

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC)



**Fotólisis de *N*-óxidos heterocíclicos.
Caracterización de los estados excitados,
reactividad frente a dadores de electrones y
generación de oxígeno atómico.**

TESIS DOCTORAL

Presentado por:
Eva de les Neus Duran Giner

Dirigida por:
Prof. Miguel Ángel Miranda Alonso
Dra. Susana Encinas Perea

D. Miguel Ángel Miranda Alonso, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad Politècnica de València y Dña. Susana Encinas Perea, Profesora Titular de Química Orgánica de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral, titulada " **Fotólisis de *N*-óxidos heterocíclicos. Caracterización de los estados excitados, reactividad frente a dadores de electrones y generación de oxígeno atómico**" ha sido desarrollada por Eva de les Neus Duran Giner, bajo su dirección en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València.

D. Miguel Ángel Miranda Alonso

Dña. Susana Encinas Perea

Soc branca del teu tronc.

Abreviaturas, siglas y símbolos

A	Absorbancia
a.a.	Aminoácido
AC	Aceptor
AC*	Aceptor en estado excitado
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASH	Albúmina sérica humana
ATT	Aniquilación triplete triplete
B	Estructura biológica
βCAR	β -caroteno
$^3\beta$CAR*	β -caroteno en estado excitado triplete
BEMT	bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triacina, bemotrizinol
BZT	3-amino-1,2,4-benzotriacina
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistema
DA	Dador
DA*	Dador en estado excitado
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DTPZ	4-desoxitirapazamina
1DTPZ*	4-desoxitirapazamina en estado excitado singlete
3DTPZ*	4-desoxitirapazamina en estado excitado triplete
e⁻	Electrón
E	Energía
ES	Espaciador
ERO	Especie reactiva de oxígeno
E_s	Energía del estado excitado singlete
E_T	Energía del estado excitado triplete
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser
femto-FDL	Fotólisis de destello láser en la escala de los femtosegundos
nano-FDL	Fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos
Fig	Figura

FR	Fluorescencia retardada
Φ	Rendimiento cuántico
GC-MS	Cromatografía de gases unida a espectrometría de masas
hν	Fotón
I	Intensidad
IR	Radiación Infrarroja
k_d	Constante de desactivación
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{obs}	Longitud de onda observada
λ_{T-T}	Longitud de onda de absorción del estado excitado triplete
λ_{S-S}	Longitud de onda de absorción del estado excitado singlete
M	Molécula
³M*	Molécula en estado excitado triplete
MeCN	Acetonitrilo
MeCNO	Óxido de acetonitrilo
N₂	Nitrógeno
NAF	Naftaleno
NO	<i>N</i> -óxido
NQNO	4-Nitroquinolina <i>N</i> -óxido
³NQNO*	Estado excitado triplete de 4-Nitroquinolina <i>N</i> -óxido
¹NQNO*	Estado excitado singlete de 4-Nitroquinolina <i>N</i> -óxido
NQNO⁻	Radical anión de de 4-Nitroquinolina <i>N</i> -óxido
NQNOH[·]	Radical protonado de 4-Nitroquinolina <i>N</i> -óxido
O₂	Oxígeno
³O₂	Oxígeno en estado triplete
¹O₂*	Oxígeno en estado excitado singlete
OH[·]	Radical hidroxilo
O(³P)	Oxígeno atómico
P	Fosforescencia
PBS	Tampón fosfato salino
Phe	Fenilalanina
PDZ	Piridacina

PDZNO	Piridacina <i>N</i> -óxido
Pot	Potencia
PYR	Piridina
PYRNO	Piridina <i>N</i> -óxido
Q	Especie desactivadora
RA	Radical aminilo
RV	Relajación vibracional
S₀	Estado energético fundamental singlete
S₁	Primer estado energético excitado singlete
S_n	Estado energético excitado singlete
T₁	Primer estado energético excitado triplete
T_n	Estado energético excitado triplete
TPZ	Tirapazamina
TPZ⁻	Radical anión de tirapazamina
TC	Transferencia de carga
TE	Transferencia de energía
Tel	Transferencia electrónica
TETT	Transferencia de energía triplete-triplete
T-T	Triplete-Triplete
Trp	L-Triptófano
⁺Trp	Catión radical de L-Triptófano
τ	Tiempo de vida
Tyr	Tirosina
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas
UV	Luz ultravioleta
UVA	Luz ultravioleta tipo A
UVB	Luz ultravioleta tipo B
UVC	Luz ultravioleta tipo C
X	Especie excitada
XANT	Xantona
³XANT[*]	Estado excitado triplete de Xantona

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>N</i> -ÓXIDOS HETEROCÍCLICOS.....	3
1.1.1. Desoxitirapazamina	
1.1.2. Nitroquinolina <i>N</i> -óxido	
1.2. PROCESOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS.....	7
1.2.1. Diagrama de Jablonsky	
1.2.2. Procesos radiativos	
1.2.3. Procesos fotoinducidos	
1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS.....	13
1.4. FOTOPROTECCIÓN.....	15
1.4.1. Filtros solares y cremas fotoprotectoras	
1.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	18
1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
2. OBJETIVOS	23
3. CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DE 4-DESOXITIRAPAZAMINA	27
3.1. INTRODUCCIÓN.....	29
3.2. OBJETIVOS.....	32
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.3.1. Espectroscopia de emisión	
3.3.2. Fotólisis de destello láser en la escala de los femtosegundos	
3.3.3. Fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos	
3.4. CONCLUSIONES.....	44
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
4. CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DEL <i>N</i>-ÓXIDO DE 4-NITROQUINOLINA	51
4.1. INTRODUCCIÓN.....	53
4.2. OBJETIVOS.....	57
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.3.1. Caracterización del estado excitado singlete de NQNO	
4.3.2. Caracterización del estado excitado triplete de NQNO	
4.3.3. Reactividad de los estados excitados de NQNO con dadores de electrones	
4.4. CONCLUSIONES.....	74
4.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	78
4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

<u>5. INTERACCIÓN DE 4-NITROQUINOLINA N-ÓXIDO CON TRIPTÓFANO Y PROTEÍNA TRANSPORTADORA HUMANA</u>	81
5.1. INTRODUCCIÓN.....	83
5.2. OBJETIVOS.....	87
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
5.3.1. Desactivación del estado excitado triplete de NQNO por triptófano	
5.3.2. Desactivación del estado excitado triplete de NQNO por albúmina por FDL	
5.3.3. Desactivación de la fluorescencia del Trp por NQNO	
5.3.4. Desactivación de la fluorescencia de ASH por NQNO	
5.4. CONCLUSIONES.....	95
5.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	97
5.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
<u>6. FILTROS SOLARES CON CAPACIDAD DE CAPTAR OXÍGENO ATÓMICO</u>	99
6.1. INTRODUCCIÓN.....	101
6.2. OBJETIVOS.....	104
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
6.3.1. FDL de <i>N</i> -óxidos a 266 nm	
6.3.2. FDL de <i>N</i> -óxidos a 355 nm	
6.3.3. Irradiación de <i>N</i> -óxidos en estado estacionario	
6.3.4. Detección de fotoproductos oxidados de BEMT	
6.4. CONCLUSIONES.....	111
6.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	113
6.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
<u>7. INSTRUMENTACIÓN</u>	117
<u>CONCLUSIONES</u>	123
<u>RESÚMENES</u>	133
<u>ANEXOS</u>	143

1

Introducción

1.1. N-ÓXIDOS HETEROCÍCLICOS

Los *N*-óxidos heterocíclicos (NO) son compuestos aromáticos cuyo heteroátomo es el nitrógeno y al que está unido un oxígeno por un enlace sencillo. Este enlace llamado dativo, está formado por el solapamiento de un par de electrones no enlazantes del nitrógeno y un orbital libre del oxígeno, que origina una separación de carga formal (N^+-O^-) que condiciona las propiedades tanto físicas como químicas de estos compuestos.¹

Dadas las características del enlace N^+-O^- , los *N*-óxidos han sido usados como bases de Lewis en química de coordinación debido a su gran capacidad para coordinarse con metales, halógenos y aceptores orgánicos de pares de electrones. Los *N*-óxidos también constituyen una importante familia de compuestos con usos farmacéuticos, agroquímicos, iniciadores de polímeros o como intermedios de rutas sintéticas.²⁻⁴

Algunos *N*-óxidos tienen efectos negativos, debido a su impacto nocivo en el medio ambiente, y porque pueden causar efectos toxicológicos y/o cancerígenos.⁵⁻⁷ Sin embargo, otros tienen connotaciones positivas, ya que se ha detectado su presencia en la materia viva, en los tejidos de plantas y animales.⁸ Estos *N*-óxidos de origen natural, han despertado el interés por estudiar su función en los sistemas biológicos a los que pertenecen e incluso han servido de inspiración en la industria farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos.

En la actualidad, los NO despiertan un interés particular no solo por sus funciones bioquímicas, sino también por los procesos fotoquímicos y fotofísicos que experimentan. Entre ellos puede mencionarse el posible daño oxidativo fotoinducido a las bases púricas del ADN y las interacciones con sistemas proteicos.⁹⁻¹⁰

Este tipo de compuestos orgánicos presenta una reactividad fotoquímica moderada con un rendimiento cuántico global $\Phi \geq 0,1$.¹ La fotolabilidad de los NO se conoce desde comienzos del siglo XX y su fotoquímica ha sido estudiada desde los años 50 hasta la actualidad. Por el contrario, no se conoce en profundidad la

fotofísica de estos compuestos. Los procesos fotoquímicos más comunes implican expansión del anillo con la introducción del átomo de oxígeno y la transposición del oxígeno al carbono contiguo al nitrógeno. Como paso intermedio en ambos procesos se ha propuesto la formación de oxaziridinas, que evolucionan a los productos finales a través de transposiciones sigmatrópicas o aperturas electrocíclicas.⁴ Es la polaridad del medio la que determina cual de los dos procesos es el predominante. En la **Figura 1.1.** se puede observar la fotorreactividad para la quinolina *N*-óxido, que sirve de ejemplo de los *N*-óxidos heterocíclicos.¹¹

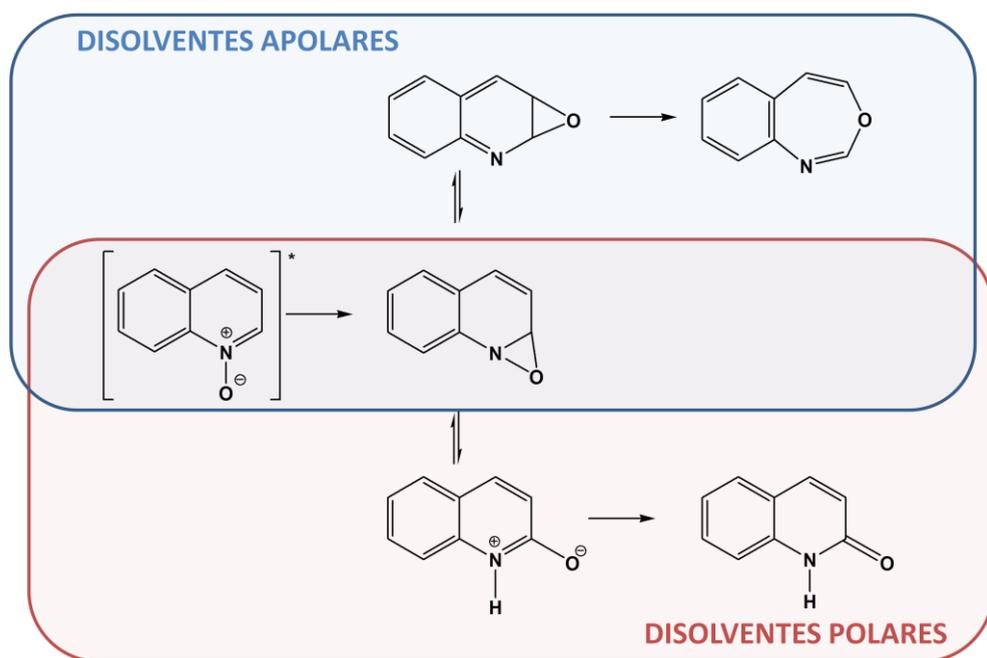


Figura 1.1.: Fotorreactividad de la quinolina *N*-óxido dependiendo del medio en el que se encuentra.

