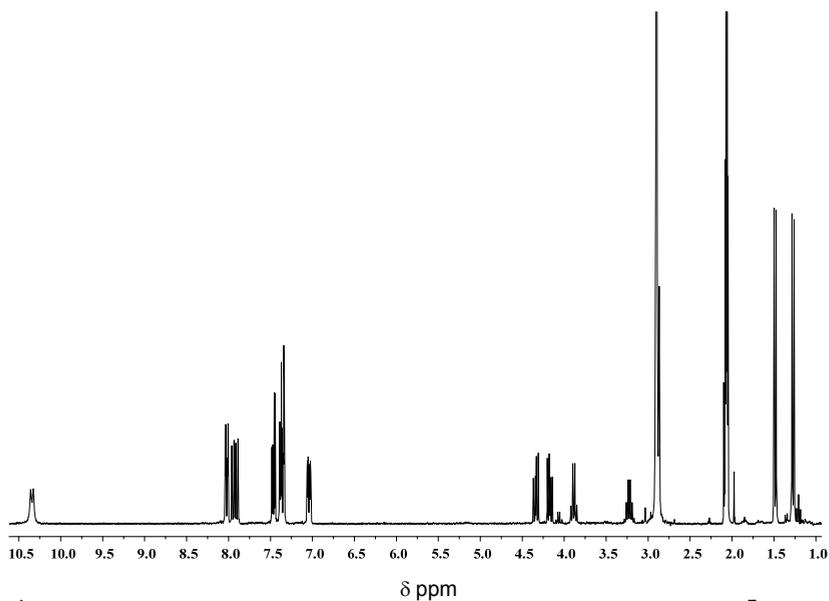
= 7.2 Hz, 1H), 3.90 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.23-3.13 (m, 2H), 1.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **DEPT RMN-¹³C**: (100 MHz, DMSO-d₆) (δ , ppm): 174.0, 140.7, 140.0, 139.9, 139.9, 139.8, 138.0, 125.4, 125.2, 122.3, 122.2, 121.3, 121.1, 120.1, 120.00, 119.9, 119.9, 118.5, 118.4, 118.2, 118.1, 110.9, 110.8, 109.5, 109.3, 69.3, 45.0, 38.7, 18.6, 18.1. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₇N₂O₂: 447.2073 [MH⁺]; encontrada 447.2084.

Espectro de absorción UV de (*R,R*)-3 $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (log ϵ): 235 (4.9), 295 (4.5), 322 (3.9) y 334 (3.7).

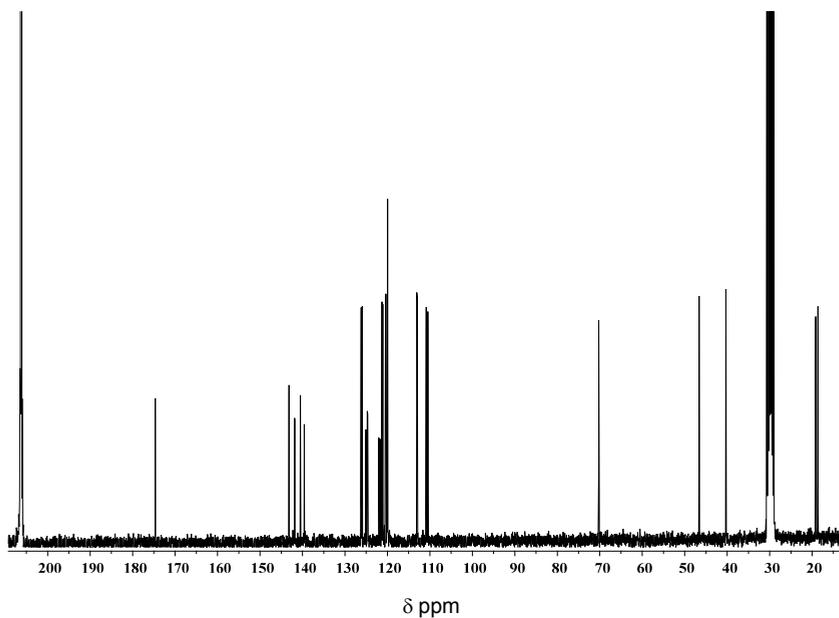
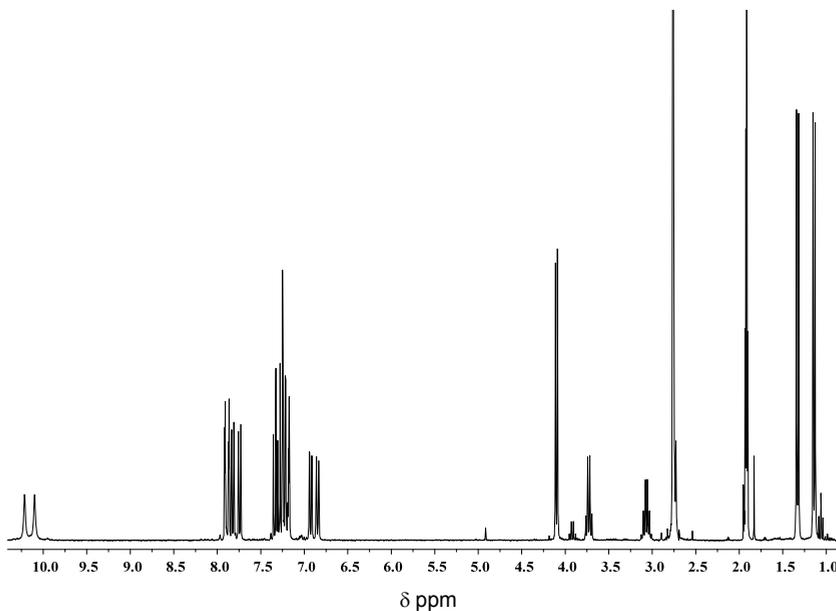
Espectro **RMN-¹H** de (*R*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)propanoato de (*R*)-2-(9*H*-carbazol-2-il)-propilo, (*R,R*)-3: (400 MHz, DMSO-d₆) (δ , ppm): 11.15 (s, 1H), 11.08 (s, 1H), 7.99 (m, 2H), 7.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.47-7.29 (m, 6H), 7.17-7.09 (m, 2H), 6.98-6.90 (m, 2H), 4.22 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, 1H), 3.89 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.17 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **DEPT RMN-¹³C**: (100 MHz, DMSO-d₆) (δ , ppm): 174.0, 140.8, 140.0, 139.9, 139.9, 139.80, 138.1, 125.4, 125.2, 122.3, 122.2, 121.4, 121.1, 120.1, 120.0, 119.9, 119.8, 118.6, 118.4, 118.3, 118.2, 110.9, 110.9, 109.7, 109.3, 69.3, 45.1, 38.7, 18.8, 18.2. **Masa exacta** calculada para C₃₀H₂₇N₂O₂: 447.2013 [MH⁺]; encontrada 447.2095.

4.4.8 Espectros RMN-¹H y -¹³C

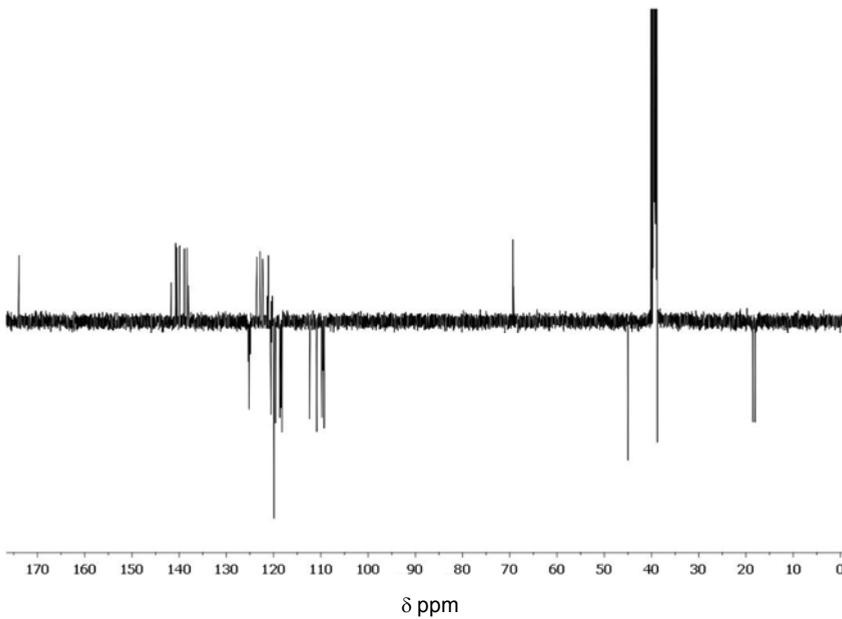
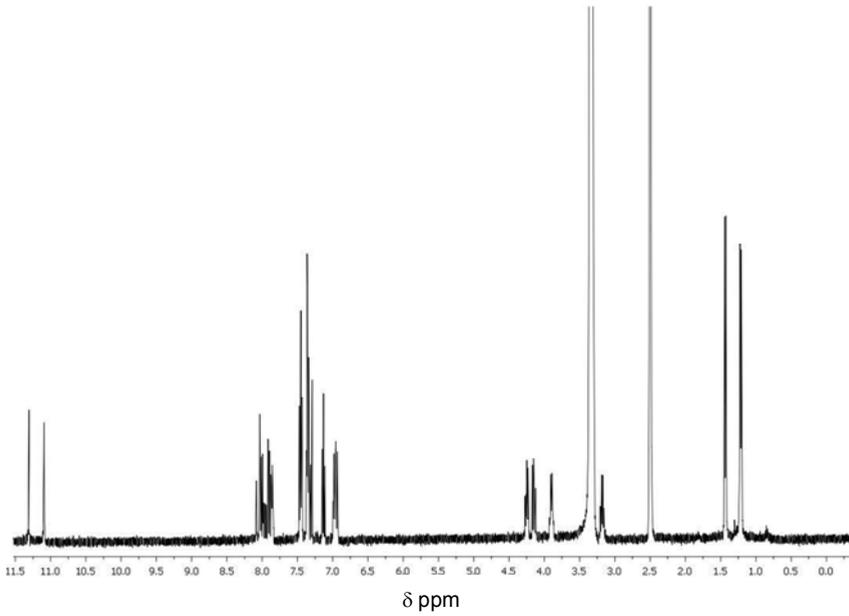
Espectros de RMN-¹H y -¹³C de la diada (S,R)-1. (Acetona-d₆)



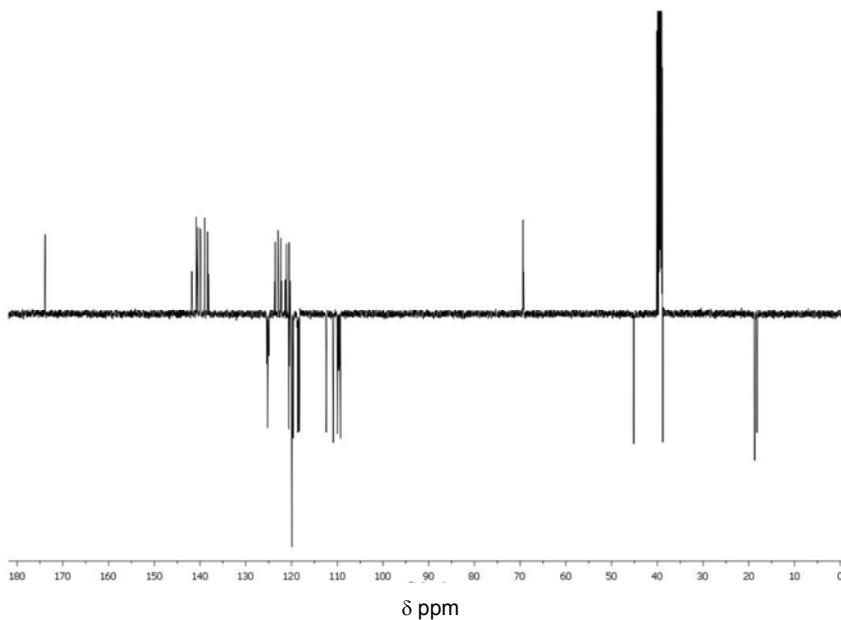
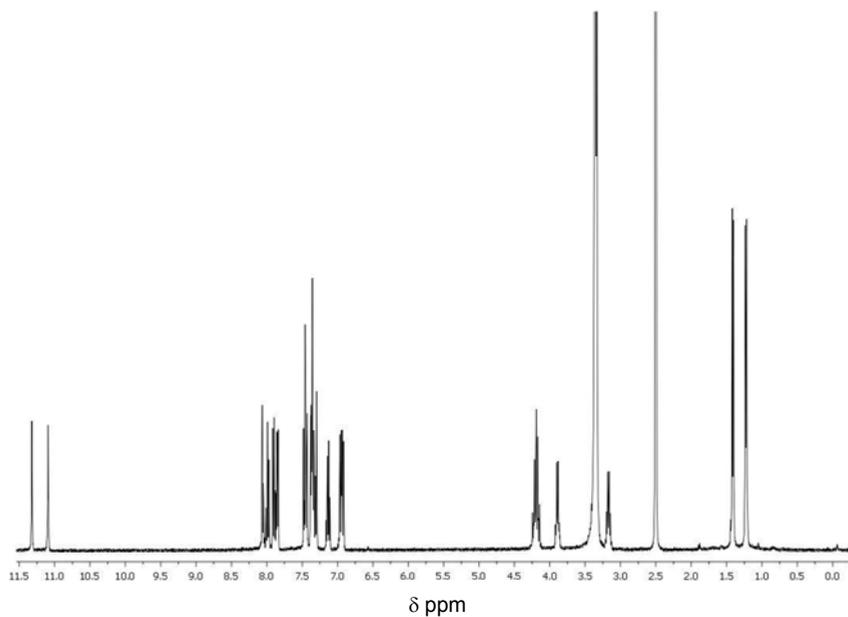
Espectros de RMN-¹H y -¹³C de la diada (R,R)-1, (Acetona-d₆)



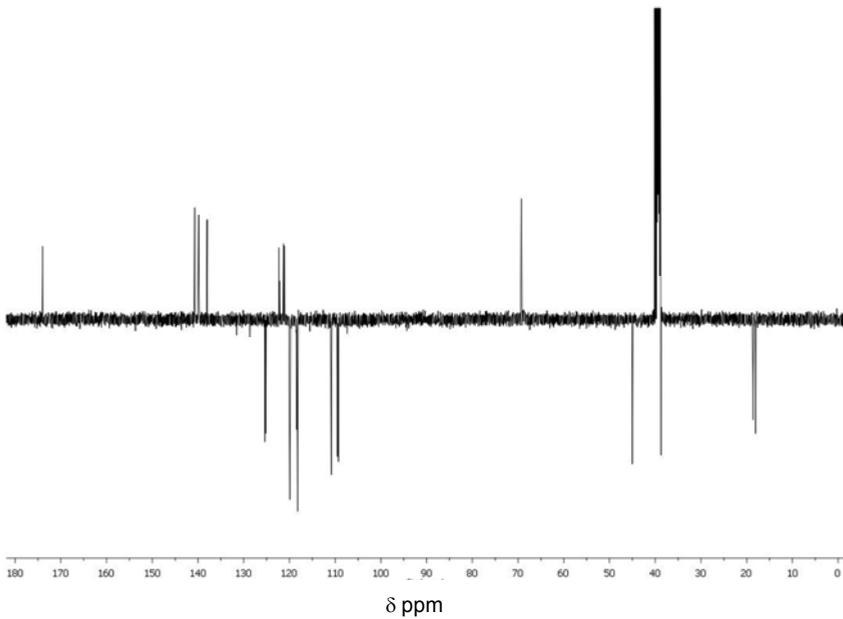
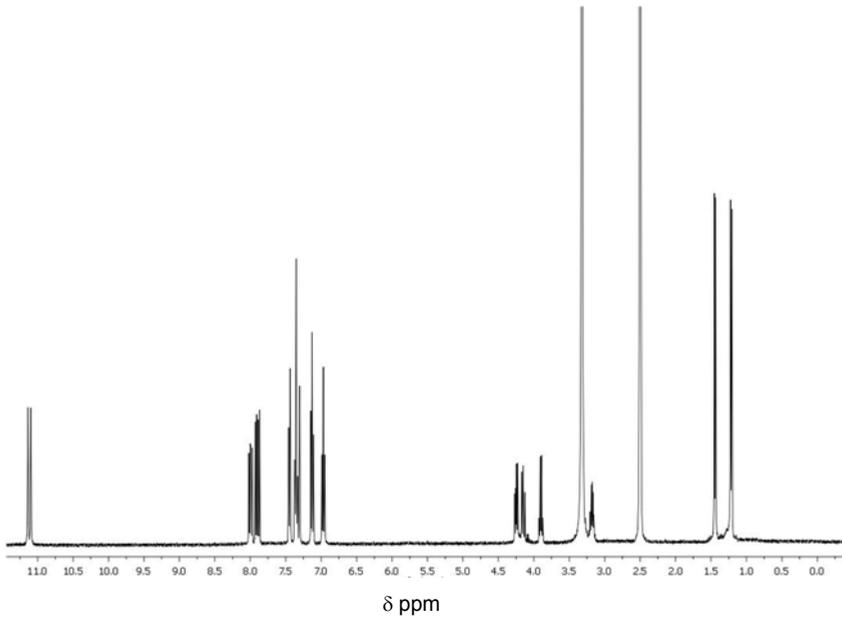
Espectros de RMN-¹H y DEPT-RMN-¹³C de la diada (S,R)-2, (DMSO-d₆)



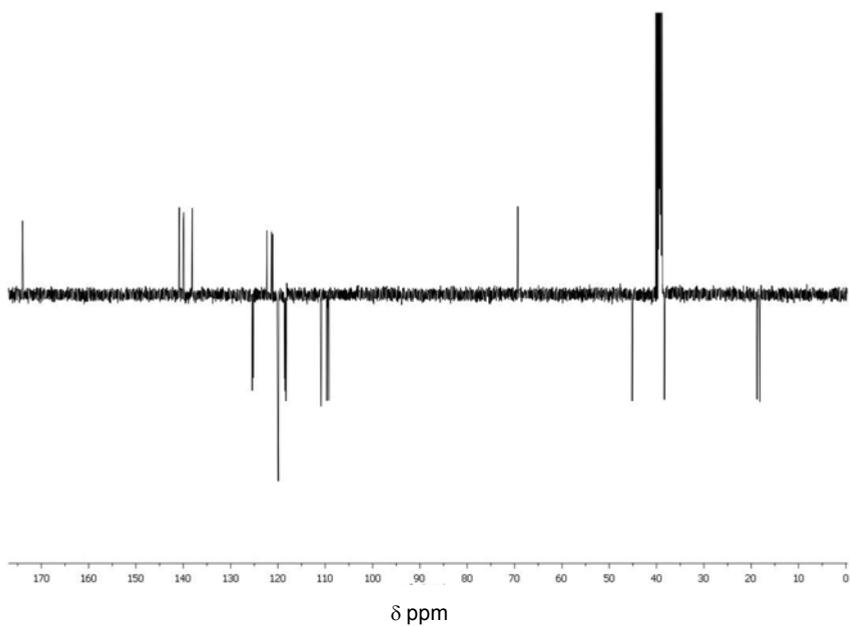
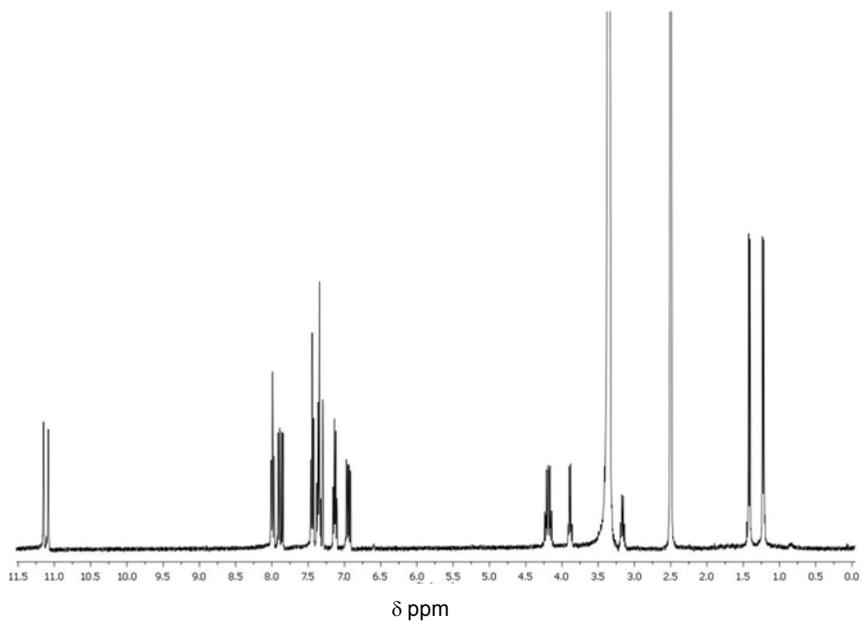
Espectros de RMN-¹H y DEPT-RMN-¹³C de la diada (*R,R*)-**2**, (DMSO-d₆)



Espectros de RMN-¹H y DEPT-RMN-¹³C de la diada (S,R)-**3**, (DMSO-d₆)



Espectros de RMN-¹H y DEPT-RMN-¹³C de la diada (*R,R*)-**3**, (DMSO-d₆)



4.5 Referencias bibliográficas

- (1) Freccero, M.; Fagnoni, M.; Albini, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13182.
- (2) Guizzardi, B.; Mella, M.; Fagnoni, M.; Freccero, M.; Albini, A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6353.
- (3) Pretali, L.; Albini, A.; Griesbeck, A.; Oelgemöller, M.; Ghetti, F. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2012.
- (4) Schutt, L.; Bunce, N. J.; Horspool, W. M.; Lenci, F. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2004.
- (5) Bunce, N. J.; Bergsma, J. P.; Bergsma, M. D.; Kumar, Y.; Ravanal, L. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3708.
- (6) Da Silva, J. P.; Jockusch, S.; Turro, N. J. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 210.
- (7) Freeman, P. K.; Ramnat, N. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3646.
- (8) Freeman, P. K.; Ramnat, N.; Richardson, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3643.
- (9) Siegman, J. R.; Houser, J. J. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2773.
- (10) Bunce, N. J.; Pilon, P.; Ruzo, L. O.; Sturch, D. J. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3023.
- (11) Bunce, N. J.; Ravanal, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4150.
- (12) Freeman, P. K.; Haugen, C. M. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1998**, *72*, 45.
- (13) Bosca, F.; Encinas, S.; Heelis, P. F.; Miranda, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 820.
- (14) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Bosca, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- (15) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- (16) Weller, A. Z. *Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93.
- (17) Bonesi, S. M.; Erra-Balsells, R. *J. Lumin.* **2002**, *97*, 83.
- (18) *Handbook of Chemistry and Physics*; 85th ed.; CRC Press: Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.
- (19) Asins-Fabra, B.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *207*, 52.