La variación de la reactividad en función del disolvente se explica por la polaridad del enlace N^+-O^- y por la capacidad de formar enlaces de hidrógeno en medios próticos. Así, en disolventes polares se favorece la formación de zwitteriones, mientras que en disolventes apolares se favorece la transposición concertada para dar benzoxazepinas. Existen escasas evidencias experimentales a favor del intermedio oxaziridina, que en la mayoría de los casos no se detecta debido a su corto tiempo de vida.¹¹ Experimentos realizados con el fin de atrapar

químicamente los intermedios están de acuerdo con la química esperada para las oxaziridinas pero también se han sugerido otros tipos de intermedios tales como birradicales o nitrenos.¹

Una reacción paralela para los *N*-óxidos es la desoxigenación fotoquímica, que tiene lugar como un proceso minoritario aunque bastante común. En general, se acepta que la desoxigenación tiene lugar desde un estado excitado diferente del implicado en la formación de oxaziridinas. Tal y como se ve en la **Figura 1.2.**, la desoxigenación puede dar lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como lo es el oxígeno atómico ($O(^3P)$).¹²

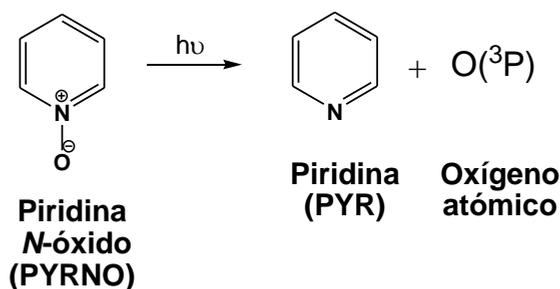


Figura 1.2.: Fotodesoxigenación de la piridina *N*-óxido, para dar oxígeno atómico.

1.1.1. Desoxitirapazamina

La tirapazamina (TPZ) es un fármaco que se encuentra en fase III para el tratamiento de tumores hipóxicos (cáncer de cérvix y garganta) y su cromóforo es el de 1,2,4-benzotriazina 1,4-dióxido (**Figura 1.3.**). Actualmente se usa como fármaco anticancerígeno, pero inicialmente fué usado como fungicida, hasta que Zeman *et al.* en 1986 empezaron a describir sus propiedades clínicas.¹³⁻¹⁴

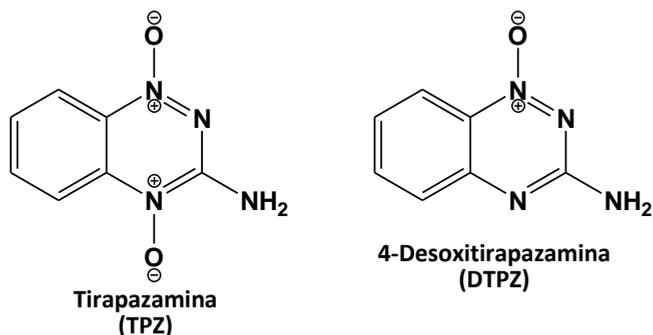


Figura 1.3.: Estructura química de la TPZ y la DTPZ.

Se ha propuesto que la actividad anticancerígena de la tirapazamina se debe al daño oxidativo que provoca en el ADN de células hipóxicas, aunque el mecanismo todavía no está completamente establecido (**Figura 1.4**).¹⁵

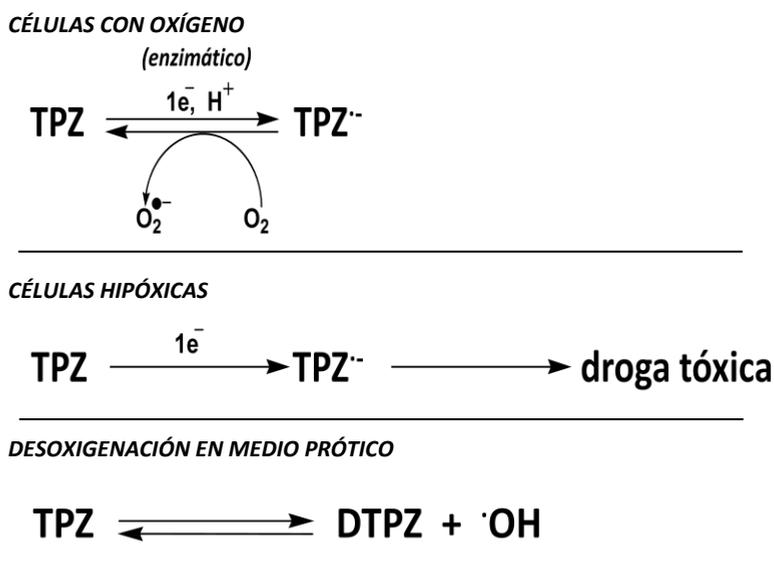


Figura 1.4. Reactividad de la tirapazamina y formación del radical hidroxilo en medio prótico.

La desoxitirapazamina (DTPZ) es tanto el fotoproducto como el metabolito mayoritario que se obtiene a partir de la TPZ, además de ser el precursor en la ruta sintética del fármaco.¹⁶

1.1.2. Nitroquinolina N-óxido

El N-óxido de 4-nitroquinolina (NQNO) es uno de los compuestos estudiados en profundidad en la presente tesis (**Figura 1.5.**).

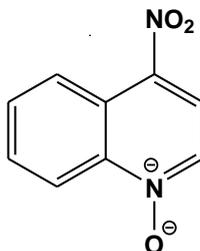


Figura 1.5.: Estructura molecular de NQNO.

Existen estudios sobre los efectos del NQNO sobre los seres vivos, que han llevado a considerar esta molécula como un modelo reconocido de agente mutagénico y carcinogénico.¹⁷⁻¹⁸ El anillo de quinolina es electrofílico, propiedad que se acentúa en NQNO por el efecto electrón-atractor del sustituyente nitro. Además, NQNO en su estado excitado triplete es mejor electrófilo que en su estado fundamental, favoreciendo la interacción con biomoléculas (ADN y proteínas) como aceptor de electrones.⁵ Mientras que los procesos fotoquímicos de NQNO han sido muy estudiados, los fotofísicos, hasta la actualidad, son incompletos y no permiten explicar de forma satisfactoria aspectos como el efecto del medio o su reactividad frente a dadores de electrones.^{3,19-20}

1.2. PROCESOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS

Las moléculas con cromóforos apropiados poseen la capacidad para absorber (A) fotones (hv). Tras realizar dicha absorción, pasan del estado fundamental (S_0) a un estado electrónico excitado singlete de mayor energía (S_n). Desde los estados excitados alcanzados se pueden producir diversos procesos de desactivación que se agrupan en dos tipos: fotoquímicos y fotofísicos. Los procesos fotoquímicos son aquellos donde las moléculas sufren modificaciones en sus estructuras. Los procesos fotofísicos son aquellos en los que la molécula después de absorber un fotón, sufre cambios de estado energético o electrónico

pero no cambia su estructura química. Éstos últimos, se agrupan según el tipo de proceso en dos grandes grupos, radiativos y no radiativos.

1.2.1. Diagrama de Jablonsky

En el diagrama de Jablonsky (**Figura 1.6.A.**) se muestran gráficamente los niveles de energía de los estados electrónicos moleculares, representados por líneas horizontales desplazadas verticalmente para indicar las energías relativas. Se agrupan según la multiplicidad electrónica (singlete o triplete) en columnas desplazadas horizontalmente. Los posibles procesos fotofísicos de excitación y de relajación entre los estados vienen indicados por flechas, las flechas onduladas indican procesos no radiativos, mientras que las flechas rectas indican procesos radiativos.²¹

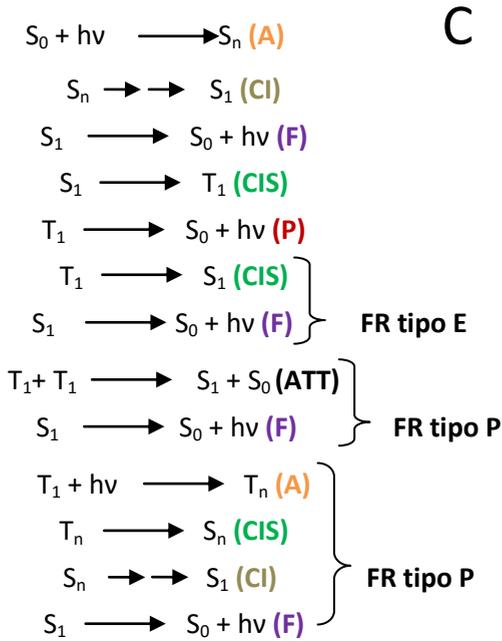
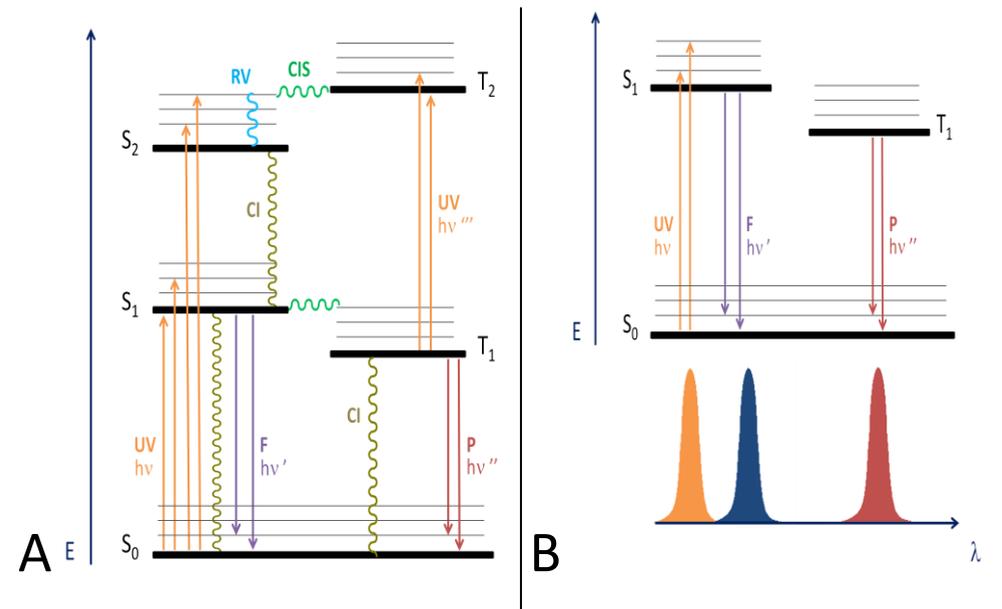


Figura 1.6.: **A:** Diagrama de Jablonsky simplificado. **B:** Procesos radiativos (verde mar y amarillo oliva) vs. longitudes de onda de absorción (naranja) o emisión (púrpura-fluorescencia y granate-fosforescencia). **C:** Esquema detallado de los procesos foto-físicos radiativos y no radiativos.

1.2.2. Procesos radiativos

Mientras que los procesos fotofísicos no radiativos van asociados con relajación de la energía absorbida sin emisión de fotones (emisión de calor, cambios de estados energéticos...), los radiativos conllevan una emisión de fotones ($h\nu$) con diferente energía a los absorbidos. Existen varios tipos dependiendo del estado excitado desde el cual se produce la emisión (**Figura 1.6.B. y C.**):

•**Fluorescencia (F)**: Es la desactivación desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1) al estado fundamental con la consiguiente emisión de un fotón. Al S_1 se llega por conversión interna (CI) desde estados excitados singletes de mayor energía (S_n) tras la absorción de un fotón. Es una emisión permitida por la regla de conservación de espín. La fluorescencia puede ocurrir desde un estado excitado individual (F) o también desde un excímero o exciplejo (F_{exc}), esto ocurre cuando la emisión se produce desde el estado excitado de un complejo.

•**Fosforescencia (P)**: Es el fenómeno en el cual se emite un fotón al desactivarse una molécula excitada desde el estado excitado triplete de menor energía (T_1) (al que se llega tras cruce intersistema (CIS)) para llegar al estado fundamental. Es una emisión no permitida por las reglas de espín.

•**Fluorescencia retardada (FR)**: Desde el primer estado excitado triplete, se pueden producir diversos procesos que dan como resultado una posterior emisión de fluorescencia desde S_1 con un tiempo de vida más largo que el de la fluorescencia inmediata (F). Existen dos tipos:

-**Tipo E**: Cuando las energías de los estados excitados T_1 y S_1 son muy próximas, se puede producir un cruce intersistema reversible desde T_1 a S_1 . La posterior desactivación desde S_1 al estado fundamental con la emisión de un fotón, daría lugar a la FR. Dicho proceso está activado y favorecido por la temperatura.

-**Tipo P**: Este fenómeno ocurre cuando dos T_1 interaccionan (aniquilación triplete-triplete, ATT) o cuando el T_1 absorbe un fotón, para dar como resultado en ambos casos un estado excitado triplete de mayor energía (T_n). Posteriormente se produce un cruce intersistemas desde T_n a un estado excitado singlete (S_n) para terminar dando lugar a un S_1 que

emite fluorescencia. Este proceso se ve incrementado al aumentar la potencia del haz de excitación.

1.2.3. Procesos fotoinducidos

Cuando dos moléculas con cromóforos apropiados se encuentran presentes en el mismo medio, puede pasar que tras la excitación electrónica (A) de uno de ellos surja una interacción entre ambos que puede ser de varios tipos, entre los que destacan la transferencia de energía (TE) y la transferencia electrónica (Tel).

-Transferencia de energía:

Se define transferencia de energía (TE) como un proceso fotofísico donde a partir del estado excitado de un cromóforo, llamado dador (DA, que se etiqueta con un asterisco para indicar que está en un estado excitado), se promueve a un estado excitado a otra entidad estructural que se encuentra en su estado fundamental, llamada aceptor (AC). El dador excitado pasa por tanto a un estado energético menor, se desactiva, mientras que el aceptor pasa a un estado energético mayor, se activa. Cabe recalcar que en este proceso AC no se excita directamente por absorción de energía.



Figura 1.7.: Procesos correspondientes a TE: **A:** intramolecular y **B:** intermolecular.

Se diferencian dos tipos:

-Transferencia de energía intramolecular, cuando dador y aceptor están separados por un espaciador (ES) que forma parte de la misma molécula (**Figura 1.7.A.**).

-Transferencia de energía intermolecular, cuando DA y AC son dos moléculas distintas (**Figura 1.7.B.**).

Los procesos de TE intramoleculares son muy rápidos, mientras que los de TE intermolecular se producen en una escala de tiempo mayor, pudiendo ser

detectados y cuantificados. Así es posible determinar una constante de velocidad para el proceso añadiendo concentraciones conocidas crecientes de AC al medio a través de un ajuste lineal del tipo Stern-Volmer (**Ecuación 1.1.**).²²

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_{TE} \tau_0 \bullet [AC]$$

Ecuación 1.1.: Ajuste lineal Stern-Volmer.

Donde k_{TE} es la constante de velocidad de transferencia de energía intermolecular, también llamada constante de desactivación ($k_d = k_{TE}$), τ_0 es el tiempo de vida del estado excitado del DA, y por otro lado I_f^0 y I_f son las intensidades de la emisión de DA en ausencia y presencia del AC respectivamente.

Se pueden considerar dos modalidades en el uso de la TE para la caracterización de los estados excitados de un compuesto, como son activación o desactivación fotofísica según el tipo de experimento que se realice.

-Activación fotofísica, cuando del DA es conocida su fotofísica y AC es el cromóforo de interés. También se conoce como fotosensibilización (la xantona es un DA típico en experimentos de fotosensibilización).

-Desactivación fotofísica, en este caso es conocida la fotofísica del AC y el cromóforo en estudio es DA (la desactivación por β -caroteno y por oxígeno son experimentos muy utilizados para estudiar este tipo de procesos).

-Transferencia electrónica:

La transferencia electrónica (Tel) es un proceso no radiativo, donde se genera un par de iones radicales por la transferencia de un electrón entre dos cromóforos. El dador de electrones (DA) puede ser en este caso tanto la molécula que se encuentra excitada como la molécula en estado fundamental, pero en ambos casos se genera el radical anión del aceptor ($^{\bullet}AC$) y el radical catión del dador ($DA^{\bullet+}$) (**Figura 1.8.**).

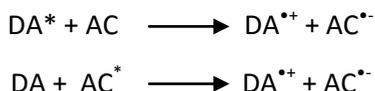


Figura 1.8.: Procesos correspondientes a Tel.

Este proceso también puede ocurrir entre cromóforos de una misma molécula (Tel intramolecular). Es el proceso usado en la generación de energía a partir de radiación solar que se produce en las placas fotovoltaicas.

-Transferencia de protón, cuando seguido al proceso de transferencia electrónica ocurre una protonación del aceptor (AC^*) (**Figura 1.9.**). Nuevamente, la transferencia puede tener lugar tanto si se excita al dador como si se excita al aceptor.



Figura 1.9.: Reacción de transferencia de protón (H^+).

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS

Los estados excitados de las moléculas (M) se pueden caracterizar usando las técnicas espectroscópicas de emisión. Así, registrando los espectros de emisión en estado estacionario de fluorescencia y fosforescencia de una molécula determinada, podemos calcular las energías de los estados excitados singlete (E_S) y triplete (E_T) respectivamente, la presencia de excimeros, exciplejos, etc...

Por otra parte también se pueden usar técnicas de absorción de las especies transitorias para la identificación de los distintos estados excitados. En el caso de la caracterización del estado excitado singlete, es necesario hacer uso de la alta tecnología que supone registrar espectros de absorción singlete-singlete utilizando un láser con resolución temporal en la escala de los femtosegundos. Mientras que para caracterizar el estado excitado triplete, es suficiente con utilizar un láser con resolución temporal en la escala de los nanosegundos, aunque puede ser erróneamente confundido por otra especie. Cabe resaltar que, si bien el láser de nanosegundos puede aplicarse a priori a todo tipo de moléculas (lo cual no es posible para el láser en la escala de los femtosegundos), la presencia de distintas especies transitorias que pueden ser detectadas genera mayores posibilidades de asignaciones erróneas.

Para realizar una correcta identificación del triplete existen varias técnicas basadas en la transferencia de energía intermolecular entre dos moléculas:

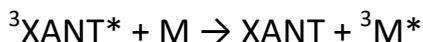
• **Fotosensibilización por Xantona**

Es conocido que la xantona (XANT) es un buen fotosensibilizador del estado excitado triplete, ya que cumple con las siguientes características:

- Posee un rendimiento cuántico de cruce intersistemas (Φ_{CI}) mucho mayor que el de fluorescencia (próximo a la unidad)
- Presenta una energía elevada del estado excitado triplete $E_T=309$ KJ/mol y un tiempo de vida del estado excitado triplete largo (aproximadamente $\tau_T=1\mu s$ en acetonitrilo)
- Exhibe una absorción intensa a la longitud de onda de excitación característica del láser de nanosegundos ($\lambda_{ex}=355$ nm)
- Tiene una baja reactividad química

Además se debe considerar como premisa que la energía del triplete (E_T) de la molécula a fotosensibilizar esté por debajo de la energía del triplete de la Xantona.

Como se ha introducido en el apartado anterior, en este fenómeno de fotosensibilización de triplete se lleva a cabo una transferencia de energía triplete-triplete (TETT), desde la molécula de xantona (dador) que desde su estado excitado triplete cederá la energía a la molécula en estudio (M) que acepta la energía en su estado fundamental para terminar excitada en su estado triplete (**Esquema 1.1.**).



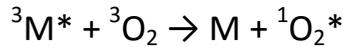
Esquema 1.1.: Transferencia de energía en el proceso de fotosensibilización de M por ${}^3\text{XANT}^*$.

Así se puede identificar el espectro de absorción T-T de M, calcular su tiempo de vida y establecer su E_T . Además, se pueden calcular, si el proceso lo permite, las constantes de velocidad para el proceso usando ajustes de Stern-Volmer (**Ecuación 1.1.**).

• **Desactivación por oxígeno**

Es otra de las estrategias para la caracterización de estados excitados formados, ya que el Oxígeno (O_2) es capaz de interactuar con el estado excitado triplete de la molécula por transferencia de energía, disminuyendo así el tiempo

de vida del triplete de la especie M e incluso impidiendo su detección, dependiendo del valor de la constante de desactivación. Se trata por tanto de un fenómeno de desactivación del triplete de la especie a caracterizar (M), por un desactivador que en este caso es el Oxígeno (**Esquema 1.2.**).



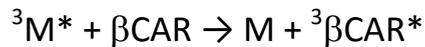
Esquema 1.2.: Transferencia de energía en el proceso de desactivación de ${}^3M^*$ por oxígeno.

De esta forma se puede acotar la E_T de M (ya que $E_T({}^3O_2)=23$ kcal/mol) y su tiempo de vida del triplete, ya que se puede calcular, si el proceso lo permite, la constante de velocidad usando el ajuste de Stern-Volmer (**Ecuación 1.1.**).

· **Desactivación por β -caroteno**

Es conocida la banda de absorción del estado excitado triplete del β -caroteno (β CAR), que presenta un máximo de absorción T-T a la longitud de onda de 510 nm y un aspecto puntiagudo muy característico, pero debido a que su rendimiento cuántico de cruce intersistema es prácticamente nulo ($\Phi_{CI}= 0,001$), tan solo se puede observar dicha absorción cuando se produce una transferencia de energía triplete-triplete desde el estado excitado triplete de otra molécula.

Por lo tanto, se puede acotar la energía del estado excitado triplete de gran número de moléculas M debido a que el triplete del β CAR ($E_T=85$ kJ/mol) estará por debajo en energía (**Esquema 1.3.**).¹



Esquema 1.3.: Transferencia de energía en el proceso de desactivación de ${}^3M^*$ por β CAR.