Capítulo 5. Oxidación retardada de ciamemazina en medios biomiméticos

5.1 Introducción

La fenotiazina (**FTZ**) es un sistema tricíclico presente en numerosos fármacos que cubren una amplia gama de patologías, siendo empleados como agentes antipsicóticos, tranquilizantes o antihistamínicos.¹⁻⁴

El comportamiento fotoquímico de los fármacos que contienen **FTZ** ha recibido especial atención, pues se trata de un cromóforo activo con conocidos efectos fotosensibilizantes experimentados en pacientes bajo tratamiento.⁵⁻⁷ Por otra parte, en la literatura se encuentra descrito cómo los parámetros fotofísicos clave de las **FTZs** pueden verse influenciados por distintos factores, como la sustitución en las posiciones 2 y 10 del anillo tricíclico, la naturaleza del disolvente o la energía de excitación.⁸⁻¹⁰

Como se ha indicado en la introducción general, las proteínas transportadoras presentes en sangre y plasma (fundamentalmente ASs y AGAs) se unen a una amplia variedad de fármacos y consecuentemente son importantes moduladores de la farmacocinética y eliminación de un fármaco.^{11,12} En este contexto, ha sido investigada la interacción de muchas **FTZs** (empleadas como agentes neurolépticos) con AGAs usando dicroísmo circular y diálisis de equilibrio. En el caso de la AGAH se ha concluido que los derivados de **FTZ** se unen preferentemente a un sitio de unión, donde las principales fuerzas implicadas son de tipo hidrofóbico, aunque también participan interacciones electrostáticas.¹³⁻¹⁵ La afinidad de las **FTZs** por las AGAs ha sido utilizada para el desarrollo de fases estacionarias para la resolución de enantiómeros por HPLC.¹⁶⁻¹⁸ También se ha observado la inclusión efectiva de **FTZs** en otros sistemas biomiméticos, como por ejemplo β - o γ -ciclodextrinas (CDs) o micelas de dodecil sulfato sódico (SDS).¹⁹⁻²¹ En el caso de las CDs, las **FTZs** forman complejos de inclusión con distintas estequiometrias. Además, la encapsulación en β -CD protege a los eritrocitos de la fotohemólisis inducida por un gran número de **FTZs**.²² También, se han desarrollado aplicaciones analíticas, como el uso de varias CDs como selectores quirales para la separación enantiomérica de **FTZs**.²³

La inclusión de **FTZs** en micelas de SDS ha sido investigada mediante espectroscopia de absorción y fluorescencia, con especial atención a la competición entre la fotoionización y la formación del estado excitado triplete.

La ciamemazina (**CMZ**, 2-ciano-10-(3-dimetilamino-2-metilpropil)fenotiazina, Figura 5.1) es un derivado de **FTZ**, utilizado como fármaco neuroléptico, que da lugar a una fuerte fototoxicidad cutánea en humanos.²⁴ El fármaco se fotooxida fácilmente bajo irradiación UVA a 2-ciano-10-(3-dimetilamino-2-metilpropil)fenotiazina *N,S*-dióxido (**CMZ-SONO**), un efectivo agente fotodinámico capaz de producir oxígeno singlete.

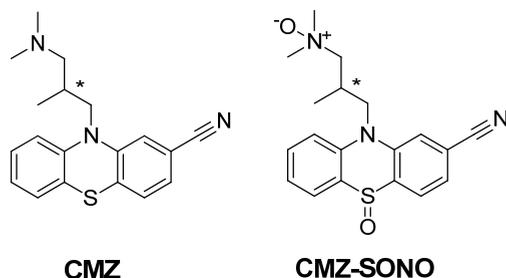


Figura 5.1. Estructuras químicas del fármaco **CMZ** y su fotoproducto **CMZ-SONO**.

Este fotoproducto también se forma mediante la irradiación UVA de cultivos de fibroblastos humanos incubados con el fármaco. Como la **CMZ** se encuentra principalmente localizada en los lisosomas de fibroblastos humanos y queratinocitos, **CMZ-SONO** juega un papel central en el desarrollo de respuestas fototóxicas en humanos tratados con **CMZ**.^{25,26}

El espectro de fluorescencia de la **CMZ** en disolución tampón de fosfato salino (PBS, pH = 7.4) muestra un máximo sobre 530 nm, y un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.11 a $\lambda_{exc} = 267$ nm. La fotólisis de destello láser (FDL) bajo las mismas condiciones revela el espectro de absorción transitoria del estado excitado triplete ($^3\text{CMZ}^*$), con una banda característica con un máximo a 420 nm, junto con el correspondiente catión radical ($\text{CMZ}^{+\bullet}$) como una banda ancha en la región de 500 nm. Ambas especies reaccionan con oxígeno, aunque

con constantes de velocidad notablemente diferentes (4×10^9 y $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente).

Ya que un número de procesos relevantes ocurren en compartimentos biológicos bien definidos, profundizar en el comportamiento de los fármacos dentro de microambientes biomiméticos puede ser una modelización útil del proceso. En este trabajo, el fotocomportamiento de la **CMZ** enantioméricamente pura ha sido examinado en presencia de AGAs, β - y γ -CD, así como en SDS.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Estudio del proceso de unión al anfitrión por medidas de fluorescencia

Los dos enantiómeros (–)-**CMZ** y (+)-**CMZ** fueron aislados del fármaco comercial que se presenta en forma racémica por HPLC (fase estacionaria quiral, hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina como eluyente) (Parte experimental).

Como era de esperar, los espectros de absorción de los dos compuestos en PBS resultaron idénticos, mostrando una banda intensa a 268 nm y una cola que alcanza los 400 nm (Figura 5.2).

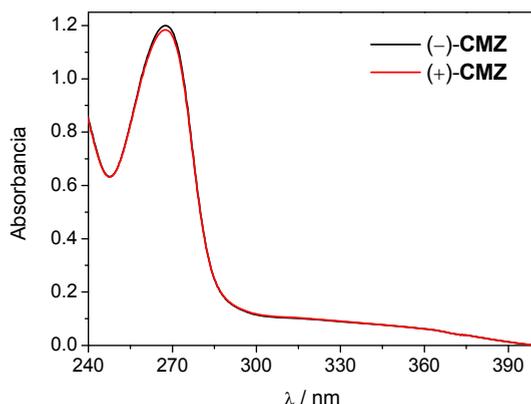


Figura 5.2. Espectros de absorción UV de (–)- y (+)-**CMZ** a concentración 6×10^{-5} M en PBS.

La excitación se llevó a cabo a 330 nm, para evitar interferencias por absorción de luz por parte del anfitrión. La formación de complejos **CMZ@AGA**, se siguió por fluorescencia a través de los cambios observados en la posición y la intensidad de la banda. Los resultados obtenidos para (–)**CMZ** se muestran en la Figura 5.3.

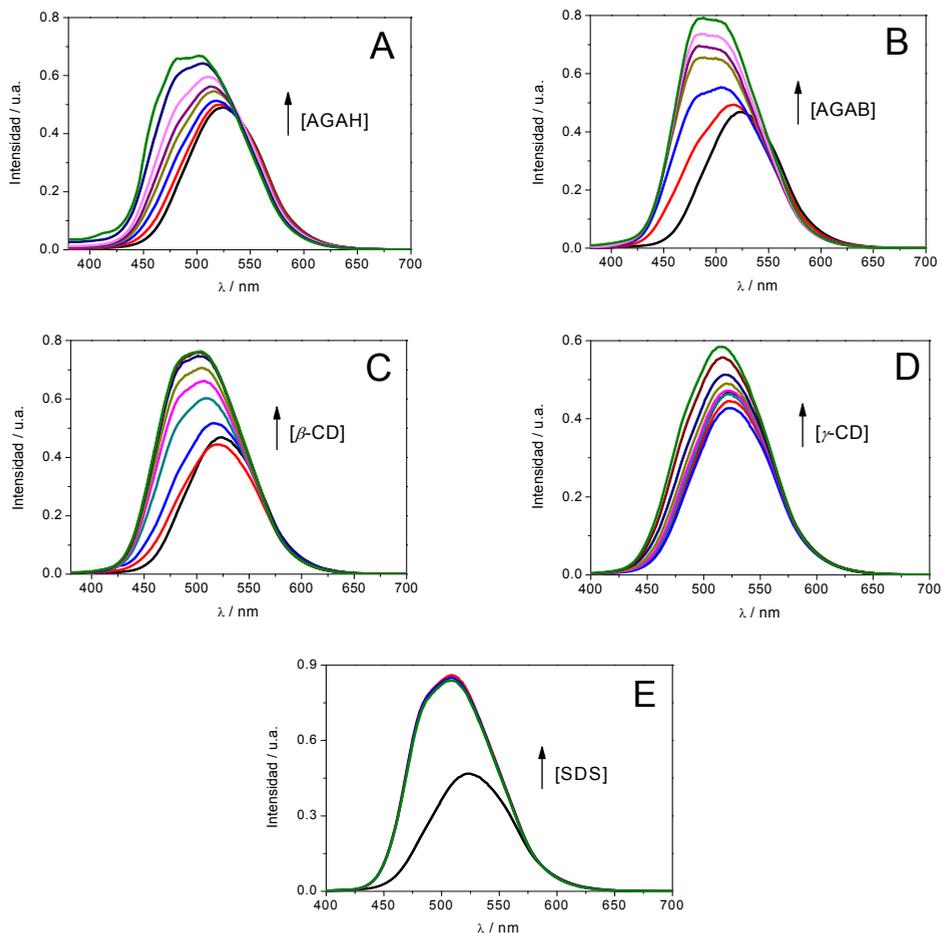


Figura 5.3. Espectros de fluorescencia de (–)**CMZ** (6×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm, PBS/aire) en presencia de cantidades crecientes de **A:** AGAH (0 a 3 eq.), **B:** AGAB (0 a 2 eq.), **C:** β-CD (0 a 200 eq.), **D:** γ-CD (0 a 200 eq.), **E:** SDS (0 a 1.2×10^{-2} M).

En presencia de cantidades crecientes de AGAs, la banda de emisión de (–)-**CMZ** (inicialmente con máximo a 525 nm en PBS) experimentó un aumento progresivo de intensidad junto a un desplazamiento hipsocrómico. Con una relación molar 1:3 fármaco/AGAH (Figura 5.3A), el máximo se desplazó hacia el azul alrededor de 30 nm, y el rendimiento cuántico en PBS (ϕ_F) se incrementó desde 0.064 hasta 0.109 (Tabla 5.1). Un comportamiento similar fue observado en presencia de AGAB (Figura 5.3B). Esto indicó una efectiva encapsulación de la **CMZ** en ambas AGAs. En concordancia con ello, los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) fueron mayores para los complejos **CMZ@AGA** que para **CMZ** en disolución (Tabla 5.1). En el caso de β - y γ -CD y SDS. En general, la inclusión de (–)-**CMZ** en estos sistemas resultó en un desplazamiento del máximo de emisión al azul, así como un marcado aumento de la intensidad de fluorescencia y τ_F como se ha descrito anteriormente para las AGAs (Figura 5.3C-E y Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Datos de fluorescencia para (–)-**CMZ** en distintos medios microheterogéneos.

Medio	$\lambda_{\text{max em}}$ (nm)	ϕ_F	τ_F (ns)	$k_F \times 10^7$ (s ⁻¹)	E_s (kcal mol ⁻¹)
Ninguno	525	0.064	5.6	1.15	67.4
AGAH*	482-505	0.109	6.7	1.63	67.6
AGAB [†]	483-508	0.118	7.9	1.49	66.8
β -CD [‡]	486-512	0.116	7.6	1.53	67.3
γ -CD [‡]	508-522	0.085	6.8	1.25	67.1
SDS [‡]	496-518	0.117	8.8	1.33	66.2

Relación molar CMZ/medio: *1:3, [†]1:2, [‡]1:200.

Se realizaron en paralelo los experimentos correspondientes al enantiómero (+)-**CMZ** (Figura 5.4 y Tabla 5.2) observándose una ligera estereodiferenciación especialmente en el caso de AGAB.

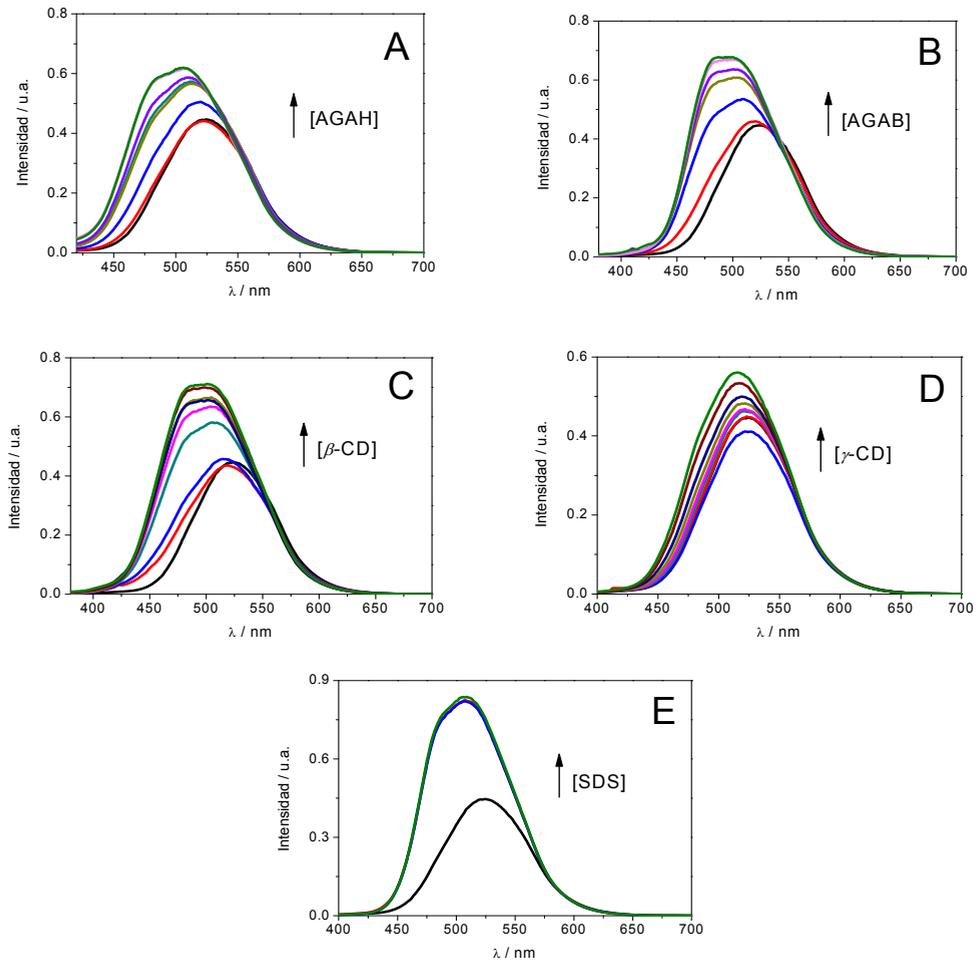


Figura 5.4. Espectros de fluorescencia de (+)-**CMZ** (6×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm, PBS/aire) en presencia de cantidades crecientes de **A:** AGAH (0 a 3 eq.), **B:** AGAB (0 a 2 eq.), **C:** β -CD (0 a 200 eq.), **D:** γ -CD (0 a 200 eq.), **E:** SDS (0 a 1.2×10^{-2} M).

Tabla 5.2. Datos de fluorescencia para (+)-**CMZ** en distintos medios microheterogéneos.

Medio	$\lambda_{\text{max em}}$ (nm)	ϕ_F	τ_F (ns)	$k_F \times 10^7$ (s ⁻¹)	E_s (kcal mol ⁻¹)
Ninguno	522	0.064	5.4	1.20	67.4
AGAH*	484-512	0.096	7.6	1.27	66.7
AGAB [†]	482-506	0.099	7.5	1.49	66.5
β -CD [‡]	482-510	0.110	7.2	1.53	67.8
γ -CD [‡]	508-525	0.080	6.6	1.25	66.7
SDS [‡]	495-516	0.112	8.6	1.33	65.9

Relación molar CMZ/medio: *1:3, [†]1:2, [‡]1:200.

5.2.2 Fotodegradación de CMZ

Tras determinar por fluorescencia que la inclusión de **CMZ** en los diferentes anfitriones tenía lugar, el fármaco encapsulado fue irradiado en atmósfera aeróbica con luz monocromática ($\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm). El curso de la reacción fue monitorizado registrando los cambios en el espectro de fluorescencia de los crudos (a $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm) a tiempos crecientes. La formación del producto de fotooxidación (**CMZ-SONO**, Figura 5.1) fue observada gracias a la aparición de una nueva banda de emisión de este compuesto a longitud de onda más corta ($\lambda_{\text{max}} = 420$ nm). La Figura 5.5 muestra los resultados obtenidos para (-)-**CMZ**. Es de destacar que en presencia de AGAH (Figura 5.5B) y AGAB (Figura 5.5C) la reacción fue claramente más lenta que en PBS (Figura 5.5A). El efecto de protección de β - (Figura 5.5D) y γ -CD (Figura 5.5E) aunque detectable, fue marcadamente menor. La menor fotorreactividad fue encontrada en micelas de SDS (Figura 5.5F).

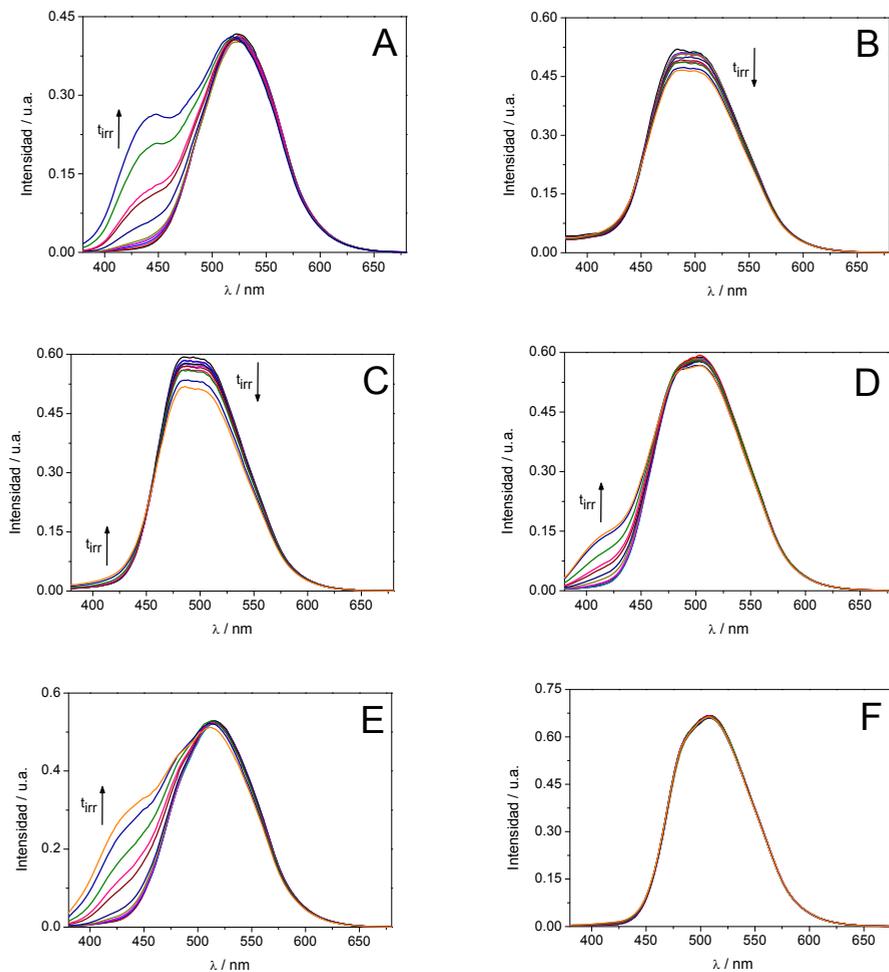


Figura 5.5. Espectros de fluorescencia obtenidos tras irradiar a 355 nm (–)–CMZ (6×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 330$ nm, PBS/aire, 0 a 20 min) en diferentes medios. **A:** Sin anfitrión, **B:** **CMZ/AGAH** relación molar 1:3, **C:** **CMZ/AGAB** relación molar 1:2, **D:** **CMZ/ β -CD** relación molar 1:200, **E:** **CMZ/ γ -CD** relación molar 1:200, **F:** **CMZ/SDS** relación molar 1:200.

En paralelo, se realizaron los mismos experimentos con el enantiómero (+)–CMZ (Figura 5.6). Se observan las mismas tendencias que para el enantiómero (–)–CMZ.

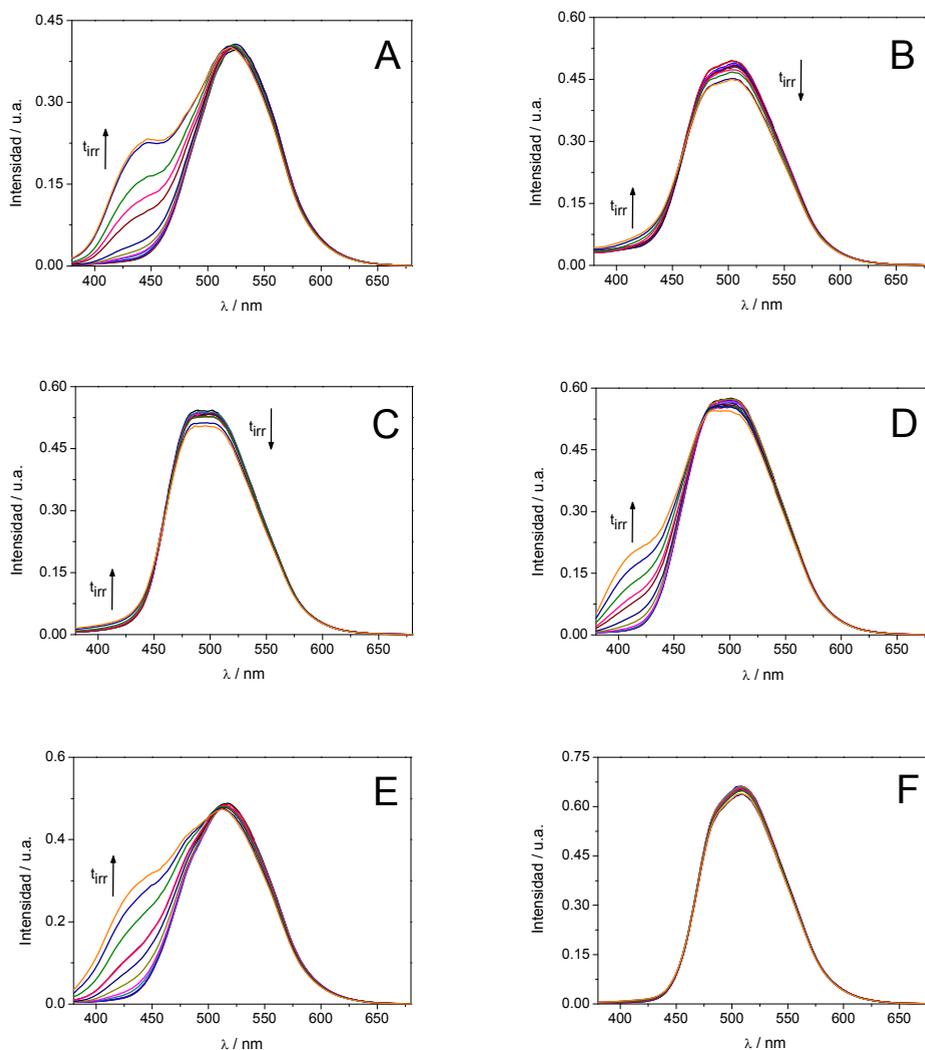


Figura 5.6. Espectros de fluorescencia obtenidos tras irradiar a 355 nm (+)-CMZ (6×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 330$ nm, PBS/aire, 0 a 20 min) en diferentes medios. **A:** Sin anfitrión, **B:** **CMZ/AGAH** relación molar 1:3, **C:** **CMZ/AGAB** relación molar 1:2, **D:** **CMZ/ β -CD** relación molar 1:200, **E:** **CMZ/ γ -CD** relación molar 1:200, **F:** **CMZ/SDS** relación molar 1:200.

El progreso de la reacción a diferentes tiempos de irradiación para (-)-**CMZ** se presenta en la Figura 5.7A. En todos los medios microheterogéneos el

proceso fue mucho más lento que en solución acuosa, con la menor conversión en SDS; para (+)-**CMZ** (Figura 5.7B) se observó un comportamiento similar.

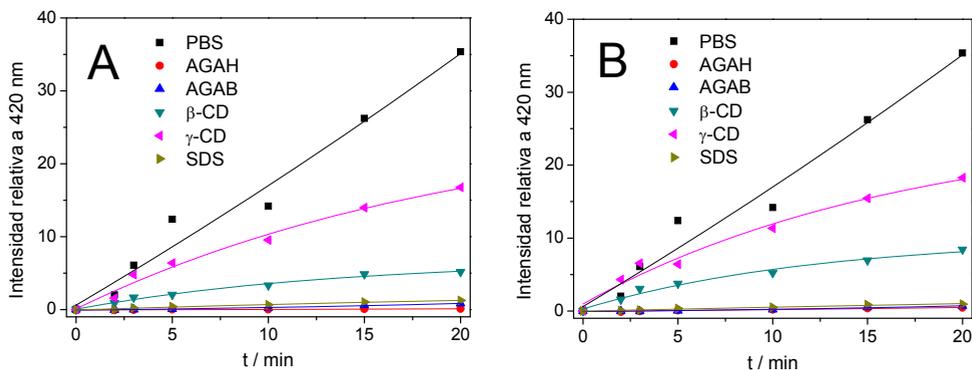


Figura 5.7. Fotooxidación en distintos medios. **A:** Para (-)-**CMZ**. **B:** Para (+)-**CMZ**.

5.2.3 Espectroscopía de absorción transitoria

Para investigar la participación de especies de tiempo de vida corto en la formación de **CMZ-SONO** se realizaron medidas de FDL de **CMZ** ($\lambda_{exc} = 355$ nm, PBS/aire) en los diferentes medios.

Los estudios se llevaron a cabo en primer lugar para (-)-**CMZ** (Figura 5.8). En PBS, se observaron bandas de absorción con máximos a 320 nm ($^3\text{CMZ}^*$) y a 290 nm (CMZ^{++}). En la región de 400–550 nm, los espectros de ambas especies solapan. Estas asignaciones están de acuerdo con datos análogos para derivados de **FTZ**.^{8,9,27,28}

Tras la adición de suficiente AGAH o AGAB, la contribución de CMZ^{++} fue prácticamente despreciable y $^3\text{CMZ}^*$ pasó a ser la especie dominante en el espectro (Figura 5.8A). Este efecto se observa claramente en la región 250–350 nm. En atmósfera aeróbica, los tiempos de vida de triplete dentro de la proteínas (24.3 μs para AGAH) y (32.6 μs para AGAB) fueron considerablemente mayores que en disolución (0.7 μs) (Figura 5.8B y Tabla 5.3). Esta tendencia también se observó en CDs, aunque con valores de τ_T mucho menores que en la proteína (2.0 y 1.2 μs para β - y γ -CD respectivamente). Los resultados para (+)-**CMZ** fueron

similares, excepto en el caso de AGAB donde se observó estereodiferenciación más acusada en nitrógeno; todos los tiempos se presentan en la misma figura y tabla que para (-)-CMZ.

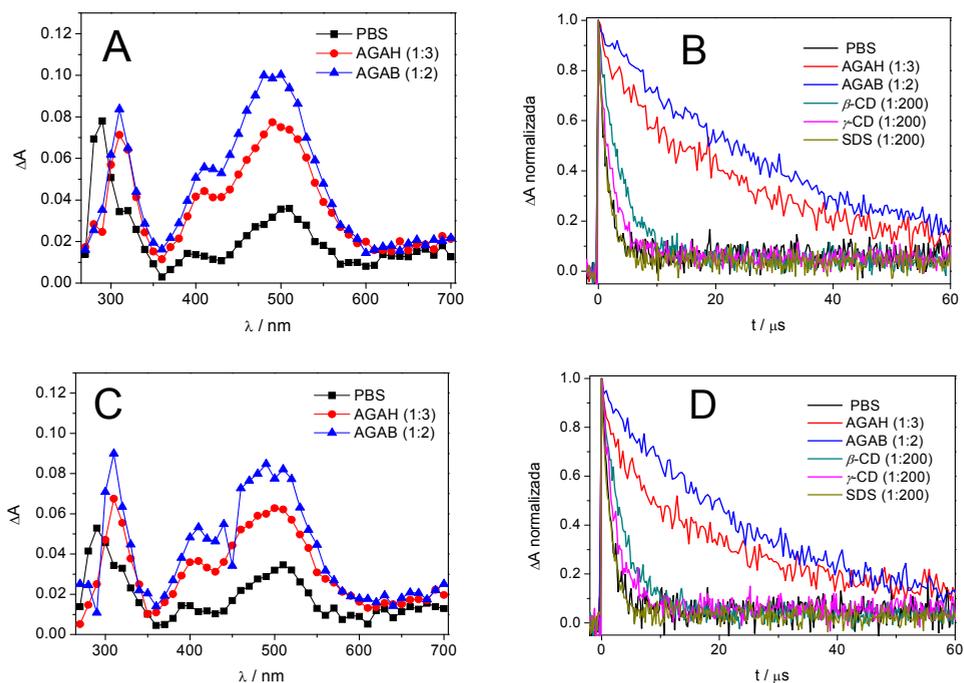


Figura 5.8. Fotólisis de destello láser de (-)- y (+)-CMZ ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, PBS/aire).

A: Espectros de absorción transitoria obtenidos $0.5 \mu\text{s}$ después del pulso del láser para para (-)-CMZ sólo y en presencia de 3 eq. de AGAH y 2 eq. de AGAB. **B:** Cinéticas de desaparición monitorizadas a $\lambda = 320 \text{ nm}$ para (-)-CMZ en ausencia o presencia de los diferentes anfitriones. **C:** Espectros de absorción transitoria obtenidos $0.5 \mu\text{s}$ después del pulso del láser para para (+)-CMZ sólo y en presencia de 3 eq. de AGAH y 2 eq. de AGAB. **D:** Cinéticas de desaparición monitorizadas a $\lambda = 320 \text{ nm}$ para (+)-CMZ en ausencia o presencia de los diferentes anfitriones.

Para obtener información sobre la protección que proporcionan los distintos microambientes, se determinó el tiempo de vida de triplete en presencia

de cantidades crecientes de oxígeno (utilizando atmósfera de oxígeno, aire y nitrógeno).

Tabla 5.3. Tiempos del estado excitado triplete (τ_T) y constante de desactivación por oxígeno (k_q) para (-) y (+)-**CMZ** en distintos medios microheterogéneos.

Medio	CMZ	τ_T (μ s) / N ₂	τ_T (μ s) / aire	τ_T (μ s) / O ₂	$k_q \times 10^8$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Ninguno	-	13.5	0.7	0.2	44.0
	+	13.5	0.7	0.2	36.5
AGAH*	-	103.4	24.3	7.4	0.88
	+	100.1	20.3	5.8	1.14
AGAB†	-	339.0	32.6	7.4	0.94
	+	389.8	27.1	6.4	1.08
β -CD‡	-	26.2	2.0	0.4	19.1
	+	27.3	2.0	0.4	16.7
γ -CD‡	-	19.7	1.2	0.3	22.9
	+	19.5	1.2	0.3	22.9
SDS‡	-	3.1	0.8	0.2	31.5
	+	4.0	0.8	0.2	23.8

Relación molar **CMZ**/medio: *1:3, †1:2, ‡1:200. [**CMZ**] = 1.25 x 10⁻⁴ M

En todos los sistemas microheterogéneos, la desactivación por oxígeno fue más lenta que en PBS ($k_q = 4.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$); el efecto fue más notable dentro de AGAs ($k_q = 0.9\text{--}1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que en CDs ($k_q = 1.9\text{--}2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, el hecho de que la mayor protección de la fotooxidación a **CMZ-SONO** se lograra dentro de micelas SDS, donde la desactivación del triplete por oxígeno solo fue levemente retardada ($k_q = 3.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), no sostiene una ruta de reacción en la que el ³**CMZ*** sea una especie intermedia clave, sino que apunta a que **CMZ-SONO** se forma cuando el oxígeno molecular atrapa al **CMZ***.²⁵ Así, la fotoionización ocurre en PBS y se inhibe parcialmente en CDs, mientras que en SDS y AGAs es prácticamente despreciable (Figura 5.9).

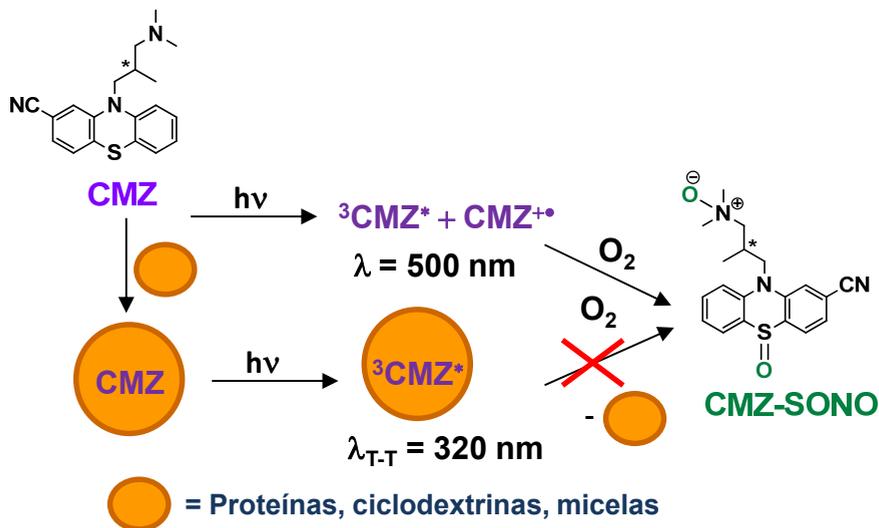


Figura 5.9. Esquema de la reacción.

5.3 Conclusiones

La fotooxidación de ciamemazina ocurre a través de una fotoionización y posterior “trapping” del catión radical resultante por oxígeno, dando lugar al correspondiente *N,S*-dióxido. Esta reacción es extremadamente sensible al medio y constituye una sonda apropiada para localizar este fármaco en diversos tipos de microambientes. El proceso de encapsulación se siguió por espectroscopia de fluorescencia, a través de un claro desplazamiento hipsocrómico, junto a un significativo aumento del rendimiento cuántico y el tiempo de vida. La fotólisis de destello láser revela importantes cambios asociados a la encapsulación, específicamente una generación del estado excitado triplete más selectiva, que resulta tener un tiempo de vida más largo. Como se podía anticipar por la naturaleza lipofílica de los microambientes empleados, la fotoionización para formar el catión radical se ve desfavorecida en todos ellos. Mediante irradiaciones en estado estacionario, la formación del *N,S*-dióxido se monitoriza fácilmente por espectroscopia de fluorescencia, por la aparición progresiva de una banda de emisión característica a longitudes de onda más cortas. Se observa una buena correlación entre las propiedades fotofísicas y la reactividad fotoquímica: así, la

menor velocidad de fotooxidación corresponde a **CMZ** en micelas SDS y AGAs, donde el fármaco está localizado en un dominio más hidrofóbico, difícilmente accesible desde el medio acuoso, y donde la fotoionización es casi despreciable.

5.4 Procedimiento experimental

5.4.1 Reactivos y disolventes

AGAH, AGAB, β -CD, γ -CD y SDS fueron adquiridos comercialmente. Los disolventes de grado espectroscópico y grado HPLC fueron utilizados sin purificación adicional. Las disoluciones de PBS (0.01 M, pH = 7.4) se prepararon disolviendo las pastillas comerciales en la cantidad apropiada de agua desionizada. La CMZ tartrato racémica fue proporcionada por Aventis (Vitry-sur-Seine, Francia) y guardada protegida de la luz y a T = 4°C.

5.4.2 Obtención de (-)- y (+)-CMZ

La base libre de **CMZ** fue obtenida por extracción líquido-líquido de **CMZ** tartrato, usando 1 M NaOH/CH₂Cl₂. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄, filtrada y evaporada a vacío para conseguir la mezcla racémica. Los dos enantiómeros (-)-**CMZ** y (+)-**CMZ** fueron aislados del racémico, usando HPLC con una columna semipreparativa Kromasil 100-TBB y hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (98:1:0.3:0.05, v/v/v/v) como eluyente y flujo de 2 mL/min (Ver cromatograma en Figura 5.10). La identificación de cada pico se realizó mediante polarimetría.