Además, se puede calcular si el proceso lo permite, la constante de velocidad para el proceso de desactivación usando el ajuste de Stern-Volmer (**Ecuación 1.1.**).

1.4. FOTOPROTECCIÓN

El espectro de luz solar que llega a la atmósfera terrestre está compuesto por radiación de entre 100 y 10^6 nm, la cual se puede dividir en diferentes regiones según su longitud de onda:

- **Ultravioleta C (UVC)**, que se extiende desde 200 a 280 nm. Debido a su absorción por la atmósfera solo una pequeña cantidad llega a la superficie de la Tierra.
- **Ultravioleta B (UVB)**, que abarca desde 280 a 320 nm. Junto a la UVC es la responsable de las reacciones fotoquímicas que conllevan la destrucción de la capa de ozono. Las ondas menores a 290nm son absorbidas casi en su totalidad por el oxígeno molecular, ozono, y vapor de agua de la atmósfera.
- **Ultravioleta A (UVA)** que se extiende entre los 320 y 400 nm.
- **Luz visible**, que engloba la radiación entre 400 y 700 nm. Como el nombre indica, es el rango de longitudes de onda que es visible al ojo humano.
- **Luz infrarroja (IR)** que se extiende entre 700 nm y 1 mm. Esta radiación es la principal responsable del calor que proporciona el sol.

La luz que llega a la litosfera está compuesta en un 62,7% por el rango visible, un 31,9% por el IR, un 5,1% por el UVA, un 0,3% por el UVB, mientras que la cantidad de UVC se considera residual, si bien estas proporciones no son regulares ya que en zonas con un mayor deterioro de la capa de ozono se produce un aumento en el ratio de radiación UVC.²

La radiación solar sobre la naturaleza, el reino animal y concretamente en el ser humano produce una dualidad daño-beneficio. Por un lado la luz es esencial para la vida, vital para el reino animal y vegetal tal y como lo conocemos, algunos ejemplos son los ciclos fotosintéticos de las plantas y la formación de Vitamina D en los humanos. Pero la exposición se debe controlar, ya que si es prolongada y repetitiva puede causar consecuencias dramáticas. Por ejemplo en el caso de los humanos puede provocar cegueras oculares y alteraciones en la piel tales como: la aparición de eritemas, quemaduras, fotoenvejecimiento prematuro, daño al ADN y melanogénesis entre otras alteraciones que pueden estar ligadas a la aparición de cáncer. Básicamente, los ácidos nucleicos y algunos aminoácidos (a.a.) son los cromóforos celulares capaces de sufrir mutaciones indeseadas al absorber la radiación solar directamente. Concretamente, son los a.a. Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr), y las bases pirimidínicas Timina (T) y Citosina (C) los implicados en la generación de daño fotoinducido; ya que todos ellos tienen un espectro de absorción en la zona de UVC y UVB.

Puesto que la radiación UVA es menos energética, se ha considerado tradicionalmente menos dañina pero en los últimos años se ha comprobado que además de un daño directo, puede producir un daño indirecto. Esto es debido a que puede alcanzar capas internas de la piel como la dermis o incluso la zona subcutánea, pudiendo producir una mayor activación de la melanina y por tanto un mayor oscurecimiento de la piel. Aunque como consecuencia también puede producir quemaduras y dañar las estructuras de corion, y finalmente producir un fotoenvejecimiento prematuro. Además la luz UVA se ha relacionado con el 67% de melanomas malignos.

Además, la radiación UVB disminuye la concentración de enzimas antioxidantes en la piel posibilitando una disminución de la capacidad de defensa frente a procesos oxidativos generados a posteriori. Aunque la radiación UVB llega a la Tierra en una proporción menor a la de UVA y no penetra más allá de la epidermis, es conocida como causante de la formación de fotoproductos 6-4 o de ciclobutanos cis-syn entre las bases pirimidínicas entre otros productos, con consecuencias mutagénicas y/o letales; si bien, también existen mecanismos celulares para la reparación o excisión de dichas posibles lesiones.

Por otro lado, la radiación UVC es absorbida directamente por las bases del ADN y puede causar mutaciones directas (como formación de dímeros de timina entre aminoácidos adyacentes).

1.4.1. Filtros solares y cremas fotoprotectoras

Como se ha explicado en el apartado anterior, la exposición solar además de generar beneficios vitales internos para el ser humano, puede generar beneficios estéticos externos, según los cánones de belleza en la sociedad occidental actual. Un bronceado moderado a consecuencia de una controlada exposición solar, tiene asociadas connotaciones de un cuerpo saludable y con vitalidad. Pero si no se controla, puede tener unas consecuencias negativas drásticas. Es por esta acción nociva que se recomienda no exponer de forma larga y continuada el cuerpo, y en concreto la piel humana, a la radiación solar directa y para minimizar las consecuencias negativas se recomienda reducir el tiempo de exposición directa y el uso de ropa, sombreros, gafas y de productos cosmético-sanitarios de protección solar.

Según la Asociación Nacional de Perfumería y Cosmética (Stampa) el volumen de ventas de fotoprotectores solares rondó los 190 millones de euros en España en 2015. Aunque el consumo de fotoprotectores ha aumentado progresivamente en los últimos años y se ha intentado educar a la población de un buen uso del sol, el cáncer de piel no ha disminuido lo suficiente.

Para paliar la radiación UV que llega a la piel, los fotoprotectores solares se formulan con principios activos tales como filtros solares y antioxidantes. Los antioxidantes reducen el daño producido por el sol (como desactivar las especies reactivas de oxígeno que se puedan formar), mientras que los filtros solares son compuestos que mediante una interacción con la luz tienen la función de minimizar la cantidad de radiación que llega a la piel.²³

Existe un grupo variado de filtros solares que se agrupan en dos grupos según su mecanismo de interacción con la luz:³

- **Filtros físicos**, que son aquellos que difractan la luz. Estos filtros tienen una estructura química de óxidos inorgánicos, como son el óxido de titanio (TiO₂) y el óxido de zinc (ZnO).
- **Filtros químicos**, que interaccionan con la luz absorbiéndola y desactivándose emitiendo calor, aunque es sabido que alguno de ellos tiene una baja fotoestabilidad. Dentro de este grupo son muchos los tipos pero la mayoría de los filtros legales contienen un mismo tipo de cromóforos (avobenzona, triazina..) con grupos sustituyentes diversos. Los filtros químicos pueden absorber luz en el rango UVA, UVB o en ambos siendo estos últimos los llamados filtros de amplio espectro.

1.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas altamente reactivas compuestas por átomos de oxígeno que se forman como subproductos en el metabolismo de las células (³O₂, ¹O₂, ⁻O₂, H₂O₂, [•]OH o O(³P)). Es el proceso llamado estrés oxidativo.

En plantas, la transferencia electrónica es la principal fuente de formación de EROS en condiciones aeróbicas durante la fotosíntesis. Mientras que en los seres humanos su aparición está asociada al estrés medioambiental así como a la

excesiva exposición a la radiación UV. Así, tanto la radiación UVA al incidir en células humanas en presencia de compuestos fotosensibilizantes es capaz de generar EROS, como también la radiación UVB por absorción directa de los componentes celulares.²⁴⁻²⁵

Las células son capaces de autoprotgerse del daño provocado por EROS utilizando enzimas como superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, glutatión o peroxiredoxinas o haciendo uso de pequeñas moléculas que actúan como antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) o ácido úrico.

El daño provocado por los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a las nucleobases ha sido ampliamente estudiado. Esta especie altamente reactiva es una de las ERO más conocida, y se sabe que reacciona con el ADN por abstracción de hidrógeno desde las unidades 2'-desoxirribosa o por adición a las nucleobases, provocando modificaciones químicas dañinas para la salud como bases oxidadas, sitios abásicos, rupturas de la cadena sencilla, uniones ADN-ADN o uniones cruzadas ADN-proteína.²⁴

El radical hidroxilo ataca a la guanina dando lugar a tres intermedios mayoritarios que corresponden a los aductos C4, C5 y C8. El aducto C8 puede seguir dos caminos de reacción diferentes. Bajo condiciones oxidativas, la formación de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) es mayoritaria; sin embargo, bajo condiciones reductoras la ganancia de un electrón y un protón conduce a la apertura del anillo de imidazol y el producto aislado es 2,6-diamino-5-formamido-4-hidroxipirimidina (FAPy-Guo). En general, los aductos C4 y C5 revierten a la guanina ganando un electrón. También se ha propuesto la deshidratación de los aductos C4, C5 y C8 para explicar la formación de imidazolona y oxazolona.²⁶

El oxígeno atómico ($\text{O}(^3\text{P})$) es otra especie reactiva de oxígeno que puede, en principio, provocar daño oxidativo al ADN. El oxígeno atómico, en su estado fundamental triplete, es un intermedio reactivo muy importante en la química atmosférica y de combustión; por ello, su química en fase gaseosa ha sido objeto de numerosos estudios cinéticos. Por el contrario, su reactividad en disolución ha sido muy poco explorada así como sus efectos biológicos. Scaiano y colaboradores determinaron una serie de constantes de velocidad para la reacción de

numerosos sustratos orgánicos e inorgánicos con oxígeno $O(^3P)$ en disolución, tras fotólisis de destello láser del *N*-óxido de piridina en acetonitrilo.²⁷

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Albini, A.; Pietra, S., Heterocyclic N-oxides; *CRC Press Florida (USA)*, **1991**.
- 2- Brown, J. M.; *J. Cancer*, **1997**, 1167-1170.
- 3- Spence, G. G.; Taylor, E. C.; Burchardt, O. *Chem. Rev.*; **1970**, 70, 231-265.
- 4- Albini, A.; Alpegiani, M. *Chem. Rev.*; **1984**, 84, 43-71.
- 5- Winkle, S. A.; Tinoco, I. J. *Biochemistry* **1978**, 17, 1352-1356.
- 6- Shi, X.; Platz, M. S. J., *Phys. Chem. A.*; **2004**, 108, 4385-4390.
- 7- Xiu-Sheng, M., Raymod, M.; Matcalfe, C. D., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 123-131.
- 8- Bickel, M. H., *Pharmacol. Rev.*; **1969**, 325-355.
- 9- Zou, J.; Chen, Q.; Tang, S.; Jin, X.; Chen, K.; Zhang, T.; Xiao, X., *Mutation Res.*, **2009**, 676, 27-33.
- 10- Seki, H.; Takematsu, A.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 176-179.
- 11- Albini, A.; Fasani, E.; Dacrema, M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1980**, 2738-2742.
- 12- Scaiano, J. C.; Burcher, G., *J. Phys. Chem.*, **1987**, 176-179.
- 13- Zeman, E. M.; Brown, J. M.; Lemmon, M. J.; Hirst, V. K.; Lee, W. W., *Int. J. Radiat. Oncol.*, **1986**, 1239-1242.
- 14- Chowdhury, G.; Junnotula, V.; Scott Daniel, J.; Greenberg, M. M.; Gates, K. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 12870-12877.
- 15- Mason, J. C.; Tennent, G. J., *Chem. Soc.*, **1970**, 70, 911-916.
- 16- Brown, J. M., *Methods Enzymol.* **2007**, 435, 297-321.
- 17- Nagao, M.; Sugimura, T., *Cancer Res.* **1972**, 32, 2369-2375.
- 18- Paul, J. S.; Montgomery, P. O. B., Jr; Louis, B., *Cancer Res.* **1971**, 31, 413-419.
- 19- Kasama, K.; Takematsu, A.; Yamamoto, S.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4918-4921.
- 20- Choudhury, S. D.; Basu, S., *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 8850-8855.
- 21- Costa, J. M. *Diccionario de Química Física*; Publicaciones y ediciones de la Universitat de Barcelona, 2005.
- 22- Lhiaubet-Vallet, V.; Boscá, F.; Miranda, M. A., *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 423-431.
- 23- Shaath, N. A., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 464-469.
- 24- Svobodová, A.; Psotová, J.; Walterová, D., *Biomed. Papers* **2003**, 147, 137-145.
- 25- Chen, W.; Balakrishnan, K.; Kuang, Y.; Han, Y.; Fu, M.; Gandhi, V.; Peng, X., *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 4498-510.
- 26- Frenkel, K., *Pharmac. Ther.* **1992**, 53, 127-166.
- 27- Bucher, G.; Scaiano, J. C., *J. Phys. Chem.* **1994**, 12471-12473.