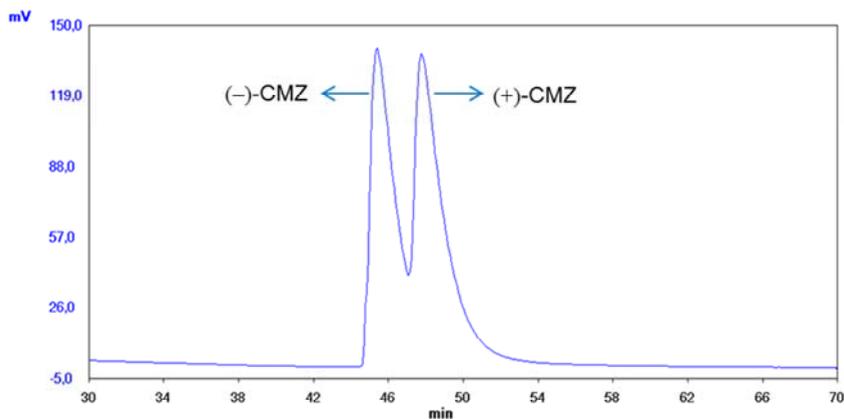


Figura 5.10. Cromatograma de HPLC obtenido durante la separación de los enantiómeros de la mezcla racémica de **CMZ** (fase estacionaria quiral, hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina 98:1:0.3:0.05 v/v/v/v como eluyente y detección UV).

5.4.3 Medidas de fluorescencia

Para realizar estos experimentos se utilizaron celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm y 4 mL de capacidad máxima. Las absorbancias se fijaron por debajo de 0.2 a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) y los experimentos se realizaron a 22°C. La instrumentación utilizada se describe al final de la tesis.

5.4.4 Fotólisis en estado estacionario

Las disoluciones de (-)- o (+)-**CMZ** $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ en PBS/aire se irradiaron a 355 nm usando luz de una lámpara de Xe a través de un monocromador a la longitud de onda seleccionada. El curso de las reacciones fue seguido registrando los cambios en fluorescencia utilizando una $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$.

5.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser

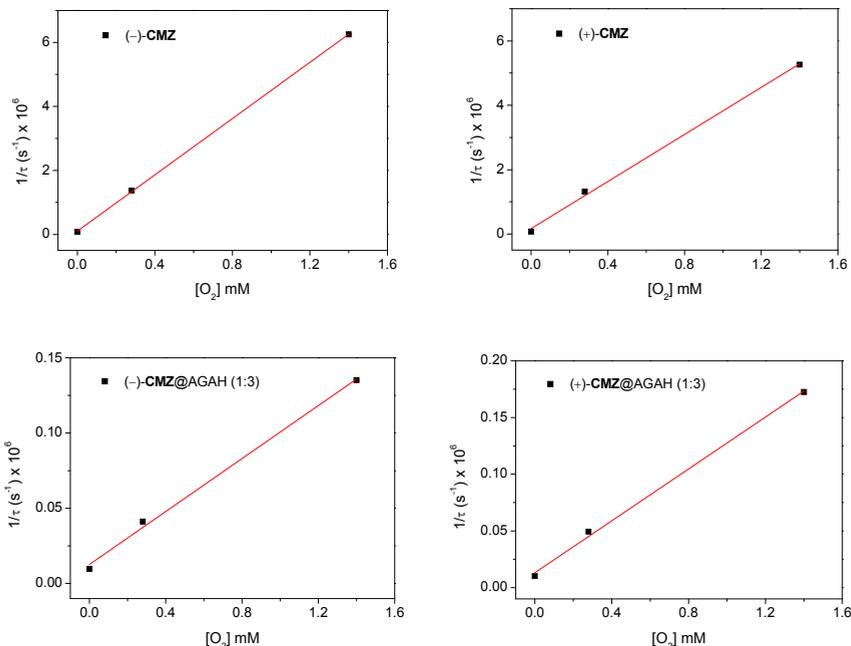
Las medidas de FDL se realizaron a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se fijó a 0.2 para la longitud de onda de excitación (355 nm), la potencia del láser fue de 15 mJ por pulso. Todos los espectros de

absorción transitoria se registraron utilizando celdas de cuarzo de 10 mm x 10 mm y 4 mL de volumen máximo. Las cinéticas de desaparición se monitorizaron a 320 nm. El valor de τ_T se determinó por ajuste de la cinética a 320 nm a una ecuación monoexponencial (Ecuación 5.1).

$$\Delta A = \Delta A_0 + Ae^{(t/\tau)} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

- Determinación de las constantes de desactivación por O_2 (k_q):

Las disoluciones conteniendo (-)- o (+)-**CMZ** ($A = 0.2$ a 355 nm) en presencia o ausencia de anfitrión se burbujearon con O_2 , aire o N_2 durante 15 minutos. Los tiempos de vida de triplete bajo las diferentes condiciones se obtuvieron por FDL como se acaba de describir. Para determinar las constantes de desactivación por oxígeno (k_q), se representó la inversa del tiempo de vida de triplete en función a la concentración relativa de oxígeno. La pendiente del ajuste lineal proporciona el valor de k_q (Figura 5.11), los valores se recogen en la Tabla 5.3.



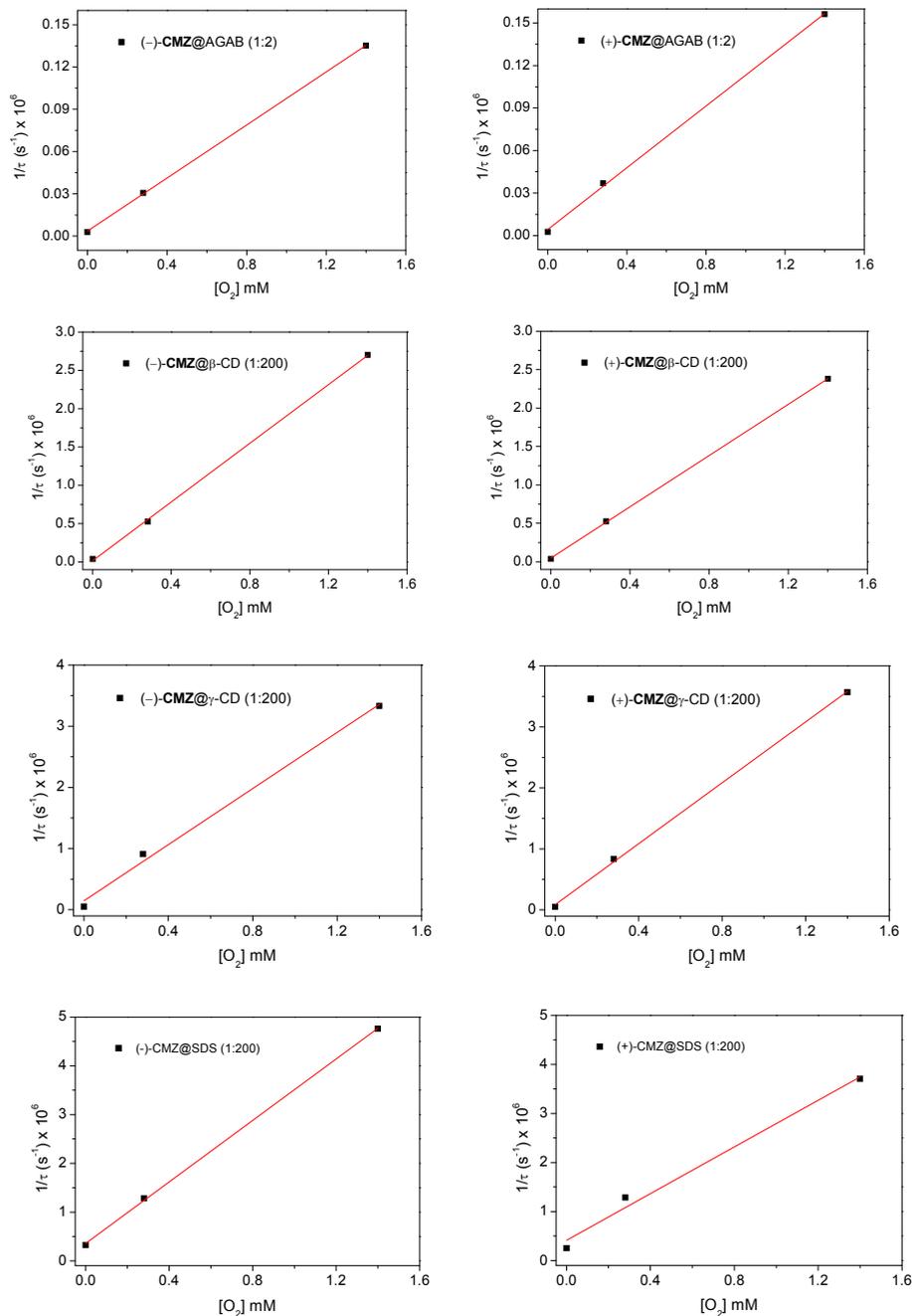


Figura 5.11. Representaciones para el cálculo de las constantes k_q por oxígeno de (-) y (+)-CMZ en PBS y los distintos medios microheterogéneos.

5.4.6 Caracterización espectroscópica de (-)- y (+)-CMZ

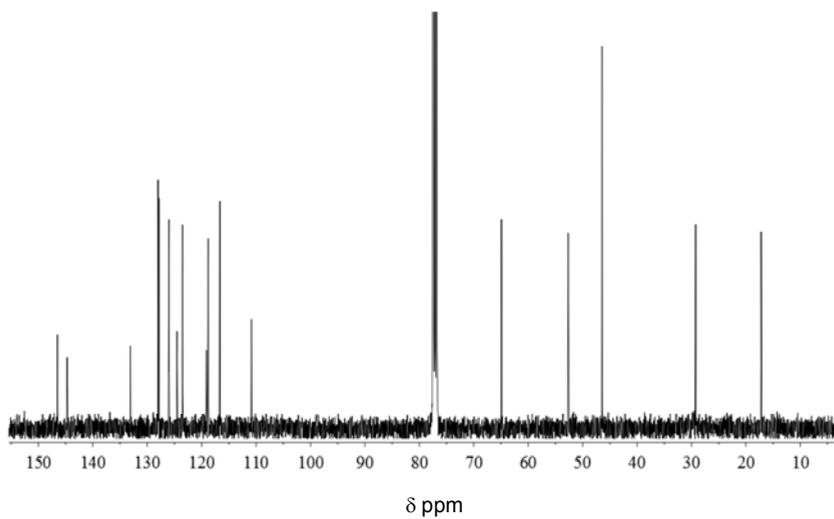
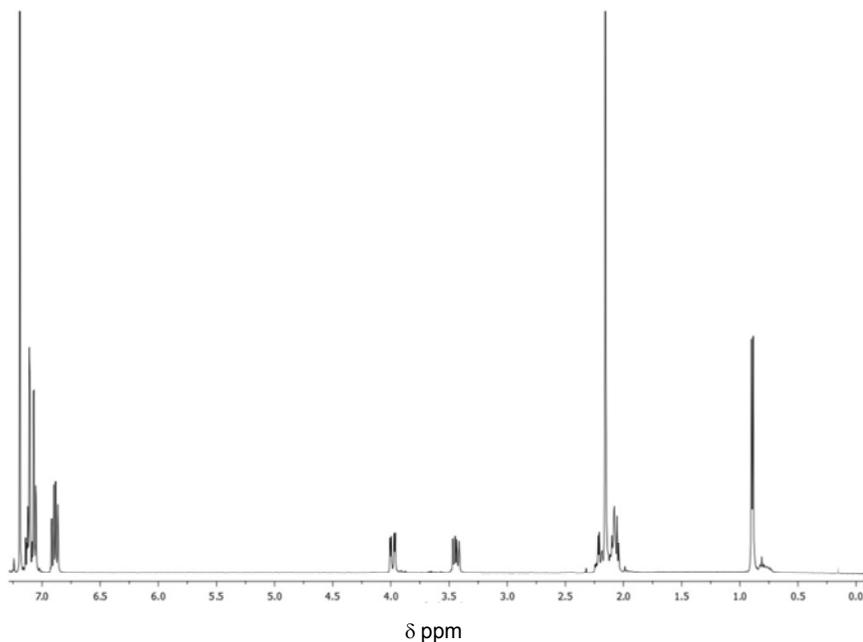
Espectro de absorción UV de CMZ $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 268 (4.3) y 330 (3.2).

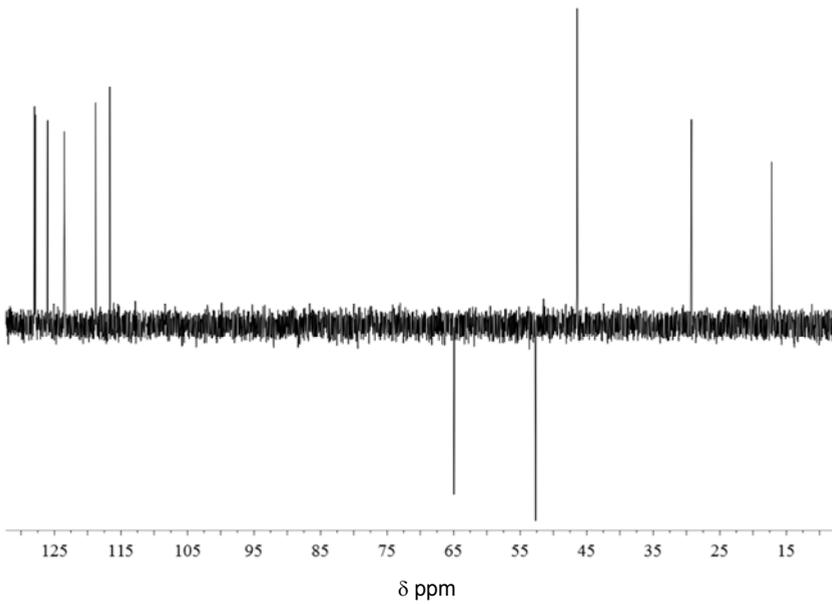
(-)-CMZ: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 7.12-7.21 (m, 5H), 6.93-6.99 (m, 2H), 4.05 (dd, $J_1 = 13.5$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J_1 = 13.5$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 2.06-2.39 (m, 9H), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 146.5, 144.7, 133.1, 128.0, 127.9, 127.8, 126.0, 124.5, 123.5, 119.1, 118.7, 116.6, 110.8, 64.9, 52.6, 46.4, 29.2, 17.2; **Masa exacta** calculada para C₁₉H₂₁N₃S: 324.1534 (MH⁺); encontrada 324.1523.

(+)-CMZ: RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 7.12-7.21 (m, 5H), 6.93-6.99 (m, 2H), 4.05 (dd, $J_1 = 13.5$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J_1 = 13.5$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 2.06-2.39 (m, 9H), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); **RMN-¹³C** (100 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 146.5, 144.7, 133.1, 128.0, 127.9, 127.8, 126.0, 124.5, 123.5, 119.1, 118.7, 116.6, 110.8, 64.9, 52.6, 46.4, 29.2, 17.2; **Masa exacta** calculada para C₁₉H₂₁N₃S: 324.1534 (MH⁺); encontrada 324.1538.

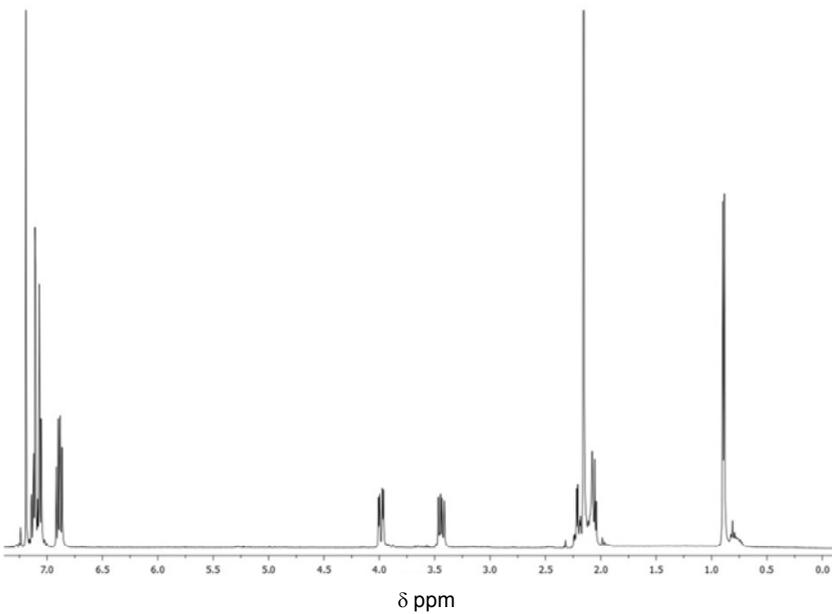
5.4.7 Espectros RMN- ^1H y ^{13}C

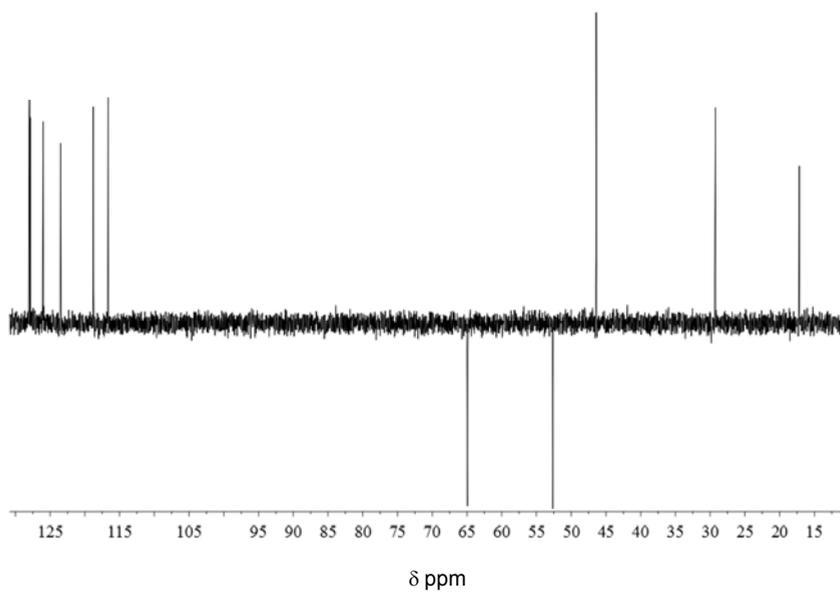
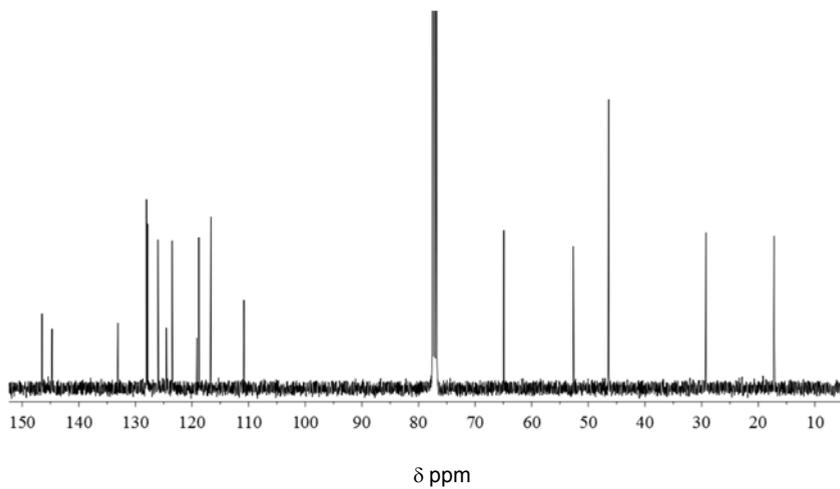
Espectros de RMN- ^1H , ^{13}C y DEPT de (-)-**CMZ** (CDCl_3)





Espectros de RMN- ^1H , - ^{13}C y DEPT de (+)-**CMZ** (CDCl_3)





5.5 Referencias bibliográficas

- (1) Feinberg, A. P.; Snuder, S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 1899.
- (2) Jaszczyszyn, A.; Gasiorowski, K.; Swiatek, P.; Malinka, W.; Cieoelik-Boczula, K.; Petrus, J.; Czarnik-Matusewicz, B. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 16.
- (3) Domínguez, J. N.; López, S.; Charris, J.; Iarruso, L.; Lobo, G.; Semenow, A.; Olson, J. E. P.; Rosenthal, J. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2726.
- (4) Aaron, J. J.; Gaye Seye, M. D.; Trajkovska, S.; Motohashi, N. *Top Heterocycl. Chem.* **2009**, *16*, 153.
- (5) White, N. D. *Am. J. Lifestyle Med.* **2013**, *7*, 189.
- (6) Onoue, S.; Kato, M.; Inoue, R.; Seto, Y.; Yamada, S. *Toxicol. Sci.* **2014**, *137*, 469.
- (7) Albin, A.; Fasani, E.; Glass, B. D.; Brown, M. E.; Drummond, P. M.; Royal Society of Chemistry., 1998.
- (8) Elisei, F. L.; Latterini, L.; Aloisi, G. G.; Mazzucato, U.; Viola, G.; Miolo, G.; D. Vedaldi, D.; Dall'Acqua, F. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 11.
- (9) García, C.; Piñero, L. E.; Oyola, R.; Arce, R. *Photochem Photobiol.* **2009**, *85*, 160.
- (10) Ronzani, F.; Trivella, A.; Arzoumanian, E.; Blanc, S.; Sarakha, M.; Richard, C.; Oliveros, E.; Lacombe, S. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 2160.
- (11) Fournier, T.; Medjoubi-N, N.; Porquet, D. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 157.
- (12) Peters, T. *All about albumins: biochemistry genetics and medical applications*; Academic Press: San Diego, 1995.
- (13) El-Gamal, S.; Wollert, U.; Müller, W. E. *J Pharm Sci.* **1983**, *72*, 202.
- (14) Miyoshi, T.; K. Sukimoto, K.; M. Otagiri, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *44*, 28.
- (15) Taheri, S.; Cogswell, L. P.; A. Gent, A.; Strichartz, G. R. *J. Pharm. Exp. Therap.* **2003**, *304*, 71.
- (16) Schill, G.; Wainer, I. W.; Barkan, S. A. *J. Liq. Chrom. A* **1986**, *365*, 73.
- (17) Mischita, T.; Franco, P.; Zhang, T. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 3627.
- (18) Hermansson, J.; Grahn, A. *J. Chrom. A* **1995**, *694*, 57.

- (19) Lutka, A. *Pharmazie* **2000**, *55*, 120.
- (20) Caetano, W.; Marcel, T. *J. Coll. Interf. Sci.* **2000**, *225*, 69.
- (21) Ghosh, H. N.; Sapre, A. V.; Palit, D. K.; Mittal, J. P. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2315.
- (22) Irie, T.; Sunada, M.; Otagiri, M.; Uekama, K. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1983**, *6*, 408.
- (23) Chankvetadze, B.; Kartoziya, I.; Burjanadze, N.; Bergenthal, D.; Lufmann, H.; Blaschke, G. *Chromatographia* **2001**, *53*, 290.
- (24) Cornilleau, V.; Domp Martin, A.; Michel, L.; Verneuil, L.; Leroy, D. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2000**, *16*, 62.
- (25) Morliere, P.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; Castell, J. V.; Santus, R. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 535.
- (26) Morliere, P.; Haigel, J.; Aissani, K.; Filipe, P.; Silva, J. N.; Santus, R. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 163.
- (27) García, C.; Smith, G. A.; McGimpsey, W. G.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10871.
- (28) Gao, Y.; Chen, J.; Zhuang, X.; Wang, J.; Pan, Y.; Zhang, L.; Yu, S. *Chem. Phys.* **2007**, *334*, 224.

Capítulo 6. Estudios fotofísicos y fotoquímicos de los metabolitos de clorpromazina

6.1 Introducción

El metabolismo de los xenobióticos tiene lugar gracias a la actividad enzimática de los organismos vivos. En este proceso, mediante una amplia gama de modificaciones químicas, los xenobióticos son transformados en derivados más hidrófilos preparados para ser excretados. Los cambios metabólicos son el resultado de dos procesos secuenciales: las reacciones de fase I, que introducen un nuevo grupo funcional en el xenobiótico original (oxidaciones, reducciones, hidrólisis, etc), y las de fase II, que consisten en conjugaciones de los grupos reactivos introducidos en la fase I (glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación, etc).

La fotosensibilización es el proceso por el que ocurre una alteración en una entidad molecular como resultado de la absorción de radiación por un fotosensibilizador. De este modo, el fotón absorbido se puede transformar en un agente biológico dañino, dando lugar a reacciones clínicas relacionadas con procesos fototóxicos, fotoalérgicos y/o fotocarcinogénicos, que desembocan en desórdenes biológicos importantes. El daño puede ocurrir por la modificación directa de las biomoléculas (isomerización, ruptura de enlaces, oxidación, etc.) o por la participación de radicales libres, especies reactivas de oxígeno, etc.

Los metabolitos pueden conservar el cromóforo principal del xenobiótico original, y con ello su actividad fotosensibilizadora; también puede ocurrir que las modificaciones químicas que ocurren durante los procesos metabólicos aumenten el potencial sensibilizador. Esto puede ocurrir debido a diversos factores: i) el desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción hacia las regiones UVA y visible, ampliando la fracción activa de luz solar; ii) la modificación de las propiedades fotofísicas de los estados excitados (rendimientos cuánticos, energías de los estados excitados, tiempos de vida, etc.) así como de su reactividad fotoquímica (carácter ácido-base, potencial redox, etc.); iii) una posible funcionalización que favorezca la unión covalente a biomacromoléculas (fotounión); iv) el aumento de la capacidad para generar especies reactivas de oxígeno o v) una afinidad diferente por las proteínas transportadoras, lo cual supone una modificación de la biodisponibilidad.

La clorpromazina (**CPZ**, Figura 6.1) es una fenotiazina utilizada durante décadas como fármaco anti-psicótico para el tratamiento de la esquizofrenia, debido a su relación favorable coste-utilidad y efectividad. Tras su administración, la **CPZ** es metabolizada por el cuerpo humano en varios derivados, entre ellos la **CPZ** desmetilada (**CPZ-MD**) y la **CPZ** didesmetilada (**CPZ-DD**), (Figura 6.1).^{1,2}

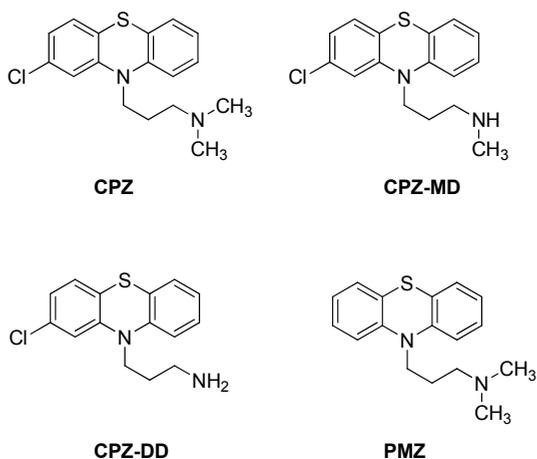


Figura 6.1. Estructuras químicas del fármaco **CPZ**, sus metabolitos **CPZ-MD** y **CPZ-DD** y su fotoproducto promazina (**PMZ**).

El espectro de absorción de la **CPZ** alcanza la zona UVA, por tanto puede ser excitada por luz solar. Se haya descrito que **CPZ** produce fotosensibilización, fototoxicidad e induce desórdenes como fotodermatitis aguda.³⁻¹²

Las propiedades de los estados excitados de la **CPZ** han sido investigadas en el pasado. La banda de fluorescencia en PBS muestra un máximo a 453 nm; el rendimiento cuántico de emisión (ϕ_F) es 0.0036 y el tiempo de vida 0.35 ns. El espectro de absorción transitoria obtenido mediante FDL, en condiciones anaerobias y a baja energía, posee una banda centrada a 460 nm, asignada al estado excitado triplete, con un ϕ_T de 0.73 y un tiempo de vida de 0.91 μ s en MeCN,^{13,14} mientras que el catión radical **CPZ**⁺• puede ser detectado a 525 nm.¹⁵⁻¹⁸ Las reacciones de **CPZ** con bio(macro)moléculas han sido objeto de

estudio tanto *in vivo* como *in vitro*, y se ha apuntado al fármaco como responsable de la agregación de proteínas o de producir daño al ADN.¹⁹⁻²³

En ocasiones, el microambiente proporcionado por proteínas puede proteger a los ligandos encapsulados en ellos, haciéndolos menos fototóxicos. Por ejemplo, el cinacalcet unido a la ASH reacciona en menor medida con oxígeno que la forma libre y por ello protege de los efectos nocivos causados por la formación de oxígeno singlete.²⁴

La unión de **CPZ** con ASs se ha investigado por diálisis de equilibrio y fluorescencia.²⁵⁻²⁷ Se ha descrito que la unión a proteína ocurre mayoritariamente en un sitio, con una constante de afinidad del orden de 10^4 M^{-1} .²⁸

El objetivo de este capítulo es investigar si la metabolización de **CPZ** en **CPZ-MD** y **CPZ-DD** está asociada con una modificación de fototoxicidad del fármaco de origen. Como estos metabolitos mantienen el cromóforo de la **CPZ**, la modulación del comportamiento fotobiológico sería el resultado de la modificación producida en la cadena *N*-sustituida que convierte a los metabolitos en especies con distinta reactividad intrínseca y menor hidrofobicidad, que resultaría en una menor unión a la proteína.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Síntesis de los metabolitos de CPZ

La síntesis de **CPZ-MD** se realizó en dos pasos siguiendo un procedimiento previamente descrito en la literatura que consiste en tratamiento con cloroformiato de 1-cloroetilo para dar lugar a una sustitución de un metilo, que posteriormente se trata con MeOH para dar lugar a **CPZ-MD** con buen rendimiento (Figura 6.2), (Ver parte experimental para más detalles).²⁹

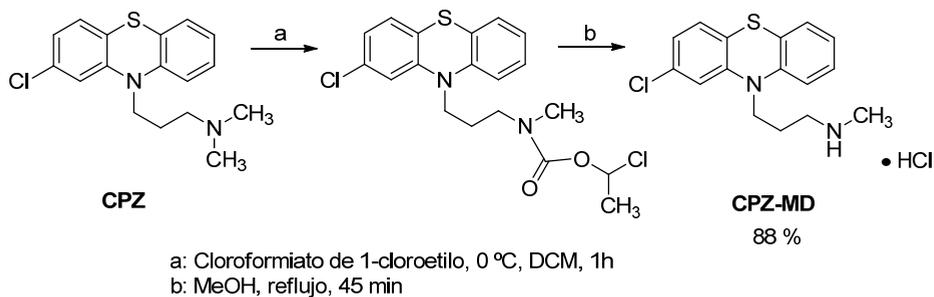


Figura 6.2. Esquema de la síntesis de **CPZ-MD**.

La síntesis de **CPZ-DD** (Figura 6.3), se realizó en un solo paso siguiendo el procedimiento experimental descrito en la bibliografía que consiste en la reducción del 3-(2-cloro-10*H*-fenotiazin-10-il)propanonitrilo con LiAlH_4 (Parte experimental).³⁰

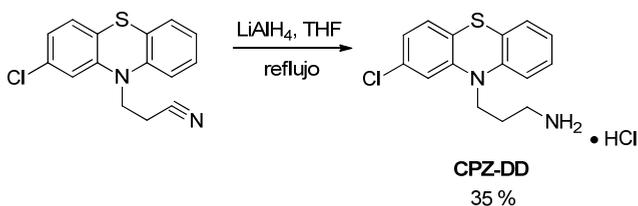


Figura 6.3. Esquema de la síntesis de **CPZ-DD**.

6.2.2 Comportamiento fotofísico de complejos metabolito@proteína

En primer lugar, se registraron los espectros de **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** y **PMZ** (utilizada como referencia) en PBS. En los espectros de absorción de **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** se observó la coincidencia en sus máximos a 254 y 305 nm mientras que en **PMZ** aparecen a 252 y 300 nm (Figura 6.4).

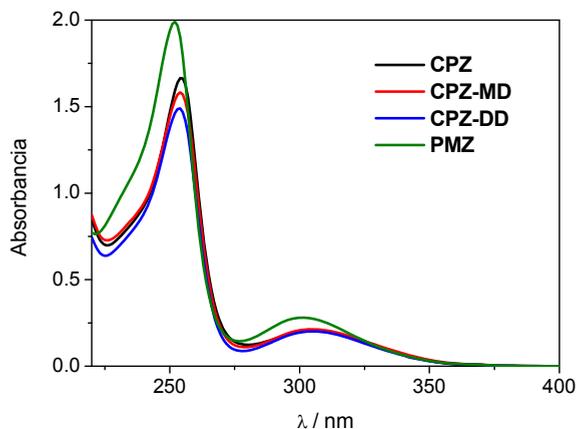


Figura 6.4. Espectros de absorción de la **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** (5×10^{-5} M) y **PMZ** (8×10^{-5} M) en PBS (pH = 7.4).

Los espectros de absorción de los cuatro compuestos en presencia de ASH se desplazan a λ mayores (Figura 6.5).

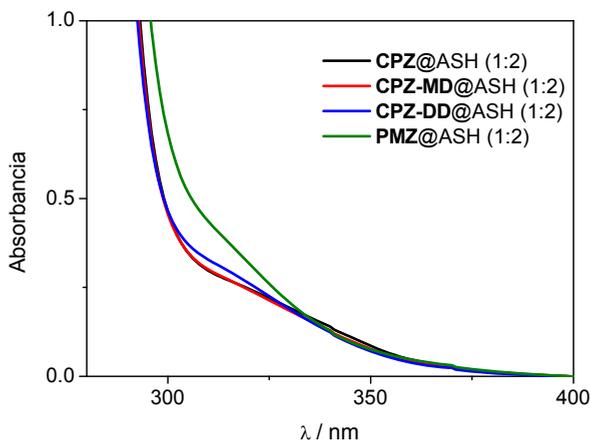


Figura 6.5. Espectros de absorción de la **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** (5×10^{-5} M) y **PMZ** (8×10^{-5} M) en presencia de ASH a relación molar (1:2).

La fluorescencia en estado estacionario en PBS/N₂ mostró bandas de emisión centradas a 453 nm para **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** y a 450 nm para **PMZ** (Figura 6.6).

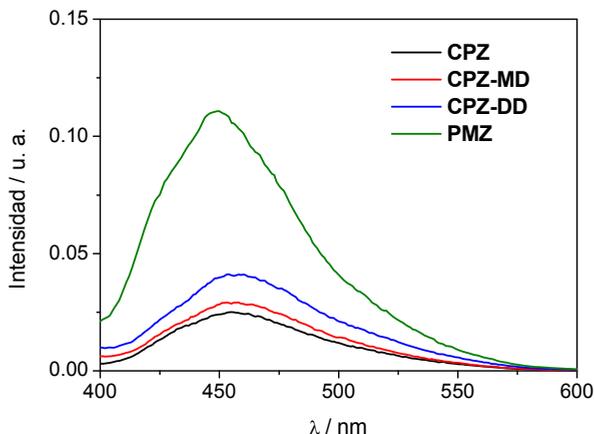


Figura 6.6. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$) de **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) y **PMZ** ($8 \times 10^{-5} \text{ M}$) con absorbancia 0.1 a 330 nm en PBS/N₂.

Como puede observarse, con respecto a la **CPZ**, la pérdida de un metilo (**CPZ-MD**) o de los dos (**CPZ-DD**) no produce cambios significativos en el espectro de emisión; sin embargo, la **PMZ** utilizada como modelo y que no posee Cl en la posición 2, exhibe un comportamiento distinto, con valores de ϕ_F mayores (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) de **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** y **PMZ** en PBS/N₂.

Compuesto	$\phi_F \times 10^{-3}$
CPZ	3.6
CPZ-MD	4.3
CPZ-DD	7.6
PMZ	16.0

Como referencia se tomó el ϕ_F de la **CPZ**.¹³

En presencia de ASH, no se observó un claro desplazamiento de los máximos de emisión, pero sí un aumento de la intensidad de la banda, indicando la formación del complejo CPZ@ASH (Figura 6.7). En estas condiciones no se

observaron diferencias destacables entre **CPZ** y sus metabolitos **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (Tabla 6.2).

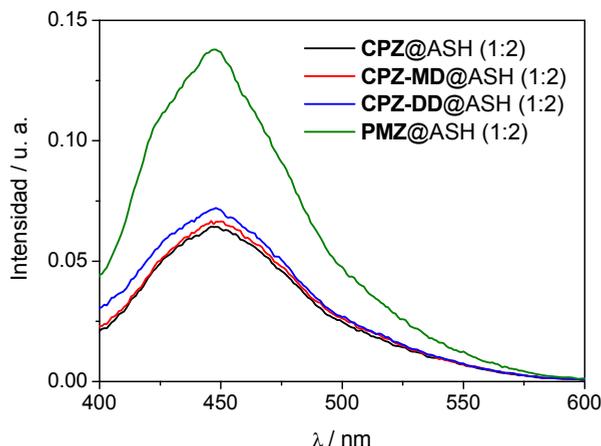


Figura 6.7. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$) de **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) y **PMZ** ($8 \times 10^{-5} \text{ M}$) en presencia de ASH a relación molar (1:2), PBS/N₂.

Tabla 6.2. Rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) para **CPZ**, **CPZ-MD**, **CPZ-DD** y **PMZ** en ASH, PBS/N₂.

	$\phi_F \times 10^{-3}$
CPZ@ASH (1:2)	6.4
CPZ-MD@ASH (1:2)	6.9
CPZ-DD@ASH (1:2)	8.4
PMZ@ASH (1:2)	17.8

Como referencia se tomó el ϕ_F de la CPZ.¹³

A continuación, se obtuvieron los espectros de absorción transitoria para **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (a concentración $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$) en PBS/N₂ en ausencia y presencia de ASH (Figura 6.8). Es de destacar, que para los tres compuestos (pero especialmente para el fármaco), la banda con máximo a 470 nm que corresponde al estado excitado triplete resultó más prominente en presencia de proteína.

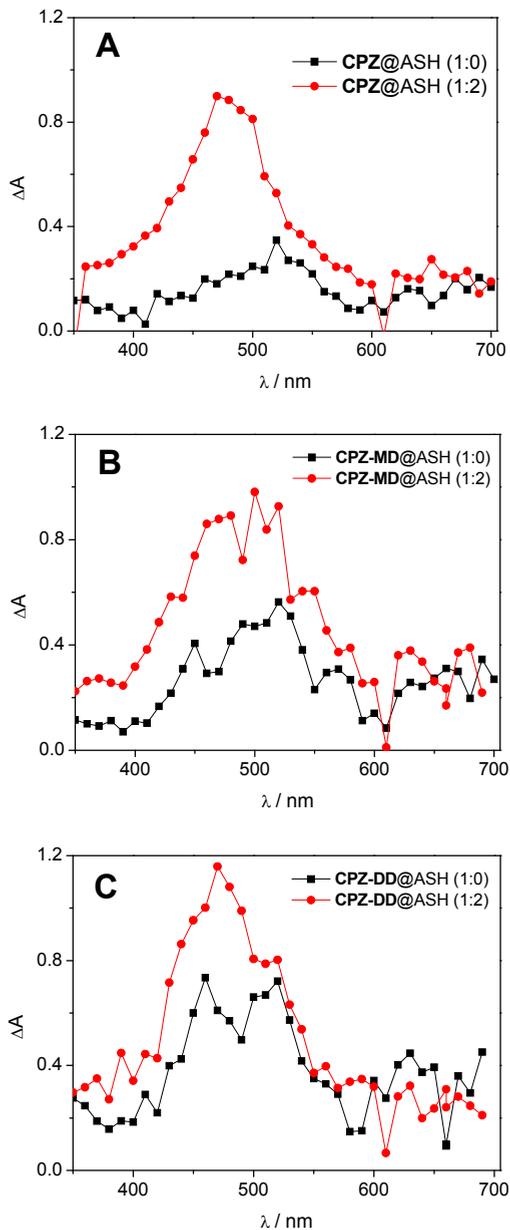
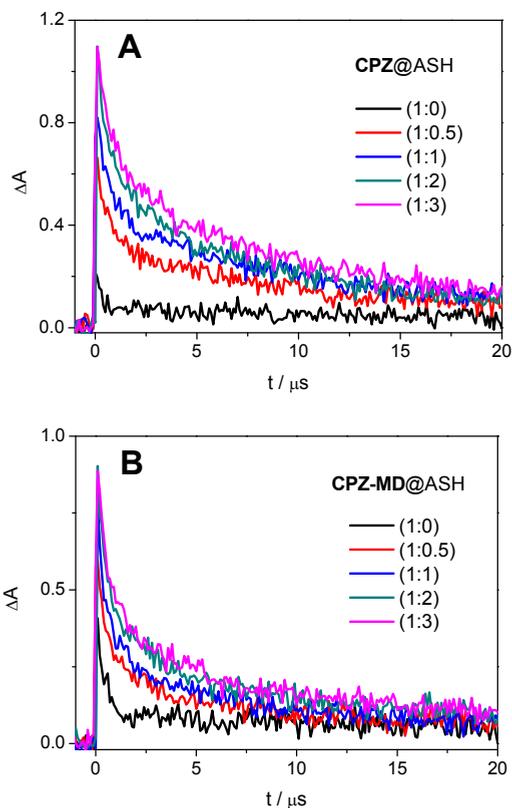


Figura 6.8. Espectros de absorción transitoria de **(A) CPZ**, **(B) CPZ-MD** y **(C) CPZ-DD**, con concentración 8×10^{-5} M ($\lambda_{exc} = 308$ nm PBS/aire) registrado $0.2 \mu s$ después del pulso del láser en ausencia de ASH o en presencia de la misma (relación molar fármaco/proteína 1:2).