2

Objetivos

Los *N*-óxidos heterocíclicos han demostrado una amplia versatilidad como agentes bioactivos, por lo que han atraído considerable atención, tanto desde el punto de vista fundamental como por su posible aplicación en la industria química y farmacéutica.

Basados en su naturaleza, en la presente tesis se pretende caracterizar fotoquímicamente algunos *N*-óxidos y sus interacciones con distintas moléculas.

En concreto se han seleccionado los compuestos 4-desoxitirapazamina (DTPZ) y 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO), para los que se plantean los siguientes objetivos:

- Investigar la fotofísica de los estados excitados del compuesto 4-desoxitirapazamina por distintas técnicas, como la espectroscopia de emisión y de absorción transitoria. El empleo de la técnica de fotólisis de destello láser con resolución de nanosegundos (nano-FDL) e incluso de femtosegundos (femto-FDL) permitirá la detección de especies altamente reactivas con vida muy corta.

- Caracterizar el estado excitado singlete de NQNO mediante espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y determinar el valor de la energía de singlete.

- Realizar el estudio dinámico del estado excitado singlete de NQNO mediante espectroscopia de absorción transitoria en la escala de los femtosegundos. Asignar la absorción transitoria $S_1 \rightarrow S_n$, así como determinar el tiempo de vida y monitorizar en tiempo real el cruce intersistema.

- Medir el tiempo de vida del estado excitado triplete de NQNO en matriz sólida a baja temperatura mediante espectroscopia de fosforescencia.

- Estudiar la reacción de transferencia electrónica entre aminas terciarias (trietilamina y DABCO) y el estado excitado triplete de NQNO ($^3NQNO^*$), determinando la constante de velocidad y monitorizando la formación del radical anión ($NQNO^{\bullet-}$) así como del radical protonado ($NQNOH^{\bullet}$).

- Establecer las interacciones existentes entre los estados excitados de NQNO y el aminoácido triptófano, tanto en su estructura monomérica como

formando parte de una macroestructura como es la proteína transportadora albúmina sérica humana (ASH). Para ello se hará uso de técnicas como nano-FDL o espectroscopia de emisión, siguiendo dos aproximaciones: *i)* Excitación selectiva de NQNO a 355 nm para observar la desactivación de su estado excitado triplete en presencia de Trp-ASH, y *ii)* Excitación a 295 nm, para estudiar los cambios de los espectros de emisión de Trp (el único residuo emisor de la ASH) en presencia de NQNO como desactivador.

- Generar oxígeno atómico por fotólisis de *N*-óxidos heterocíclicos, revelando su formación mediante captura química para dar especies detectables en estado estacionario o mediante técnicas con resolución temporal. Comprobar si bemotrizinol (BEMT) puede actuar como un aceptor potencial de oxígeno atómico y actuar así como antioxidante, además de como filtro solar. Determinar mediante fotólisis de destello láser la constante de velocidad de reacción de $O(^3P)$ con BEMT. Identificar los sitios de reacción de BEMT frente a $O(^3P)$ mediante análisis directo de los fotoproductos, en combinación con estudios en sistemas modelo basados en las subestructuras principales de BEMT.

3

Caracterización fotofísica de 4-desoxitirapazamina

3.1. INTRODUCCIÓN

La cirugía, junto a la quimio y la radioterapia, son actualmente las vías más efectivas para la curación del cáncer. Estos tratamientos han despertado un alto interés social y científico, pero también un gran interés económico, debido al volumen de ingresos que reportan a las empresas farmacéuticas.

Son varios los agentes terapéuticos con estructura 1,2,4-triazina que presentan una actividad farmacológica potente.¹ En concreto, el anticancerígeno 3-amino-1,2,4-benzotriazina-1,4-dioxido, llamado también tirapazamina (TPZ), está en estudio en la fase experimental en tratamientos de quimio y radioterapia.² El mecanismo de acción farmacológica de TPZ implica la ruptura oxidativa de ADN con formación de radicales libres. Dicha ruptura empieza por una reducción enzimática de TPZ para producir radicales hidroxilo (HO^\bullet) y 4-desoxitirapazamina (3-amino-1,2,4-benzotriazina-1-oxido) (DTPZ) (**Figura 3.1.**)³

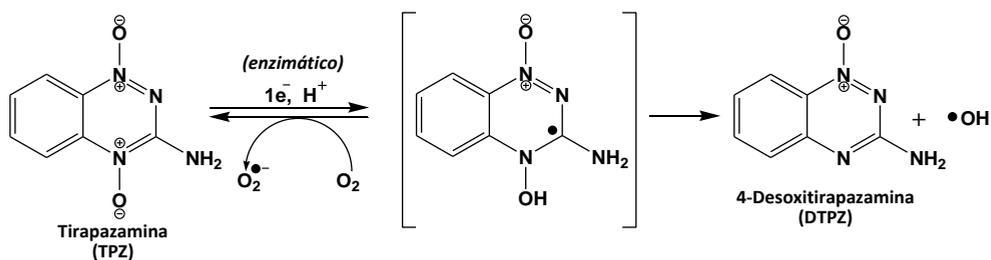


Figura 3.1.: Reacción de reducción enzimática de TPZ para dar DTPZ.

Este proceso se produce en ambientes deficientes de oxígeno, por lo que se estima un nivel de efectividad 13 veces mayor en células hipóxicas (como las cancerígenas).⁴⁻⁶

Sin embargo, uno de los factores que limita el uso de este tipo de tratamientos es la toxicidad que presentan los fármacos frente a células sanas y por tanto la

aparición de efectos adversos en el paciente. Estos efectos pueden ser causados no solo por el fármaco en sí, sino también por los metabolitos que se generan en su biotransformación.

Al analizar cuantitativamente por HPLC la ruta metabólica de TPZ, se detectó que el metabolito mayoritario es DTPZ (**Figura 3.1.**), que a su vez puede ser degradado hasta obtener el anillo heterocíclico completamente desoxigenado (**Figura 3.2.**) obteniendo 3-amino-1,2,4-benzotriazina (BZT).⁷

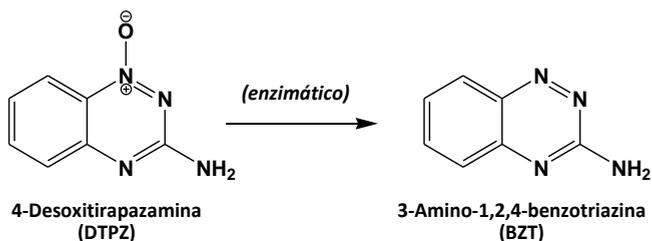


Figura 3.2.: Reacción de reducción enzimática de DTPZ para dar BZT.

El derivado desoxigenado DTPZ es, además del metabolito más formado y el precursor sintético de la TPZ, un producto derivado de la radiólisis de TPZ y uno de sus fotoproductos mayoritarios (**Figura 3.3.**).⁷⁻⁸

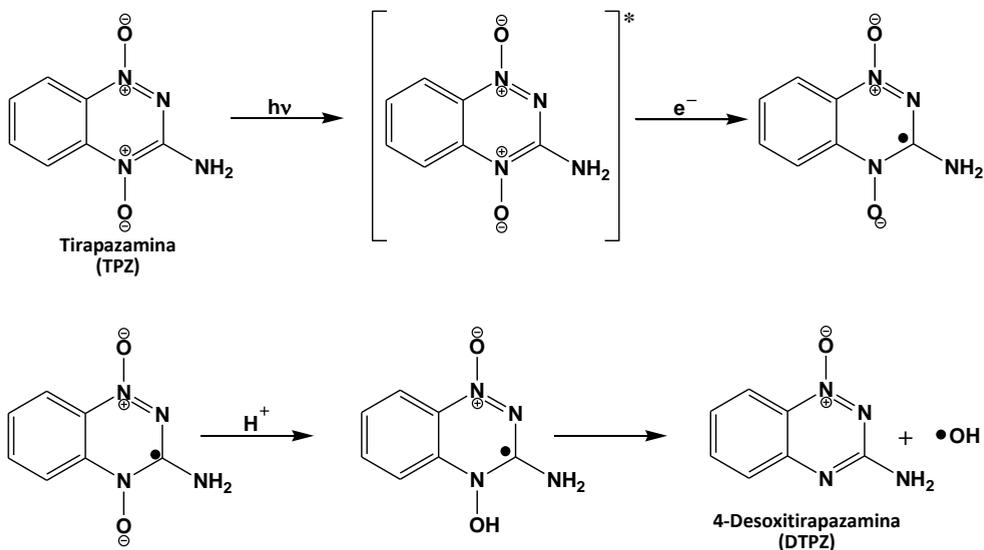


Figura 3.3.: Reacción fotoquímica de TPZ para dar DTPZ.

Es conocido que tanto el radical hidroxilo, formado a partir de la fotodegradación de TPZ, como el radical aminilo (RA), resultante de la reacción del radical hidroxilo con el grupo amino de DTPZ (**Figura 3.4.**), son los responsables de la abstracción de hidrógeno de los azúcares del ADN y causantes, por tanto, de la ruptura de la doble hélice.⁹⁻¹¹

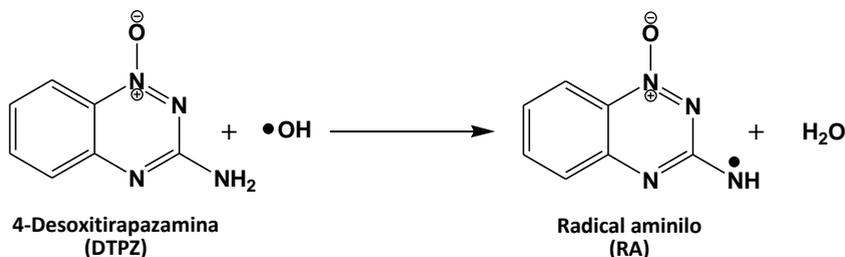


Figura 3.4.: Reacción entre el radical hidroxilo y DTPZ para dar el radical RA

Todos estos antecedentes suscitan un gran interés por conocer la reactividad de los estados excitados de la molécula DTPZ. Sin embargo, las publicaciones donde se describe la fotofísica de DTPZ son escasas. Solamente se dispone de algunos datos, como su espectro de fluorescencia, con máximo de emisión a 475 nm, un rendimiento cuántico en acetonitrilo de 0,12 y un tiempo de vida de 5,4 ns, 50 veces más largo que el de TPZ (datos tomados a $\lambda_{\text{ex}}=422$ nm y temperatura ambiente).¹²⁻¹³

Además, se observa el radical anión de DTPZ cuando se irradia la muestra mediante FDL a 355 nm en presencia de dadores de electrones (KSCN) y en acetonitrilo. Esta especie posee una banda de absorción entre 380 y 510 nm, 1 μ s después del pulso del láser, que coincide con el espectro de absorción UV-vis del radical anión calculado por B3LYP/6-31G en fase gas.¹⁴

Por otro lado, se ha registrado por FDL en la escala de los picosegundos una especie transitoria con máximo de absorción centrado a 640 nm y con un tiempo de vida mayor a 1000 ps que se asigna como absorción $S_1 \rightarrow S_n$ (datos tomados a $\lambda_{\text{ex}}=400$ nm en acetonitrilo).¹⁵

3.2. OBJETIVOS

El objetivo en este capítulo es caracterizar la fotofísica de los estados excitados del compuesto 4-desoxitirapazamina por distintas técnicas. Para ello se completarán todos los parámetros fotofísicos que describen a un compuesto a través de las espectroscopías de emisión y de absorción transitoria.