La unión a proteína se monitorizó a través del aumento del valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ a $\lambda = 470 \text{ nm}$ en presencia de cantidades crecientes de ASH (Figura 6.9). Utilizando disoluciones que contenían **CPZ**, **CPZ-MD** o **CPZ-DD** y ASH (a relaciones molares entre 1:0 y 1:3). El fármaco **CPZ** exhibió mayor afinidad a la ASH, como demuestra el hecho de que la señal del $^3\text{CPZ}^*$, casi inexistente en PBS, aumenta de manera considerable tras adicionar solamente 0.5 equivalentes de ASH.



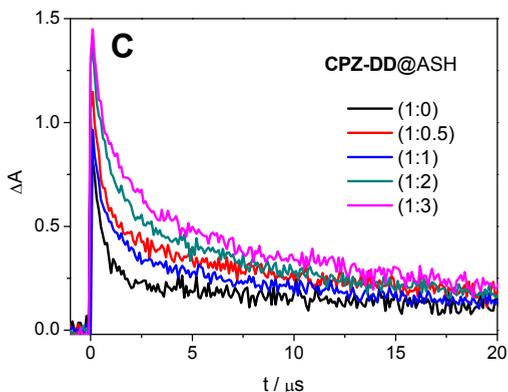


Figura 6.9. Cinéticas de desaparición de la señal a $\lambda = 470$ nm ($\lambda_{exc} = 308$ nm, PBS/aire) para (A) CPZ, (B) CPZ-MD y (C) CPZ-DD en presencia de cantidades crecientes de ASH.

El grado de unión relativo de CPZ y sus metabolitos a la proteína, se ha calculado mediante el valor $\Delta A_{m\acute{a}x}$ de la señal a $\lambda = 470$ nm en presencia de cantidades crecientes de ASH, representando el cociente $\Delta A / \Delta A_0$ para cada compuesto (Figura 6.10). Se observa que CPZ experimenta los cambios más acusados cuando se une a ASH y que se hace menos apreciable cuando crece el carácter hidrofílico de los metabolitos desmetilados.

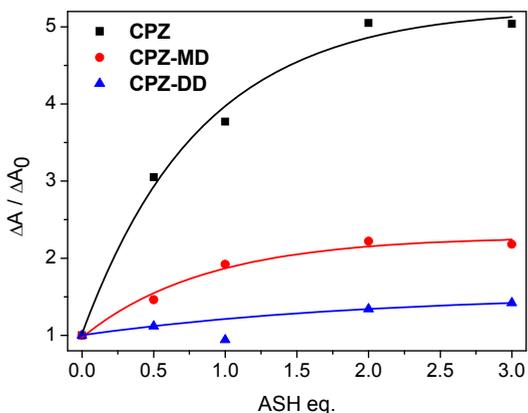
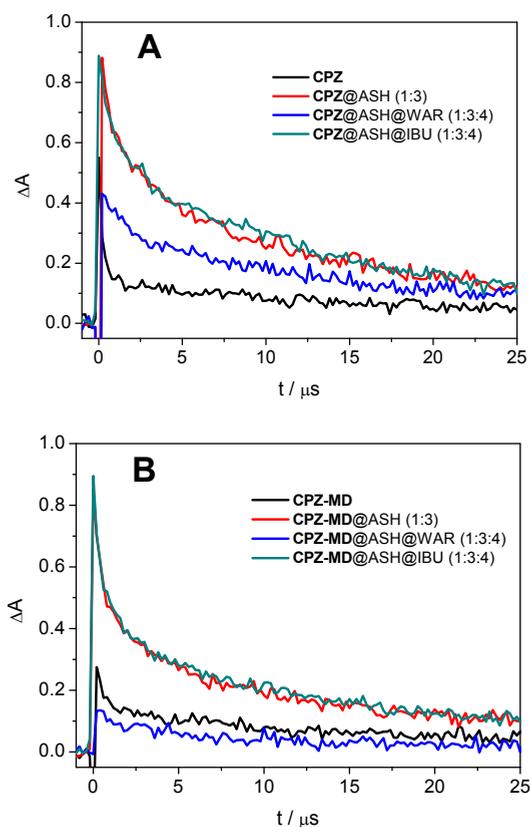


Figura 6.10. Unión relativa de CPZ, CPZ-MD y CPZ-DD a ASH.

Posteriormente, se utilizaron sondas de desplazamiento para investigar la naturaleza del sitio de unión de **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** a ASH. La adición de warfarina (WAR, sonda de sitio I) a una mezcla de **CPZ** y ASH resultó en una disminución significativa del valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ a $\lambda = 470$ nm (Figura 6.11A), lo que indicó el desplazamiento del fármaco, del sitio de unión de la proteína a la disolución. En cambio, la adición de una sonda de sitio II (ibuprofeno, IBU) no supuso cambio alguno del valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ a 470 nm (Figura 6.11A). Los resultados son consistentes con una preferencia por el sitio I de unión. Se observó la misma tendencia en los casos de **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (Figuras 6.11B-C).



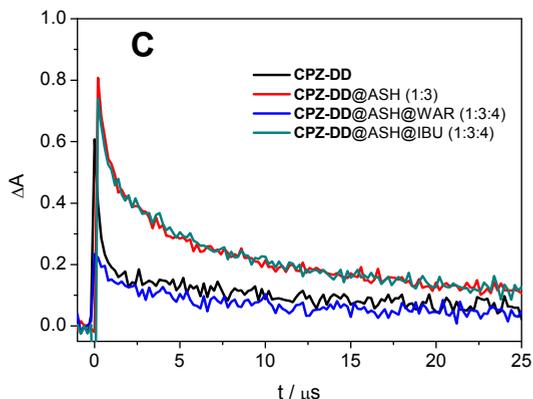
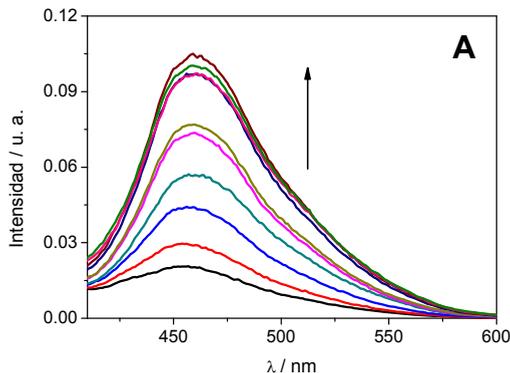


Figura 6.11. Cinéticas de desaparición de la señal a $\lambda = 470$ nm ($\lambda_{exc} = 308$ nm, PBS/aire) para (A) **CPZ**, (B) **CPZ-MD** y (C) **CPZ-DD** en presencia de ASH (1:3) y de sondas de sitio I (WAR) y sondas de sitio II (IBU) (1:4) de relación molar.

6.2.3 Irradiaciones en medio proteico

CPZ y sus metabolitos se irradiaron usando luz monocromática ($\lambda_{irr} = 330$ nm), en PBS/aire (Figura 6.12). El curso de la reacción fue monitorizado registrando los cambios en la emisión ($\lambda_{exc} = 330$ nm) a tiempos crecientes de irradiación. Es conocido que **CPZ** da lugar a dos fotoproductos: uno mayoritario resultante de deshalogenación (con máximo a 460 nm en el espectro de fluorescencia) y uno muy minoritario formado por oxidación (el sulfóxido, con máximo a 380 nm).³¹ Se observó la formación del fotoproducto de deshalogenación a 460 nm en todos los casos.



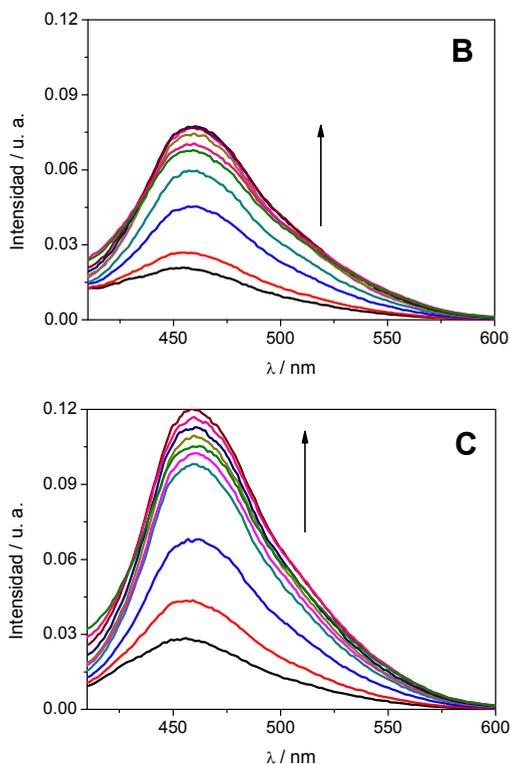


Figura 6.12. Espectros de fluorescencia obtenidos tras irradiar a 330 nm (A) CPZ, (B) CPZ-MD y (C) CPZ-DD (5×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 330$ nm, PBS/aire, 0 a 12 min).

Se realizaron irradiaciones similares en presencia de ASH (Figura 6.13). En todos los casos se observó nuevamente la formación del fotoproducto deshalogenado a 460 nm.

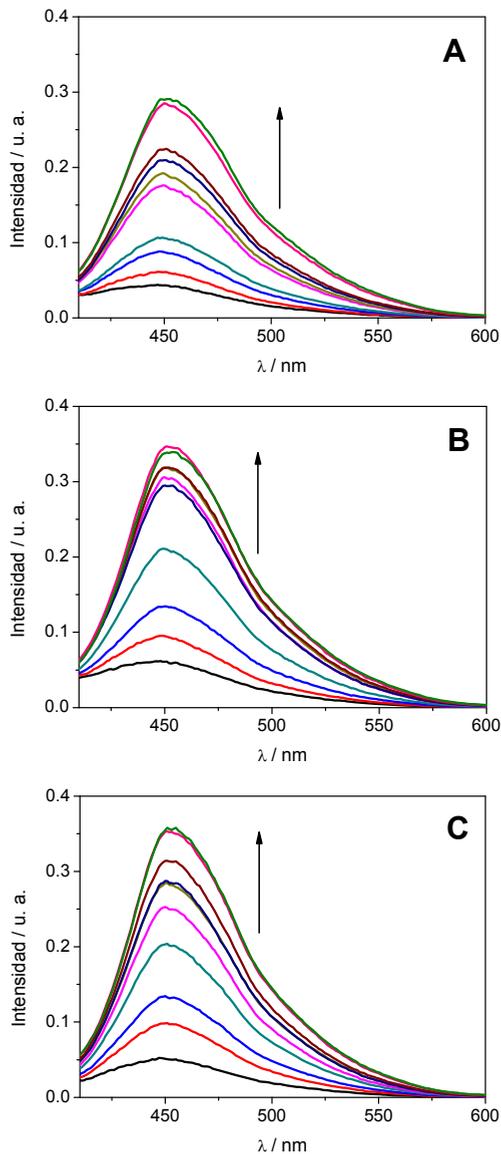


Figura 6.13. Espectros de fluorescencia obtenidos tras irradiar a 330 nm (A) **CPZ**, (B) **CPZ-MD** y (C) **CPZ-DD** (5×10^{-5} M, $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm, PBS/aire, 0 a 12 min) en presencia de 2 equivalentes de ASH.

Para investigar si **CPZ** y sus metabolitos se unían covalentemente a la proteína tras ser irradiados, se realizaron experimentos similares a los del Capítulo

3 de esta Tesis, en los que tras 10 minutos de irradiación se desnaturaliza la proteína mediante GndCl y posteriormente se filtra a través de sephadex. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.14.

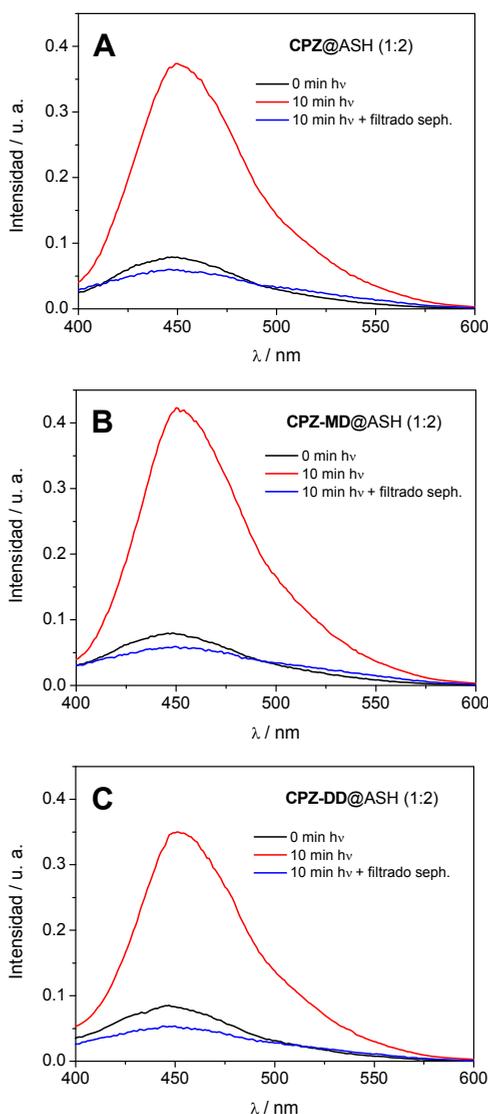


Figura 6.14. Espectros de fluorescencia de (A) CPZ, (B) CPZ-MD y (C) CPZ-DD en presencia de ASH (2 eq.) tanto no irradiados como irradiados antes y después del tratamiento con sephadex. [CPZ = CPZ-MD = CPZ-DD] = 5×10^{-5} M y ($\lambda_{irr} = \lambda_{exc} = 330$ nm).

En todos los casos parece observarse una ligera unión covalente de los compuestos a la proteína, si bien no se puede cuantificar de modo riguroso al trabajar con valores y rangos de rendimientos cuánticos tan bajos.

6.3 Conclusiones

Se ha estudiado el comportamiento fotofísico y fotoquímico del fármaco antipsicótico **CPZ** y de sus metabolitos desmetilados **CPZ-MD** y **CPZ-DD** en disolución y en presencia de ASH. En las mezclas huésped@ASH se evidenció un ligero aumento de ϕ_F en todos los casos indicando una unión supramolecular a ASH. Mediante la técnica de FDL se observó el aumento de $\Delta A_{\text{máx}}$ en las cinéticas del estado excitado triplete a medida que aumenta la cantidad de ASH. La complejación de todos los compuestos se evidencia por los valores de $\Delta A_{\text{máx}}$ especialmente en el caso de **CPZ** (el más hidrofóbico). Mediante el uso de sondas de desplazamiento se ha determinado que tanto **CPZ** como sus metabolitos se unen al sitio I de la ASH puesto que sólo la warfarina consiguió una disminución significativa del valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ a $\lambda = 470$ nm, indicando el desplazamiento del fármaco del sitio de unión de la proteína a la disolución. Al irradiar **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** en disolución acuosa y en presencia de proteína, se observa la formación de **PMZ**. El tratamiento de la mezcla de irradiación con GndCl y sephadex apunta a un bajo grado de unión fotoquímica covalente a la proteína.

6.4 Procedimiento experimental

6.4.1 Reactivos y disolventes

Clorpromazina (**CPZ**·HCl), promazina (**PMZ**·HCl), 3-(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)propanonitrilo, cloroformiato de 1-cloroetilo (ACE-Cl), albúmina sérica humana (ASH), cloruro de guanidinio (GndCl), tetrahidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), warfarina (WAR) e ibuprofeno (IBU) fueron adquiridos comercialmente. Los disolventes (metanol, 2-butanona, tetrahidrofurano, cloroformo) y el ácido clorhídrico fueron de grado analítico. Las disoluciones de PBS (0.01 M, pH = 7.4) fueron preparadas disolviendo las pastillas comerciales en la cantidad apropiada

de agua desionizada. Las columnas para filtrado por tamaño G-25 Sephadex (PD10) fueron adquiridas comercialmente.

6.4.2 Obtención de CPZ-MD y CPZ-DD

Para sintetizar **CPZ-MD** se siguieron dos pasos: en primer lugar se aisló la base libre de la **CPZ** de la sal de hidrocloreuro disolviendo 2 g de sal en agua y basificando con NH_4OH , obteniendo 1.8 g (5.6 mmol) de **CPZ**. Se disolvió en DCM y se añadieron 0.720 ml (6.7 mmol) de ACE-Cl poco a poco con agitación y a 0°C . La mezcla se mantuvo a reflujo durante una hora. Tras enfriar se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió nuevamente en DCM y se añadieron 50 mL de éter dietílico. La disolución se lavó con 20 mL de agua en tres ocasiones. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó el disolvente hasta la obtención cuantitativa del compuesto intermedio 3-(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)propilmetilcarbamato de 1-cloroetilo que se usó sin una posterior purificación en el paso siguiente. Para ello, se disolvió en metanol y se mantuvo a reflujo durante 45 min. Se dejó enfriar, se evaporó el disolvente y se recristalizó con 2-butanona obteniendo un rendimiento del 88% de sal hidrocloreuro de **CPZ-MD**.

La síntesis de **CPZ-DD** consistió en la reducción de 3-(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)propanonitrilo. Para ello, 200 mg (0.70 mmol) del compuesto se colocaron en un extractor soxhlet y se extrajo con THF anhidro conteniendo 61 mg (1.61 mmol) de LiAlH_4 . Para finalizar la reacción se añadió agua con 20% de hidróxido sódico (5 mL). Las sales inorgánicas se desecharon por filtrado y se realizó una extracción líquido-líquido con THF; la parte orgánica se secó con MgSO_4 y se añadieron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado para hacer precipitar la sal hidrocloreuro de **CPZ-DD**, que tras evaporación del disolvente y recristalización con etanol se obtuvo con un rendimiento del 35%.

6.4.3 Medidas de fotólisis de destello láser

Las medidas de FDL se realizaron a temperatura ambiente y la absorbancia de las muestras se fijó a 0.3 para la longitud de onda de excitación del láser (308 nm), utilizando una potencia de 30 mJ por pulso. Todos las cinéticas y los espectros de absorción transitoria se registraron utilizando celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm y 4 mL de capacidad máxima. Las cinéticas de desaparición se monitorizaron a 470 nm (³CPZ*).

6.4.4 Medidas de fluorescencia

Se utilizaron celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm y 4 mL de capacidad. La absorbancias se fijaron por debajo de 0.2 a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 330$ nm). Los experimentos se realizaron a 22°C.

6.4.5 Fotólisis en estado estacionario

Las disoluciones de **CPZ**, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (5×10^{-5} M) en presencia de ASH se colocaron en celdas de cuarzo para su irradiación utilizando la propia lámpara de Xenon del espectrofotómetro de 150W, irradiando a 330 nm de manera monocromática a distintos tiempos. El curso de las reacciones fue seguido registrando los cambios de los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 330$ nm).