El empleo de la técnica de fotólisis de destello láser con resolución de nanosegundos e incluso de femtosegundos permitirá la detección de especies con vida muy corta.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Espectroscopía de emisión

Para la caracterización fotofísica de 4-desoxitirapazamina (DTPZ) se registró el espectro de absorción UV-Vis y se caracterizó su espectro de emisión (con máximo a 510 nm) y de excitación de fluorescencia (F) de cuya intersección se calculó la energía de su estado excitado singlete ($^1\text{DTPZ}^*$) obteniendo un valor de $E_S=264$ kJ/mol (**Figura 3.5.**). Además se calculó su rendimiento cuántico de fluorescencia tomando naftaleno como patrón y resultó tener un valor de $\phi_F=0,09$.

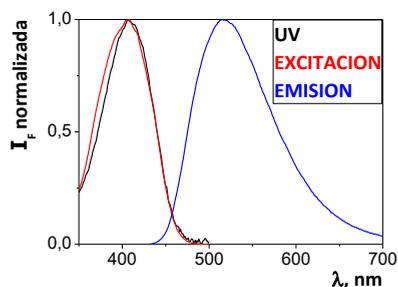


Figura 3.5.: Espectros de absorción UV-Vis (negro), de excitación (rojo) ($\lambda_{em}=510$ nm) y de emisión (azul) de fluorescencia ($\lambda_{ex}=400$ nm) para DTPZ. Todos los espectros están normalizados en sus máximos (MeCN/ N₂/ 298 K).

Se estudió también la dependencia del tiempo de vida de la emisión de fluorescencia con la temperatura, y resultó que al aumentar progresivamente la temperatura el tiempo de vida de fluorescencia disminuyó (**Figura 3.6.A.**).

Con estos resultados, se observó una dependencia inversa del tiempo de vida de fluorescencia con la temperatura, la cual se debe al aumento de la desactivación no radiante por el incremento del número de colisiones con la temperatura (**Figura 3.6.B.**).

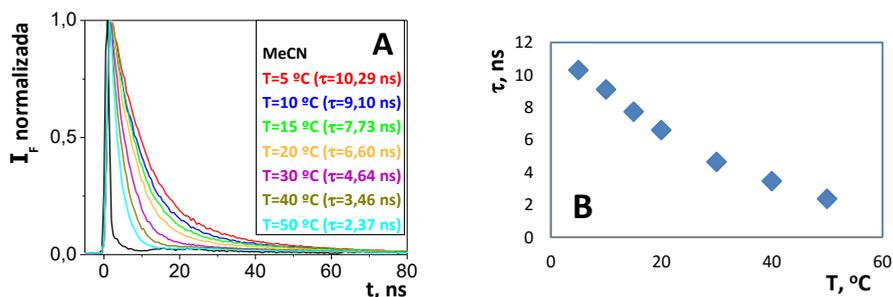


Figura 3.6.: **A.:** Cinéticas de desactivación de fluorescencia de DTPZ a distintas temperaturas (distintos colores) junto con la del disolvente (negro). **B.:** Dependencia del tiempo de vida de la fluorescencia con la temperatura ([DTPZ]= $1 \cdot 10^{-4}$ M/ MeCN/ $\lambda_{\text{ex}}=407$ nm/ $\lambda_{\text{obs}}=510$ nm/ N_2).

Por otro lado, se caracterizó el espectro de emisión de fosforescencia (P) de DTPZ en matriz sólida a baja temperatura con máximo a 610 nm (**Figura 3.7.**). De donde se calculó la energía del estado excitado triplete de DTPZ ($^3\text{DTPZ}^*$) obteniendo un valor de $E_T=206$ kJ/mol. Al monitorizar la desaparición de la señal de fosforescencia en el máximo de emisión (610 nm) (**Figura 3.7. Inserción**) se obtuvo su tiempo de vida de fosforescencia de $\tau=3,7 \pm 0,1$ ms.

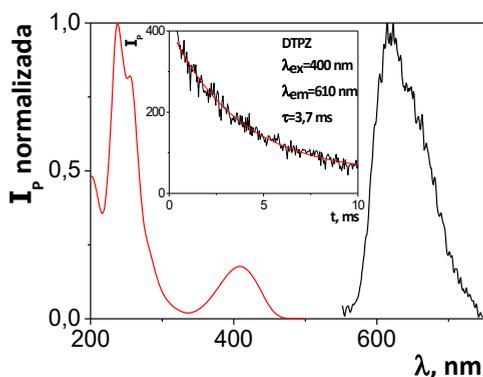


Figura 3.7.: Espectros de absorción UV-Vis (rojo) y de fosforescencia de DTPZ a baja temperatura (negro), normalizados en sus máximos. **Inserción:** Cinética de desaparición de la señal de fosforescencia de DTPZ medida a la $\lambda_{\text{em}}=610$ nm (EtOH/ 77 K/ $\lambda_{\text{ex}}=400$ nm).

3.3.2. Fotólisis de destello láser en la escala de los femtosegundos

El uso de una escala ultrarrápida (de femtosegundos) para la técnica de fotólisis de destello láser (femto-FDL) permitió registrar las especies transitorias de DTPZ con tiempo de vida muy corto. Los experimentos se realizaron con un haz de excitación de 400 nm y con dos tipos de cristales que generaban rangos de registro de longitudes de onda diferentes (un cristal de zafiro y otro de fluoruro de calcio (CaF₂)).

Con los datos obtenidos en femto-FDL, tras realizar las correcciones necesarias y el ajuste de componentes principales (ACP), se obtuvieron los mejores resultados para el análisis de dos componentes (**Tabla 3.1.**). La componente más rápida con máximo a 550 nm, se asignó como relajación vibracional (RV) que es dependiente del disolvente y mostró un tiempo de vida muy corto del orden de los 11 ps en MeCN. La segunda componente, exhibió una banda de absorción transitoria con máximo a 640 nm y se asignó a la absorción del estado excitado singlete de la DTPZ (¹DTPZ*).

Disolvente	Cristal	λ (nm)	τ (ps)	Asignación
MeCN	zafiro	ancho	11	RV
		550, 640	4700	S ₁
THF	zafiro	ancho	16	RV
		550, 640	4400	S ₁

Tabla. 3.1.: Valores obtenidos tras el análisis de componentes principales de los datos generados de las medidas en femto-FDL de DTPZ para ambos cristales ($\lambda_{\text{ex}}=400$ nm/ MeCN/ 298 K).

Al monitorizar los datos obtenidos en femto-FDL, se observó como la banda de absorción asignada como ¹DTPZ*, aumentaba durante los primeros espectros registrados en los picosegundos (ps) y disminuía en la escala de los nanosegundos (ns) calculando un tiempo de vida de 4,7 ns en acetonitrilo (**Figura 3.8.**).

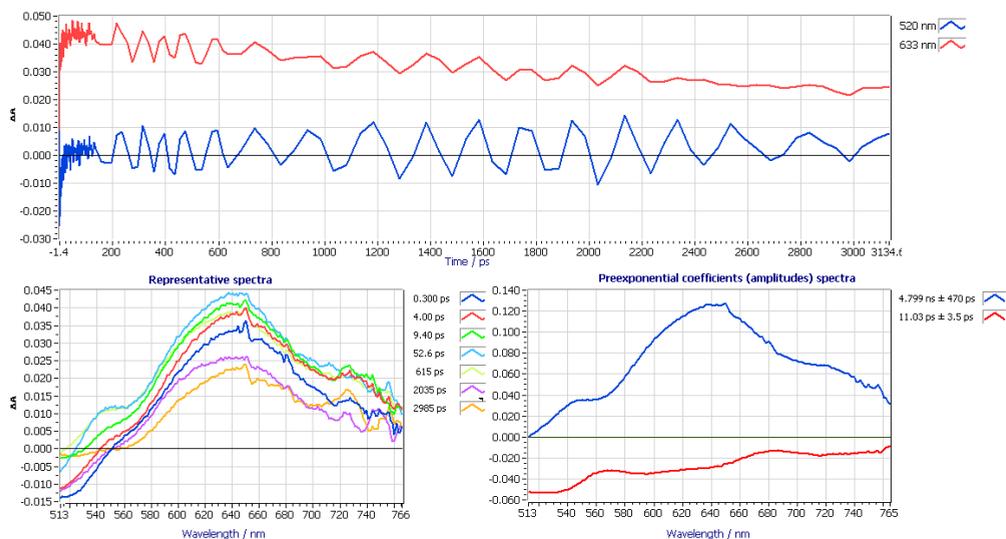


Figura 3.8.: Datos obtenidos por femto-FDL de DTPZ en MeCN ($\lambda_{\text{ex}}=400 \text{ nm}/$ [DTPZ]= $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ / zafiro/ MeCN/ 298 K). **A:** Cinéticas de desactivación de las señales a 520 y 633 nm (máximos de las especies asignadas). **B:** Monitorización de los espectros a diferentes tiempos tras la excitación de DTPZ. **C:** Espectros que resultan de las especies tras el ACP de los datos obtenidos.

3.3.3. Fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos

Al analizar los espectros de absorción transitoria de disoluciones de DTPZ obtenidos en acetonitrilo (MeCN) por FDL con excitación a $\lambda=355 \text{ nm}$ en la escala de los nanosegundos (**Figura 3.9.A.**) se pudo observar una banda poco intensa con máximo centrado en 310 nm, que se asignó a la absorción del estado excitado triplete de DTPZ ($^3\text{DTPZ}^*$). Además se observó una "curiosa" banda negativa con máximo en 500 nm, que coincidió con la banda de fluorescencia registrada (**Figura 3.7.**). Al comparar las cinéticas a ambas longitudes de onda (**Figura 3.9.B.**), se observó que la cinética de desactivación a 310 nm (rojo) tiene un tiempo de vida de $\tau=4 \mu\text{s}$ para la especie asignada tentativamente como $^3\text{DTPZ}^*$ y que para la señal a 500 nm (negro) primero se aprecia una recuperación muy rápida que inmediatamente después del pulso del láser baja de forma más lenta y finalmente desaparece en la escala de los microsegundos. El último tramo de dicha cinética

se correlacionó con la desaparición de la especie transitoria $^3\text{DTPZ}^*$ observada a 310 nm. Con todo ello, se atribuyó provisionalmente la banda negativa a 500 nm a fluorescencia retardada (FR).