6.4.6 Tratamiento con GndCl y filtrado sephadex

A los 3 mL de disolución conteniendo **CPZ** en presencia de ASH (2 eq.) se añadieron 1.72 g de GndCl 6 M, desnaturalizando la proteína, cambiando su estructura y rompiendo las interacciones no covalentes con el sustrato. Una vez esperado el tiempo para que el GndCl se disolviera completamente se procedió a su filtrado mediante una columna P-10 de Sephadex siguiendo el protocolo tal como marca la casa comercial. Primero haciendo pasar PBS (25 mL), y tras enrasar se añadieron 2.5 mL de la disolución **CPZ@ASH** + GndCl, tras enrasar y despreciar ese volumen, se eluyó con 3.5 mL de PBS, siendo recogido para medir

su absorción y emisión. El mismo procedimiento se siguió con **CPZ-MD@ASH** y **CPZ-DD@ASH**.

6.4.7 Caracterización espectroscópica de CPZ-MD y CPZ-DD

Espectro de absorción UV de CPZ, CPZ-MD y CPZ-DD $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\log \epsilon$): 254 (4.5) y 306 (3.6).

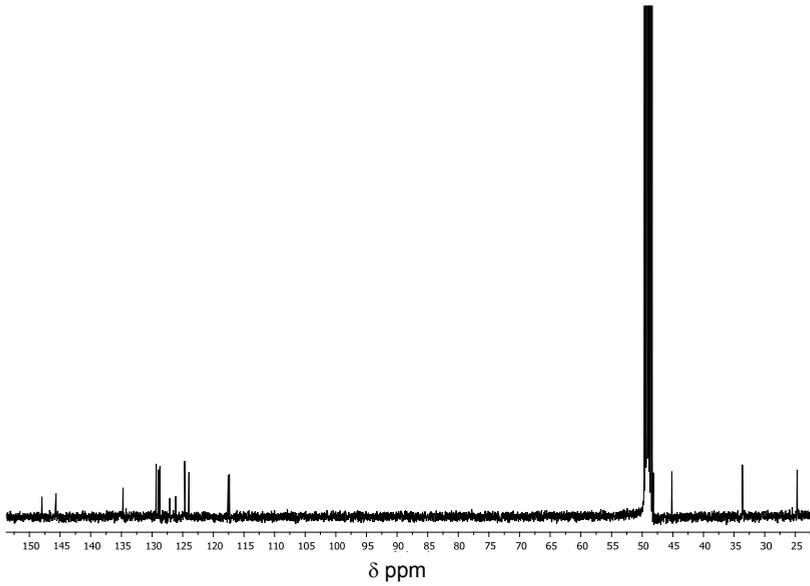
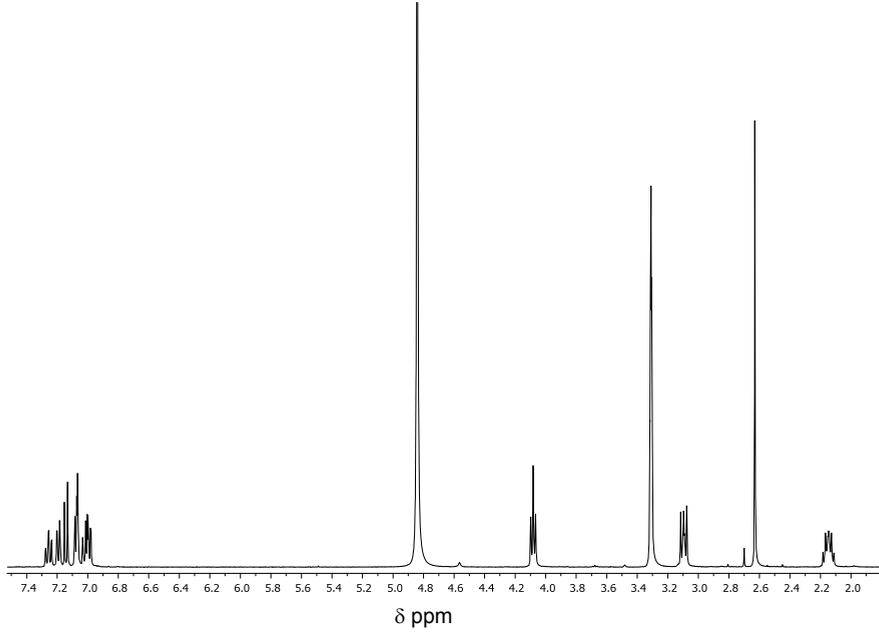
3-(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)-N-metilpropan-1-amina (**CPZ-MD**). **RMN-¹H** (400 MHz, CD₃OD) (δ , ppm): 7.22 – 7.29 (m, 1H), 7.19 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.04 – 7.10 (m, 2H), 7.01 (ddd, $J = 10.2, 7.8, 1.5$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.09 (dd, $J = 9.1, 6.9$ Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.15 (tt, $J = 12.7, 6.4$ Hz, 2H); **RMN-¹³C** (100 MHz, CD₃OD) (δ , ppm): 148.0, 145.7, 134.7, 129.3, 129.0, 128.7, 127.1, 126.2, 124.7, 124.0, 117.6, 117.4, 48.2, 45.1, 33.7, 24.7; **Masa exacta** calculada para C₁₆H₁₇N₂SCl: 304.0801 m/z [M-HCl]⁺ encontrada 304.0788.²⁹

3-(2-cloro-10H-fenotiazin-10-il)-propan-1-amina (**CPZ-DD**). **RMN-¹H** (300 MHz, CD₃OD) (δ , ppm): 7.25 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.04 – 7.10 (m, 2H), 6.95 – 7.04 (m, 2H), 4.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.98 – 3.09 (m, 2H), 2.13 (dq, $J = 14.2, 6.3$ Hz, 2H); **RMN-¹³C** (75 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 148.0, 145.7, 134.7, 129.3, 128.92, 128.6, 127.0, 126.1, 124.6, 123.9, 117.6, 117.4, 45.2, 38.6, 26.0.

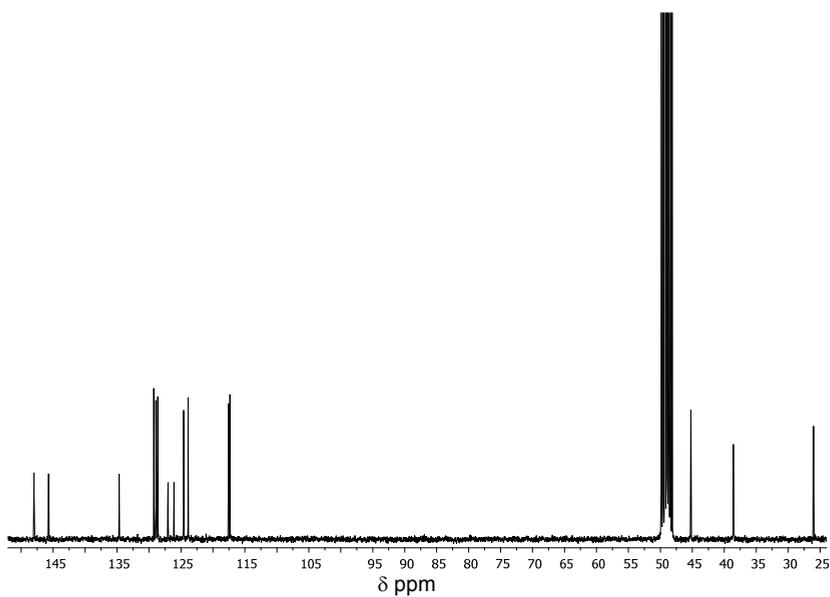
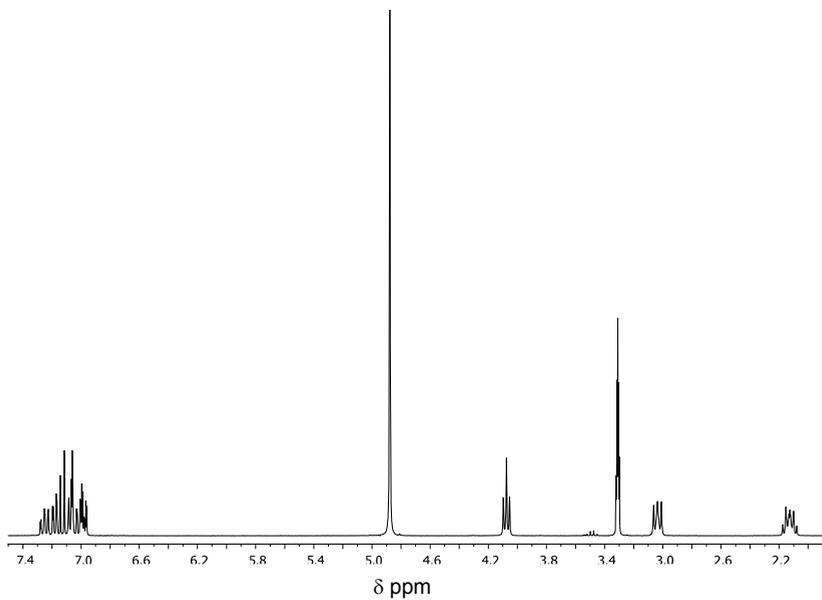
..

6.4.8 Espectros RMN-¹H y -¹³C

Espectros de RMN-¹H y -¹³C de CPZ-MD (CD₃OD)



Espectros de RMN-¹H y -¹³C de CPZ-DD (CD₃OD)



6.5 Referencias bibliográficas

- (1) Fang, J.; Gorrod, J. W. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1999**, *19*, 491.
- (2) Hubbard, J. W.; Midha, K. K.; Hawes, E. M.; McKay, G.; Marder, S. R.; Aravagiri, M.; Korchinski, E. D. *Br. J. Psychiatry* **1993**, *163*, 19.
- (3) Ben-Hur, E.; Pager, A.; Green, M.; Rosenthal, I. *Chem. Biol. Interact.* **1980**, *29*, 223.
- (4) Bunce, N. J.; Kumar, Y.; Ravanal, L. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 202.
- (5) Chignell, C. F.; Motten, A. G.; Buettner, G. R. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *64*, 103.
- (6) Dhanasekaran, S.; Kar, S. J.; Yadav, S. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neur. Dis.* **2015**, *5*, 34.
- (7) Eberlein-König, B.; Bindl, A.; Przybilla, B. *Dermatology* **1997**, *194*, 131.
- (8) Emmert, B.; Schauder, S.; Palm, H.; Hallier, E.; Emmert, S. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2007**, *14*, 329.
- (9) Gocke, E. *Mut. Res.-Rev. Gen. Toxicol.* **1996**, *366*, 9.
- (10) Jung, E. G. *Archiv. Klinisch. Experim. Dermatol.* **1970**, *237*, 501.
- (11) Kochevar, I. E. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77*, 59.
- (12) Rai, V.; Dayan, N.; Michniak-Kohn, B. *Toxicol. in vitro* **2011**, *25*, 538.
- (13) García, C.; Oyola, R.; Piñero, L. E.; Arce, R.; Silva, J.; Sánchez, V. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3360.
- (14) Navaratnam, S.; Parsons, B. J.; Phyllips, G. O.; Davies, A. K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **1978**, *74*, 1811.
- (15) García, C. C.; Smith, G. A.; McGimpsey, W. G.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10871.
- (16) Nath, S.; Sapre, A. V. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 138.
- (17) Piette, J.; Decuyper, J.; MervilleLouis, M. P. *Biochimie* **1986**, *68*, 835.
- (18) Rosenthal, I.; Ben-Hur, E.; Prager, A.; Riklis, E. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 591.
- (19) Buszman, E.; Beberok, A.; Rozanska, R.; Orzechowska, A. *Pharmazie* **2009**, *63*, 372.
- (20) de Mol, N. J.; Busker, R. W. *Chem.-Biol. Interact.* **1984**, *52*, 79.

- (21) Mervilleleouis, M. P.; Decuyper, J.; Piette, J.; Calberg-Bacq, C. M.; Van de Vorst, A. *Invest. Oftalm. Vis. Sci.* **1984**, *25*, 573.
- (22) Schoonderwoerd, S. A.; Beijersbergen Van Henegouwen, G. M. J.; Van Belkum, S. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 659.
- (23) Wolnicka-Glubisz, A.; Lukasik, M.; Pawlak, A.; Wielgus, A.; Niziolek-Kierecka, M.; Sarna, T. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 241.
- (24) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158.
- (25) Silva, D.; Cortez, C. M.; Louro, S. R. W. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2004**, *37*, 963.
- (26) Silva, D.; Cortez, C. M.; Louro, S. R. W. *Spectrochim. Acta A* **2004**, *60*, 1215.
- (27) Verbeeck, R. K.; Cardinal, J. A.; Hill, A. G.; Midha, K. K. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 2565.
- (28) Lazaro, E.; Lowe, P. J.; Briand, X.; Faller, B. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2009.
- (29) Kitamura, K.; Fujitani, K.; Takahashi, K.; Tanaka, Y.; Hirako, S.; Kotani, C.; Hashimoto, T.; Takegami, S. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2000**, *43*, 865.
- (30) Zhou, Z.; Franz, A. W.; Bay, S.; Sarkar, B.; Seifert, A.; Yang, P.; Wagener, A.; Ernst, S.; Pagels, M.; Muller, T. J. J.; Thiel, W. R. *Chem. Asian. J.* **2010**, *5*, 2001.
- (31) Kochevar, I. E.; Hom, J. *Photochem. Photobiol.* **1983**, *37*, 163.

Capítulo 7. Instrumentación

7.1 Instrumentación general

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** de protón y carbono (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) se registraron utilizando un espectrómetro Bruker Avance III-400 y Magnet System 400 Ascend/R, utilizando como disolvente cloroformo, dimetilsulfóxido o metanol deuterados. Los valores de desplazamiento químico (δ), expresados en partes por millón (ppm), son relativos a la señal residual del cloroformo no deuterado a 7.26 ppm, para el caso del cloroformo deuterado. En los espectros realizados en dimetilsulfóxido deuterado se usó como referencia 2.5 ppm y para el metanol deuterado la señal residual del metanol no deuterado a 3.3 ppm. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios (Hz).

Los análisis de **cromatografía de gases-espectrometría de masas** se registraron con un espectrómetro compuesto de los siguientes equipos: Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, Hewlett Packard HP 6890 Series GC System y Agilent Technologies 7683 Series Injector.

Para la separación y purificación semipreparativa por **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC) se utilizó un cromatógrafo JASCO UV-1575 intelligent UV/Vis Detector, JASCO PU-2080 Plus intelligent HPLC Pump, JASCO LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit y JASCO DG-2080-54 4-Line Degasser. Con fase estacionaria quiral o de fase reversa según el caso. Para seguir cinéticas de irradiación y/o poner a punto métodos de separación se utilizó un HPLC analítico Waters 600 con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996.

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

La determinación de la **masa exacta** se realizó en un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) con un inyector automático acondicionado a 4 °C. El espectrómetro ACQUITY Waters™ XevoQToF (Waters Corp.) se conecta al sistema UPLC a través de una interfaz de ionización por electrospray (ESI). La fuente ESI se hizo funcionar en modo de ionización positiva o negativa según el

caso, con un voltaje capilar de 3.0 kV. Los flujos de gas de cono y desolvatación fueron 100 L h^{-1} y 800 L h^{-1} , respectivamente. Todos los datos se recogieron en modo Centroide y se adquirieron usando el software Masslynx™ (Waters Corp.). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en el ITQ de la Universitat Politècnica de València.

7.2 Instrumentación fotoquímica

Los espectros de **absorción ultravioleta-visible** (UV-vis) se registraron en un espectrofotómetro JASCO modelo V-650.

Para los experimentos de **fluorescencia en estado estacionario** se utilizó un espectrofluorímetro JASCO modelo FP-8500, equipado de un SCE-846 y una lámpara de Xenón de 150 W.

Las medidas de **fluorescencia en tiempo resuelto** se realizaron en un espectrofluorímetro EasyLife X (Optical Building Blocks) con un detector PTI de resolución temporal en la escala de nanosegundos, utilizando lámparas de excitación LED de distintas longitudes de onda así como filtros para recortar el espectro por debajo de la longitud de onda deseada.

La **irradiación fotoquímica en estado estacionario** de los compuestos se realizó en un fotorreactor multilámpara Luzchem, provisto con 10 lámparas, situando 5 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. Para los experimentos irradiando con luz monocromática se empleó la lámpara de Xenón de 150 W, que permite el paso de la luz de λ seleccionada con un monocromador.

Para los experimentos de **fotólisis de destello láser** (FDL) se utilizaron dos equipos diferentes: un láser pulsado Nd-YAG (L52137V LOTIS TII) con duración de pulso de 10 ns y energía 10 - 15 mJ/pulso para la excitación a 355 nm

o un láser excímero de XeCl (LEXTRA 50 Lambda Physik Laser Technik), con duración ca. 17 ns y energía 30 mJ/pulso para la excitación a 308 nm. En ambos casos, se empleó una lámpara de Xenón Oriel Lo255 (Statford, CT) como fuente de luz para el análisis de las especies transitorias. El sistema de FDL consiste en un láser pulsado, una lámpara de Xe, 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 Tektronik TDS-640A. La señal fue transferida a un ordenador personal donde los datos se trataron mediante el programa Onda.

Conclusiones

Conclusiones generales

De la presente tesis doctoral que se enmarca dentro de la fotofísica y la fotoquímica de fármacos que poseen un cromóforo de tipo carbazol (**CBZ**) o fenotiazina (**FTZ**) en medios biomiméticos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- A) Se han encontrado dos sitios diferentes para la unión del éster metílico del caprofeno (**CPFMe**) a la ASB. Ello se obtiene monitorizando la banda de $^3\text{CPFMe}^*$ a 430 nm y mediante un ajuste de dos términos monoexponenciales, donde el tiempo de vida más corto es atribuido al sitio I. No se observa estereodiferenciación en los tiempos de vida de triplete medidos mediante fotólisis de destello láser en presencia de ASB; en cambio, en AGAB, el enantiómero (*S*) exhibió un τ_T mucho menor que (*R*)-**CPFMe**. De los experimentos de fotólisis en estado estacionario de (*R*)- y (*S*)-**CPFMe** en AGAB (1:2) se observó que fotounión covalente, en mayor grado para (*S*)-**CPFMe**. El mecanismo propuesto relaciona la fotodeshalogenación reductiva desde el estado excitado triplete de (*S*)-**CPFMe**, dando lugar a la formación de un aducto covalente (*S*)-**CBZMe**-AGAB.
- B) La fotodeshalogenación de cloroaromáticos puede producirse desde el estado excitado triplete, incluso cuando su energía es insuficiente para provocar la ruptura homolítica C-Cl. Aquí se proporciona una prueba clara que correlaciona el “self-quenching” del estado excitado triplete observado de las diadas **CPF-CPF** y **CPF-CBZ** basadas en clorocarbazol con la fotorreactividad, a través de transferencia electrónica intramolecular. La fotodeshalogenación reductiva ocurre a través de la formación de especies con separación de carga. Las tendencias observadas en los tiempos de vida de triplete, así como los efectos del disolvente en la fotorreactividad están totalmente de acuerdo con el mecanismo propuesto.

- C) La fotooxidación de ciamemazina (**CMZ**) ocurre a través de una fotoionización y posterior “trapping” del catión radical resultante por oxígeno, dando lugar al correspondiente *N,S*-dióxido. Esta reacción es extremadamente sensible al medio y constituye una sonda apropiada para localizar este fármaco en diversos tipos de microambientes. El proceso de encapsulación en AGAs, CDs y micelas SDS puede ser monitorizado por un desplazamiento hipsocrómico de la banda de fluorescencia. Los experimentos de fotólisis de destello láser revelan importantes cambios asociados a la encapsulación, principalmente una generación del estado excitado triplete más selectiva, con valores de τ_T más largos. La fotoionización a **CMZ⁺*** está desfavorecida en medios biomiméticos, debido al ambiente lipofílico. La menor velocidad de fotooxidación corresponde a **CMZ** en micelas SDS y AGAs.
- D) Se ha monitorizado mediante FDL la unión de clorpromazina (**CPZ**) y dos de sus metabolitos, **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (mono y didesmetilado, respectivamente) en presencia de cantidades crecientes de ASH, siguiendo el aumento del valor de $\Delta A_{\text{máx}}$ de **³CPZ*** tras la adición de cantidades crecientes de proteína. El mayor grado de unión se observa en el fármaco de origen, de acuerdo con su carácter más hidrofóbico. El uso de warfarina como sonda de desplazamiento de sitio I indica que los tres compuestos solo se unen a este sitio. Se observa fotounión a ASH en todos los casos mediante ligeros cambios en los espectros de fluorescencia.