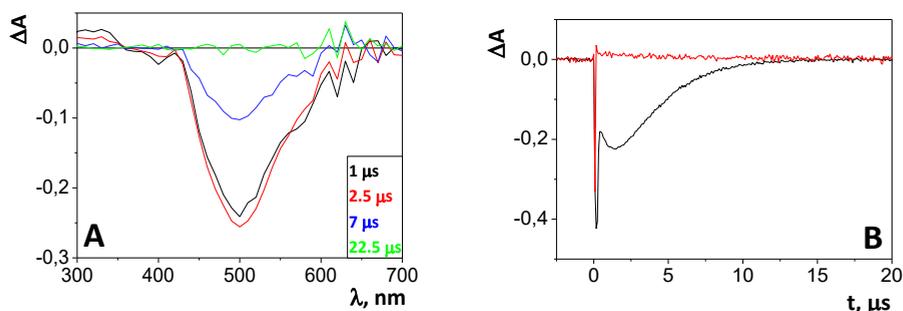


Figura 3.9. **A:** Espectros de absorción transitorios de DTPZ registrados por FDL en muestra purgada en N_2 , a distintos tiempos después del pulso láser. **B:** Cinéticas de las especies excitadas de DTPZ formadas por FDL a $\lambda_{\text{obs}}=500$ nm (negro) y $\lambda_{\text{obs}}=310$ nm (rojo) ($[\text{DTPZ}]=2 \cdot 10^{-4}$ M/ MeCN/ $\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ 15 mJ/ 20 $^{\circ}\text{C}$).

Con el objetivo de confirmar que la banda con máximo a 310 nm pertenece a la especie $^3\text{DTPZ}^*$, se llevó a cabo el estudio de transferencia de energía de $^3\text{DTPZ}^*$ a β -caroteno (ver *Capítulo 1-Introducción, apartado 1.3.*), cuyos resultados se detallan en el siguiente apartado. En este sentido también se realizaron medidas de FDL excitando a 266 nm (en lugar de 355 nm) con el objetivo de mejorar la detección del estado excitado triplete. Por otro lado, ya que de la FR son conocidos varios fenómenos que la pueden producir, se realizaron diferentes estudios para averiguar su naturaleza. Así se analizó cómo se podría ver afectada la FR por factores como la presencia de oxígeno, la concentración, la energía de disparo del láser y la temperatura.

Medidas de FDL excitando a 266 nm

A 355 nm no es posible excitar selectivamente DTPZ, ya que a esta longitud de onda también absorbe $^3\text{DTPZ}^*$. Por ello se realizaron medidas a $\lambda_{\text{ex}}=266$ nm (**Figura 3.10.A.**), observando en el espectro de absorción transitorio diversas

bandas. Las absorciones negativas son debidas a la absorción de DTPZ en el estado fundamental (266 y 400 nm) y a la FR (500 nm), la banda de absorción positiva corresponde a la absorción T-T de $^3\text{DTPZ}^*$ con máximo centrado a 310 nm.

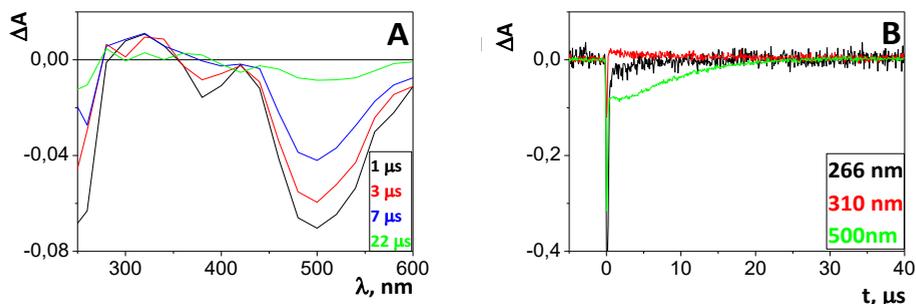


Figura 3.10. A.: Espectros de absorción transitoria de DTPZ a distintos tiempos después del pulso láser B.: Cinéticas de desaparición de las señales observadas a distintas longitudes de onda ($[\text{DTPZ}] = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M/ MeCN/ } \lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm/ N}_2 / 15 \text{ mJ}$).

Con la excitación a 266 nm se consiguió mejorar la detección de la señal a 310 nm, asignada al $^3\text{DTPZ}^*$. Así, las cinéticas de desactivación de la absorción T-T a 310 nm y de la FR a 500 nm mostraron una gran similitud (con tiempos de vida del mismo orden) (**Figura 3.10.B.**). Por tanto, se podría postular al triplete de DTPZ como el precursor inmediato de la FR.

Transferencia de energía a β -caroteno

El β -caroteno (βCAR) (como se explica en el capítulo de Introducción) tiene un rendimiento cuántico de cruce intersistemas prácticamente nulo, con una baja energía de triplete y una banda de absorción transitoria triplete-triplete ($T_1 \rightarrow T_n$) (T-T) estrecha e inconfundible con máximo a 510 nm ($^3\beta\text{CAR}^*$) (es por tanto accesible a través de una transferencia de energía T-T. Así cuando se irradió por FDL una mezcla de DTPZ y βCAR en proporción 1:1 (**Figura 3.11.A.**) se observó la formación de la absorción transitoria T-T del $^3\beta\text{CAR}^*$. Además, al comparar las cinéticas de desaparición de las señales registradas a 310 nm para distintas mezclas de DTPZ y βCAR (**Figura 3.11.B.**), se detectó una disminución del tiempo

de vida del posible $^3\text{DTPZ}^*$ a medida que aumentó la concentración de βCAR , lo que confirmó una transferencia de energía entre los estados excitados triplete de ambas moléculas, esperable ya que $E_T(\text{DTPZ}) > E_T(\beta\text{CAR})$. De esta interacción se pudo determinar una constante de desactivación del $^3\text{DTPZ}^*$ por $^3\beta\text{CAR}^*$ de $k_d = 1,1 \pm 0,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

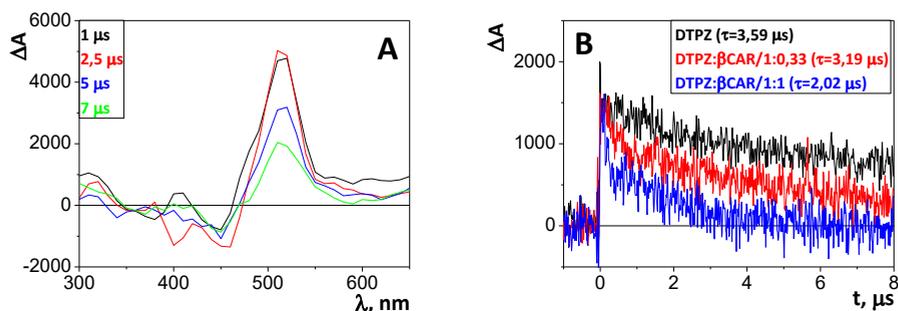


Figura 3.11. **A.**: Espectros de absorción transitoria de la mezcla DTPZ: β CAR/1:1 a distintos tiempos después del pulso láser, medido por FDL. **B.**: Monitorización de las cinéticas de desactivación de la banda de $^3\text{DTPZ}^*$ a $\lambda = 310 \text{ nm}$ por FDL a distintas concentraciones de βCAR (tiempo de vida insertado entre paréntesis). ($[\text{DTPZ}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ / MeCN/ $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ / N_2 / 20 $^\circ\text{C}$ / 20 mJ).

Desactivación por oxígeno molecular

Se quiso comprobar si en la aparición de la banda negativa atribuida a FR estaba implicado el $^3\text{DTPZ}^*$, se realizaron medidas mediante FDL de dos muestras con distintas concentraciones de oxígeno molecular (O_2) en disolución, manteniendo el resto de parámetros constantes. Es sabido que el O_2 es un buen desactivador de los estados excitados triplete ($E_\Delta = 92 \text{ kJ/mol}$), que en este caso podrían ser precursores de la FR (ver Capítulo 1-Introducción, apartado 1.3.).

Al analizar el espectro de absorción de especies transitorias de la muestra de DTPZ en presencia de oxígeno (**Figura 3.12.A.**), se puede observar que la especie asignada como triplete con máximo a 310 nm es prácticamente inexistente. Además, la banda negativa a 500 nm, tiene una rápida recuperación, como sería lo esperable para la fluorescencia directa (F) desde el $^1\text{DTPZ}^*$ (**Figura 3.12.B.**).

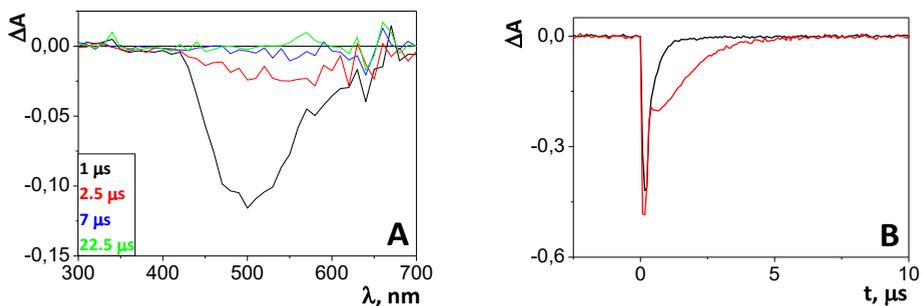


Figura 3.12.: **A:** Espectros de absorción transitoria de DTPZ registrados por FDL con O₂ a concentración atmosférica a distintos tiempos después del pulso láser. **B:** Monitorización de las cinéticas de desactivación de la fluorescencia a 500 nm para las muestras de DTPZ (rojo- muestra purgada con nitrógeno [O₂]=0 M y negro- muestra con O₂ a concentración atmosférica [O₂]=1,9*10⁻³ M) ([DTPZ]=2*10⁻⁴ M/ MeCN/ λ_{ex}=355 nm/ 15 mJ/ 20 °C).

Por tanto se puede concluir que en presencia de oxígeno se desactiva la fluorescencia retardada proveniente del ³DTPZ*.

Dependencia de la FR con la concentración de DTPZ.

Tal y como se puede observar en la **Figura 3.13.** al variar la concentración de DTPZ en disolución, manteniendo todos los demás parámetros de medida constantes, se observó una dependencia directa entre la intensidad de la señal de FR y la concentración del *N*-óxido.

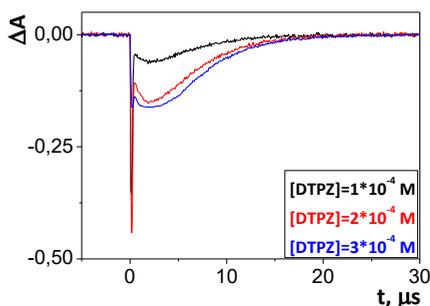


Figura 3.13.: Monitorización de la señal de fluorescencia de la banda negativa observada a λ=500 nm por FDL para distintas concentraciones de DTPZ (MeCN/ λ_{ex}=355 nm/ N₂/ 15 mJ/ 20 °C).

A medida que la concentración de DTPZ aumenta, lo hace también la emisión de FR. Cabe puntualizar que no se apreció una variación significativa del tiempo de vida de FR ($\tau=5,5 \mu\text{s}$).

Influencia de la energía de disparo del láser.

Continuando con el estudio se analizaron, utilizando FDL, muestras de DTPZ cambiando la energía (E) del disparo del láser y manteniendo la concentración y los demás parámetros de medida constantes. Al comparar las señales registradas a 500 nm (**Figura 3.14.A.**) se observó como al aumentar la E se registró un incremento en la intensidad de la señal negativa de FR.