Conclusions

This doctoral thesis deals with the photophysics and photochemistry of drugs containing a carbazole (**CBZ**) or phenothiazine (**FTZ**) chromophore in biomimetic media. From the obtained results, it can be concluded that:

- A) LFP of **CPFMe@BSA**: monitorization of the $^3\text{CPFMe}^*$ band at $\lambda = 430$ nm indicates the presence of two different binding sites. No significant stereodifferentiation in the τ_T values is observed. LFP of **CPFMe@BAAG**: monitorization of the $^3\text{CPFMe}^*$ band at $\lambda = 430$ nm points to one binding site. The (*S*)-enantiomer exhibits much lower τ_T value than (*R*)-**CPFMe**. Irradiation of **CPFMe@BAAG**: Photobinding occurs, with a higher binding degree for the (*S*)-enantiomer. The proposed mechanism involves reductive photodehalogenation from $^3\text{CPFMe}^*$.
- B) After irradiation of **1**, monodehalogenation occurs leading to **2**, which in turn dehalogenates to afford **3**. The processes have been followed by HPLC and all the photoproducts have been isolated and spectroscopically characterized. By LFP, self-quenching of the directly observed triplet excited states of **CPF**-based dyads **1** and **2** ($\lambda_{\text{max}} = 430$ nm) has been demonstrated, by comparison with the behavior of **CPFMe**. The $^3\text{CPF}^*$ self-quenching can be correlated with reductive photodehalogenation, which occurs from the resulting charge separated species. The trends observed in the triplet lifetimes (τ_T shorter in halogenated dyads), as well as the solvent effects on photoreactivity (MeCN vs THF), are in full agreement with this mechanistic picture.
- C) Photooxidation of **CMZ** occurs through photoionization followed by trapping of the radical cation by oxygen. Thus, the reaction is extremely sensitive to the medium and constitutes an appropriate probe for localization of the drug within a variety of microenvironments. The slowest photooxidation rate is in SDS and AAGs, where photoionization is nearly negligible, since

the drug is in a hydrophobic domain hardly accessible from the aqueous medium. The encapsulation process can be followed by fluorescence spectroscopy, through a clear hypsochromic shift, together with significantly enhanced quantum yields and lifetimes. LFP reveals diagnostically important changes associated with encapsulation, specifically more selective generation of the triplet excited state, which turns out to be much longer-lived. A good correlation is observed between the photophysical properties and the photochemical reactivity. Thus, the slowest photooxidation rate corresponds to **CMZ** in SDS micelles and AAGs, where the drug is located in a more hydrophobic domain, hardly accessible from the aqueous medium, and photoionization is nearly negligible.

- D) Binding of **CPZ** and two **CPZ** phase I metabolites (**MDCPZ** and **DDCPZ**) to HSA has been monitored by laser flash photolysis, following the enhancement of the ΔA_{\max} value of $^3\text{CPZ}^*$ ($\lambda = 470 \text{ nm}$) after addition of increasing amounts of protein. The binding degree is **CPZ** > **MDCPZ** > **DDCPZ**, in agreement with the higher hydrophobic character provided by methyl substitution at the amine position. The use of warfarin as site I probe indicates that the three compounds only bind to this site. Low photobinding to HSA, monitored by following subtle changes in the fluorescence spectra, is observed in all cases.

Resúmenes

Resumen

En la presente tesis doctoral se ha planteado el uso de medios biomiméticos como albúminas séricas (ASs), α_1 -glicoproteínas ácidas (AGAs), ciclodextrinas (CDs) y micelas (SDS) combinado con técnicas fotofísicas (fluorescencia (F) y fotólisis de destello láser (LFP)) para investigar la fotosensibilización por fármacos que contienen un cromóforo carbazol (**CBZ**) o fenotiazina (**FTZ**).

En primer lugar, se ha estudiado el fotocomportamiento del éster metílico del carprofeno (**CPFMe**) en presencia de albúmina sérica bovina (ASB). Las cinéticas de desaparición de los estados excitados triplete de **CPFMe** en presencia de ASB 1:2 de relación molar, monitorizados a 430 nm, fueron ajustadas mediante dos términos monoexponenciales y por tanto dos tiempos de vida de triplete (τ_T), lo cual reveló dos sitios de unión diferentes a la proteína. El τ_T menor se asoció al **CPFMe** presente en el sitio I, basado en la desactivación del $^3\text{CPFMe}^*$ por triptófano (Trp) alojado en ese sitio de la proteína a través de un mecanismo de transferencia electrónica (TEI). No se encontraron diferencias significantes entre (S)- y (R)-**CPFMe**. En α_1 -glicoproteína ácida bovina (AGAB), se observó un único sitio de unión para ambos enantiómeros de **CPFMe**. En este caso se observó estereodiferenciación en los tiempos de vida de triplete de los complejos **CPFMe@AGAB**, con un valor de τ_T más corto para el enantiómero (S). Además, se detectó fotounión de **CPFMe** a AGAB por los consiguientes cambios en los espectros de fluorescencia de las mezclas **CPFMe@AGAB** antes y después de irradiar. El proceso fue más eficiente para (S)-**CPFMe**. El mecanismo propuesto relaciona la fotodeshalogenación reductiva desde el estado excitado triplete de (S)-**CPFMe**, dando lugar al aducto covalente (S)-**CBZMe-AGAB**.

En los derivados cloroaromáticos se asume que la deshalogenación ocurre a través del estado excitado triplete, aunque normalmente su energía es insuficiente para provocar una ruptura homolítica C-Cl dando lugar a radicales arilo y átomos de cloro. Para evitar la termodinámica desfavorable de este paso, se ha propuesto que en el mecanismo real de reacción esté involucrada la formación de

excímeros triplete. En este contexto, para profundizar en el mecanismo de deshalogenación del **CPFMe**, se han sintetizado e irradiado dos diadas diastereoméricas basadas en **CPF** (**CPF-CPF** y **CPF-CBZ**). El “self-quenching” de los estados excitados triplete en ambas diadas es mucho más rápido que en **CPFMe**, y es relacionado con la formación de especies con separación de carga, claramente desfavorecido en disolventes apolares como tetrahidrofurano (THF). Las tendencias observadas en los τ_T , así como los efectos del disolvente en la fotorreactividad están de acuerdo con la teoría de una deshalogenación fotoreductiva como mecanismo en sistemas basados en **CPF**.

Se ha investigado la fotoquímica del fármaco neuroléptico ciamemazina (**CMZ**) en medios biomiméticos. El proceso de encapsulación ha sido seguido por espectroscopía de fluorescencia, como un desplazamiento hipsocrómico de la banda, así como un aumento de los rendimientos cuánticos y de los tiempos de vida. La FDL reveló importantes cambios asociados a la encapsulación, específicamente una generación del estado excitado triplete más selectiva, los cuales viven más tiempo. La fotooxidación de **CMZ** ocurre a través de fotoionización; el catión radical resultante es atrapado por oxígeno para formar su fotoproducto *N,S*-dióxido. La reacción ha sido monitorizada por espectroscopía de fluorescencia, por la aparición progresiva de la banda de emisión característica a longitudes de onda más cortas. Éste proceso resultó ser desfavorecido en los microambientes utilizados, debido a su naturaleza lipofílica. La velocidad de fotooxidación más lenta corresponde a **CMZ** en micelas SDS y en AGAs, donde el fármaco se encuentra en un dominio más hidrofóbico, difícilmente accesible desde el medio acuoso y donde la fotoionización es prácticamente despreciable.

La fotólisis de destello láser del antipsicótico clorpromazina (**CPZ**) y dos de sus metabolitos de fase I **CPZ-MD** y **CPZ-DD** (mono y didesmetilado, respectivamente) en presencia de cantidades crecientes de albúmina sérica humana (ASH) ha permitido monitorizar la unión a proteína, por el aumento del valor de ΔA_{\max} del $^3\text{CPZ}^*$ (monitorizado a 470 nm). Como se esperaba, el grado de unión fue mayor para el fármaco de origen, de acuerdo con su carácter más hidrofóbico. El uso de warfarina como sonda de desplazamiento del sitio I indicó

que los tres compuestos sólo se unen a este sitio. Se observó una ligera fotounión a ASH en todos los casos, monitorizada siguiendo los cambios sutiles en los espectros de fluorescencia.

Resum

En la present tesi doctoral s'ha plantejat l'ús de mitjans biomimètics com albúmines sèriques (ASs), α_1 -glicoproteïnes àcides (AGAs), ciclodextrines (CDs) i micel·les de dodecil sulfat sòdic (SDS) combinat amb tècniques fotofísiques com a fluorescència (F) i fotòlisi de llampada làser (FLL) per a investigar la fotosensibilització per fàrmacs que contenen un cromòfor tipus carbazol (**CBZ**) o fenotiazina (**FTZ**).

En primer lloc, s'ha estudiat el comportament de l'èster metílic del carprofén (**CPFMe**) en presència d'albumina sèrica bovina (ASB). Les cinètiques de desaparició dels estats excitats triplet de **CPFMe** en presència de ASB 1:2 de relació molar, monitoritzats a 430 nm, van revelar dos llocs d'unió de **CPFMe** a la proteïna; el temps de vida menor es va associar al lloc I a causa de la desactivació del $^3\text{CPFMe}^*$ per triptòfan (Trp) allotjat en eixe lloc de la proteïna a través d'un mecanisme de transferència electrònica (Te); no es van observar diferències significatives entre (S)- i (R)-**CPFMe**. En α_1 -glicoproteïna àcida bovina (AGAB), **CPFMe** es va encapsular en un únic lloc d'unió. En aquest cas, es va observar estereodiferenciació en els temps de vida de triplet dels complexos **CPFMe**@AGAB, amb un valor més curt per a l'enantiòmer (S). A més, es va detectar fotounió de **CPFMe** a AGAB pels consegüents canvis als espectres de fluorescència de les mesclures **CPFMe**@AGAB abans i després d'irradiar. El procés va ser més eficient per a (S)-**CPFMe**. El mecanisme proposat relaciona la fotodeshalogenació reductiva des de l'estat excitat triplet de (S)-**CPFMe** i que forma el corresponent adducte (S)-**CBZMe**-AGAB.

Als derivats cloroaromàtics s'assumeix que la deshalogenació ocorre a través del estat excitat triplet, encara que normalment la seua energia es insuficient per a provocar una ruptura homolítica C-Cl donant lloc a radicals arilo i àtoms de clor. Per a evitar la termodinàmica desfavorida d'aquest pas, s'ha proposat que al mecanisme real de reacció estigui involucrat la formació de excímers triplet. En aquest context, per aprofundir en el mecanisme de deshalogenació del **CPFMe**, s'ha sintetitzat e irradiat dos diades

diastereomèriques (**CPF-CPF** i **CPF-CBZ**). El "self-quenching" dels estats excitats triplet de ambdues diades es molt més ràpid que en **CPFMe**, i es relaciona amb la formació d'espècies amb separació de càrrega, clarament desfavorit en dissolvents apolars com tetrahidrofurà (THF). Les tendències observades en els τ_T , així com els efectes del dissolvent en la fotorreactivitat estan d'acord amb la teoria d'una deshalogenació fotoreductiva com a mecanisme en sistemes basats en **CPF**.

S'ha investigat la fotoquímica del fàrmac neurolèptic ciamemazina (**CMZ**) en medis biomimètics. El procés d'encapsulació ha estat seguit per espectroscopia de fluorescència, com un desplaçament hipsocròmic de la banda, així com un augment dels rendiments quàntics i dels temps de vida. La FLL va revelar canvis importants associats a l'encapsulació, específicament una generació de l'estat excitat triplet més selectiva i amb temps de vida més llarg. La fotooxidació de **CMZ** ocorre a través de fotoionització; el catió radical resultant es atrapat per oxigen per a formar el seu fotoproducte *N,S*-diòxid. La reacció ha estat monitoritzada per espectroscòpia de fluorescència, per l'aparició progressiva de la banda de emissió característica a longituds d'ona més curtes. Este procés resultà ser desfavorit als microambients utilitzats, degut a la seua naturalesa lipofílica. La velocitat de fotooxidació més lenta correspon a **CMZ** en micel·les SDS i en AGAs, on el fàrmac està en un domini més hidrofòbic, difícilment accessible des del medi aquós i on la fotoionització és pràcticament menyspreable.

La fotòlisi de llampada làser de l'antipsicòtic clorpromazina (**CPZ**) i dos dels seus metabòlits **CPZ-MD** i **CPZ-DD** (mono i didesmetilat, respectivament) en presència de quantitats creixents d'albúmina sèrica humana (ASH) ha permès monitoritzar la unió a proteïna, mitjançant l'augment del valor de ΔA_{\max} del $^3\text{CPZ}^*$ (monitoritzat a 470 nm). Com era d'esperar, el grau d'unio va ser major per al fàrmac d'origen, d'acord amb el seu caràcter més hidrofòbic. L'ús de warfarina com a sonda de desplaçament del lloc I va indicar que els tres compostos només s'uneixen a eixe lloc. Es va observar una lleugera fotounió a ASH en tots els casos per monitorització dels canvis subtils als espectres de fluorescència.

Abstract

In this thesis, the use of biomimetic media such as serum albumins (SAs), α_1 -acid glycoproteins (AAGs), cyclodextrins (CDs) and sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles is combined with photophysical techniques (fluorescence (F) and laser flash photolysis (LFP)) to investigate the issue of photosensitization by drugs or drug derivatives containing a tricyclic heteroaromatic chromophore, namely carbazole (**CBZ**) or phenothiazine (**FTZ**).

The photobehavior of the methyl ester of carprofen (**CPFMe**) in the presence of bovine serum albumin (BSA) has been addressed first. The decay of triplet excited state of **CPFMe** in the presence of BSA at 1:2 molar ratio, monitored at 430 nm, needed two monoexponential terms and thus two triplet lifetimes (τ_T) for a satisfactory fitting, which revealed binding to two different sites within the protein. The shorter value of τ_T was ascribed to **CPFMe** present in site I, based on the quenching of $^3\text{CPFMe}^*$ by the tryptophan (Trp) residue located in this pocket, through an electron transfer mechanism. No significant differences were found between (S)- and (R)-**CPFMe**. Within bovine α -acid glycoprotein (BAAG), only one binding site was observed for both **CPFMe** enantiomers. In this case, stereodifferentiation was observed in the triplet lifetimes in **CPFMe**@BAAG complexes, with the shorter τ_T values for the (S)-enantiomer. Moreover, **CPFMe** photobinding to BAAG was detected by following the changes in the fluorescence spectra of **CPFMe**@BAAG mixtures before and after irradiation. The process was more efficient for (S)-**CPFMe**. The proposed mechanism involves a reductive photodehalogenation from the triplet excited state of (S)-**CPFMe**, giving rise to covalent adduct (S)-**CBZMe**-BAAG.

In chloroaromatic derivatives, dehalogenation is assumed to proceed from the triplet excited state, although its energy is often insufficient to promote a clean homolytic C-Cl cleavage leading to aryl radicals and chlorine atoms. As a way to circumvent the unfavorable thermodynamics of this step, it has been proposed that the actual operating mechanism involves formation of triplet excimers. In this context, to deepen into the mechanism of **CPFMe** dehalogenation, two

diastereomeric dyads based on **CPF** (**CPF-CPF** and **CPF-CBZ**) have been synthesized and irradiated. The self-quenching of the triplet excited states in both dyads is much faster than in **CPFMe**, and is related to formation of charge transfer species, clearly disfavored in non-polar solvents (THF). The trends observed in the triplet lifetimes, as well as the solvent effects on photoreactivity, are in full agreement with the mechanistic picture of a photoreductive dechlorination as operating mechanism in **CPF**-based systems.

The photochemistry of the neuroleptic drug cyamemazine (**CMZ**) has been investigated in biomimetic media. The encapsulation process has been followed by fluorescence spectroscopy, as a hypsochromic shift of the band, concomitant with enhanced quantum yields and lifetimes. Laser flash photolysis revealed important changes associated with encapsulation, specifically more selective generation of the triplet excited state, which turns to be longer-lived. Light-induced oxidation of **CMZ** afforded the corresponding radical cation, which was trapped by oxygen to afford the *N,S*-dioxide. The reaction has been monitored by fluorescence spectroscopy, by the progressive appearance of a characteristic emission band at shorter wavelengths. The process resulted to be disfavored in the employed microenvironments, due to their lipophilic nature. The slowest photooxidation rate corresponds to **CMZ** in SDS micelles and in AAGs, where the drug is located in a more hydrophobic domain, hardly accessible from the aqueous medium, and photoionization is nearly negligible.

Laser flash photolysis of the anti-psychotic chlorpromazine (**CPZ**) and two phase I metabolites, **CPZ-MD** and **CPZ-DD** (mono and didemethylated, respectively) in the presence of increasing amounts of HSA, has allowed monitoring binding to the protein, from the enhancement of the ΔA_{\max} value of ${}^3\text{CPZ}^*$ (monitored at 470 nm). As expected, the binding degree was higher for the parent drug, in agreement with its more hydrophobic character. The use of warfarin as site I displacement probe indicated that the three compounds only bind to this site. Marginal photobinding to HSA was observed in all cases, which was monitored by following subtle changes in the fluorescence spectra.

ANEXO I. Contribuciones a congresos

1. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Transient Absorption Spectroscopy Study on the Binding of Phenothiazines to Transport Proteins”**. XXXIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ). Julio **2011**, Valencia (España). Póster.
2. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Photophysical and Photochemical Studies on Carprofen-Carprofen Dyads”**. III Jornadas Ibéricas de Fotoquímica. Septiembre **2011**, Granada (España). Póster.
3. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Photodehalogenation of Diastereomeric Dyads based on Carprofen”**. ESP Photobiology School 2012 (European Society for Photobiology). Junio **2012**, Bressanone (Italia). Póster.
4. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Transient Absorption Spectroscopy for the Study of Cyamemazine Binding to Human Serum Albumin and α_1 -Acid Glycoprotein”**. 26th International Carbohydrate Symposium (ICS 2012). Julio **2012**, Madrid (España). Póster.
5. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Steady-State and Time-Resolved Photolysis of Cyamemazine in Biomimetic Microenvironments”**. XXXIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ). Septiembre **2013**, Santander (España). Póster.
6. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, F. Palumbo, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Transient Absorption Spectroscopy Study of Chlorpromazine Metabolites Binding to Human Serum Albumin”**. IV Jornadas Ibéricas de Fotoquímica. Junio **2014**, Lisboa (Portugal). Póster.

7. D. Limones-Herrero, M. Dolores Coloma, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“DNA Damage Photosensitized by Diclofenac and its Metabolites”**. 7th Spanish-Portuguese-Japanese Organic Chemistry Symposium (7th SPJ-OCS). Junio **2015**, Sevilla (España). Póster.

ANEXO II. Publicaciones

Publicaciones directamente derivadas de la Tesis

1. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Bypassing the Energy Barrier of Homolytic Photodehalogenation in Chloroaromatics through Self-Quenching”**. *Org. Lett.* **2013**, *15*(6), 1314-1317.
2. D. Limones-Herrero, R. Pérez-Ruiz, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Retarded Photooxidation of Cyamemazine in Biomimetic Microenvironments”**. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 1012-1016.
3. D. Limones-Herrero, F. Palumbo, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Phototoxicity of Chlorpromazine Metabolites”**. *In preparation to be submitted to Chem. Res. Toxicol.*
4. D. Limones-Herrero, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Covalent Bonding CPFMe@Proteins Stereodifferentiation Induced by Light”**. *In preparation (early stage).*

Otras publicaciones

5. I. Andreu, M. D. Coloma, D. Limones-Herrero, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“DNA Damage Photosensitized by Diclofenac and its Metabolites”**. *In preparation to be submitted to Toxicol. Appl. Pharm.*
6. R. Pérez-Ruiz, D. Limones-Herrero, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Photophysical and Photochemical Properties of Ezetimibe in Organic Solvents”**. *In preparation to be submitted to Beilstein J. Org. Chem.*