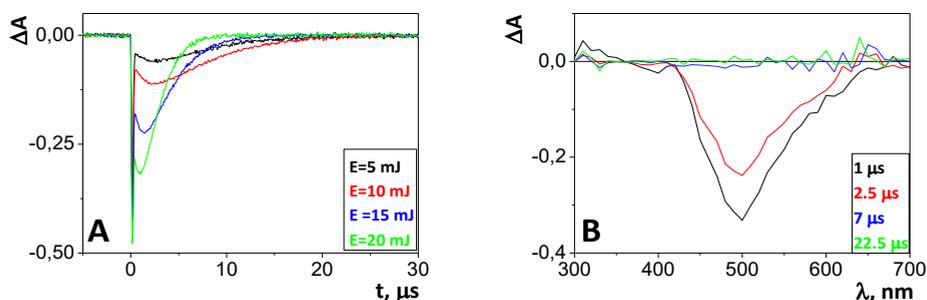


Figura 3.14.: **A.:** Monitorización de la banda negativa observada a $\lambda=500 \text{ nm}$ para distintas energías de disparo en FDL de DTPZ (tiempo de vida). **B.:** Espectros de absorción transitoria de DTPZ a distintos tiempos después del pulso láser, medido por FDL con una energía de 20 mJ. ($[\text{DTPZ}]=2 \cdot 10^{-4} \text{ M/ MeCN/ } \lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm/ N}_2/ 20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Además, el tiempo de vida de la FR disminuyó con la potencia del láser según los siguientes valores: 7,42 μs para un disparo de 5 mJ, 7,48 μs para un disparo de 10 mJ, 3,64 μs para un disparo de 15 mJ y 2,31 μs para un disparo de 20 mJ, lo cual indica una reactividad mayor del precursor. La dependencia observada entre la intensidad de FR y la E, estaría de acuerdo con una fluorescencia retardada de tipo P.

Influencia de la temperatura.

La dependencia de la FR con la temperatura (T) se estudió realizando una serie de medidas por FDL variando únicamente este parámetro (**Figura 3.15.A.**) Como se observa en la **Figura 3.15.B.**, al aumentar T se registró una disminución en la intensidad de la señal negativa de FR a 500 nm, así como un acortamiento en su tiempo de vida. Así se obtuvieron los siguientes resultados: 9,05 μs a 5 $^{\circ}\text{C}$; 5,14 μs a 10 $^{\circ}\text{C}$; 4,65 μs a 20 $^{\circ}\text{C}$; 2,28 μs a 30 $^{\circ}\text{C}$ y 1,68 μs a 40 $^{\circ}\text{C}$. A su vez, el tiempo de vida del triplete de DTPZ observado a 310 nm (**Figura 3.15.C.**) también experimentó una disminución paralela con los siguientes valores obtenidos: 6,27 μs a 5 $^{\circ}\text{C}$; 3,73 μs a 10 $^{\circ}\text{C}$; 3,70 μs a 20 $^{\circ}\text{C}$; 1,15 μs a 30 $^{\circ}\text{C}$ y 0,52 μs a 40 $^{\circ}\text{C}$.

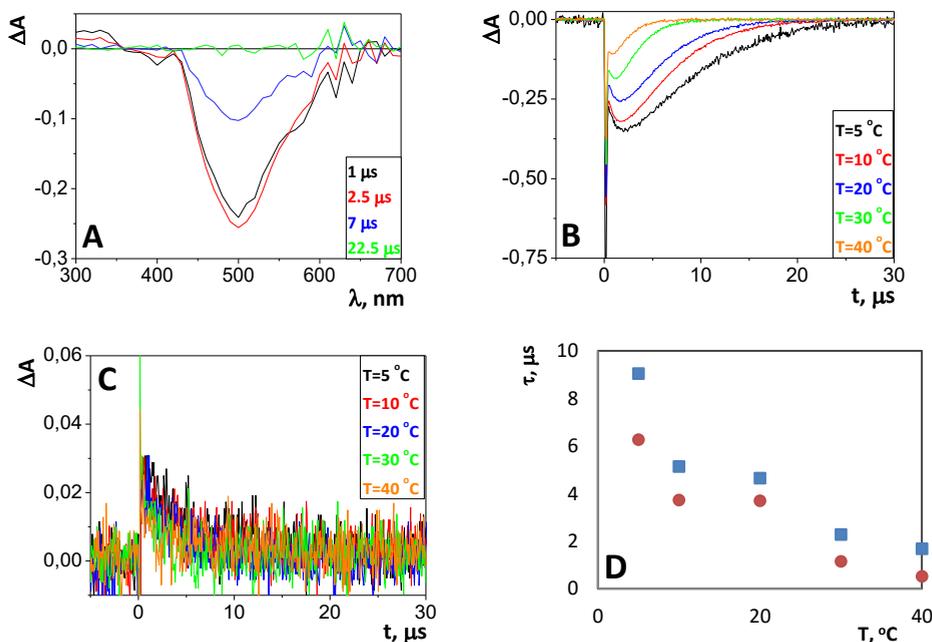


Figura 3.15.: **A.:** Espectros de absorción transitoria de DTPZ a distintos tiempos después del pulso láser, medidos por FDL a 20 $^{\circ}\text{C}$. **B.:** Cinéticas de desaparición de la fluorescencia retardada de DTPZ observada por FDL a $\lambda=500$ nm a distintas temperaturas. **C.:** Desaparición de la señal de $^3\text{DTPZ}^*$ observado a 310 nm para distintas temperaturas. **D.:** Dependencia del tiempo de vida de la fluorescencia retardada observada a 500 nm (rojo) y del $^3\text{DTPZ}^*$ detectado a 310 nm (azul) frente a la temperatura. ($[\text{DTPZ}]=2 \cdot 10^{-4}$ M/ MeCN/ $\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ N_2 / 15 mJ).

Con los resultados obtenidos se pudo representar la dependencia del tiempo de vida, tanto de la FR como del $^3\text{DTPZ}^*$, con la temperatura (**Figura 3.15.D.**), observando una relación inversamente proporcional entre temperatura y FR. De dichos resultados se postula que lo observado es una FR tipo P (ya que FR tipo E es dependiente de la temperatura).

3.4. CONCLUSIONES

Conclusiones

En el presente capítulo, se ha completado la caracterización de los estados excitados singlete y triplete del compuesto conocido como 4-desoxitirapazamina ($^1\text{DTPZ}^*$ y $^3\text{DTPZ}^*$ respectivamente), donde se han determinado sus energías, bandas de emisión y absorción y tiempos de vida de dichos estados excitados, que se resumen a continuación:

Emisión de fluorescencia (F)	Emisión de fosforescencia (P)	Absorción $S_1 \rightarrow S_n$	Absorción $T_1 \rightarrow T_n$
$E_S = 264 \text{ kJ/mol}$ $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ $\tau_F < 1 \text{ ns}$	$E_T = 206 \text{ kJ/mol}$ $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ $\tau_P = 3,7 \text{ ms}$	$\lambda_{S-S} = 640 \text{ nm}$ $\tau_S = 4700 \text{ ps} = 4,7 \text{ ns}$	$\lambda_{T-T} = 310 \text{ nm}$ $\tau_T = 4 \text{ }\mu\text{s}$

Además se ha descrito una banda adicional observada a través de nano-FDL, y asignada como fluorescencia retardada (FR).



Tras analizar los datos obtenidos en los experimentos realizados, se ha caracterizado la FR como de Tipo P, ya que dicha emisión viene dada por la aniquilación de dos estados excitados triplete de DTPZ (ATT) y por tanto su velocidad está limitada por la del proceso de ATT ($\tau_{FR} \approx 5 \text{ }\mu\text{s}$).

Todos los factores analizados apoyan la asignación de FR como de tipo P:

- La presencia de oxígeno desactiva el $^3\text{DTPZ}^*$ y por tanto la FR.
- Al aumentar el número de los estados excitados triplete de DTPZ, aumenta la FR, debido tanto a un incremento en la concentración de DTPZ como a una mayor energía del disparo del láser.
- No presenta activación térmica, ya que un aumento de la temperatura, provoca una disminución de la FR.

Resumiendo de forma esquemática:

↑ [OXIGENO]	↓FR
↑ [DTPZ]	↑FR
↑ POTENCIA HAZ	↑FR
↑ TEMPERATURA	↓FR
↑ LASER 266	↑FR

Conclusions

In this chapter, a complete characterization of the singlet and triplet excited state of 4-desoxitirapazamine ($^1\text{DTPZ}^*$ y $^3\text{DTPZ}^*$ respectively) has been achieved. Specifically, the excited state energies and live times, as well as the emission and absorption spectra, have been established; the results are summarized in the following table:

Emisión de fluorescencia (F)	Emisión de fosforescencia (P)	Absorción $S_1 \rightarrow S_n$	Absorción $T_1 \rightarrow T_n$
$E_S = 264 \text{ kJ/mol}$ $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ $\tau_F < 1 \text{ ns}$	$E_T = 206 \text{ kJ/mol}$ $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ $\tau_P = 3,7 \text{ ms}$	$\lambda_{S-S} = 640 \text{ nm}$ $\tau_S = 4700\text{ps} = 4,7 \text{ ns}$	$\lambda_{T-T} = 310 \text{ nm}$ $\tau_T = 4 \mu\text{s}$

Besides, a negative band has been observed by nano-LPF and assigned to delayed fluorescence (FR).



After analyze the experimental results obtained, the DF band has been classified as P type, since it arise from triplet-triplet annihilation of DTPZ. Accordingly, its decay rate is limited by the triplet lifetime ($\tau_{FR} \approx 5 \mu\text{s}$).

All analyzed factors support the FR P type assignment:

- a) The presence of oxygen deactivate both $^3\text{DTPZ}^*$ and RF.
- b) When generation of the triplet excited state is enhanced (either by increasing the concentration of DTPZ or the laser energy), a parallel increase of the RF intensity is observed.
- c) No thermal activation is detected, as a matter of fact, the RF band intensity decreases with increasing temperature.

Schematically summary:

↑ [OXYGEN]	↓FR
↑ [DTPZ]	↑FR
↑ LASER ENERGY	↑FR
↑ TEMPERATURE	↓FR
↑ LASER 266	↑FR

3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos y disolventes

Los reactivos (DTPZ y β CAR) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich®, y los disolventes (ACN/MeOH/THF/DCM/HEX/TOL) de Merck®.

Medidas de absorción UV-vis

Las medidas se llevaron a cabo en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm con capacidad máxima de 4 ml, a 22 °C. La concentración para DTPZ fue de $2 \cdot 10^{-4}$ M, que se usó para posteriores medidas de FDL.

Medidas por fotólisis de destello láser en la escala de los femto segundos

Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 400 nm, con $[DTPZ]=2 \cdot 10^{-5}$ M (en varios disolventes acetonitrilo (MeCN) y tetrahidrofurano (THF)). Las medidas en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 2 mm y a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,3 u.a. y se usó un volumen de 40 ml de disolución.

Medidas por fotólisis de destello láser a $\lambda_{ex}=355$ nm en escala de nanosegundos

Los experimentos de nano-FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm, con una $[DTPZ]=2 \cdot 10^{-4}$ M en ACN, una duración de pulso <10 ns y una potencia de 15 mJ. Las medidas de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 10x10 mm y a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente), previa purga en atmósfera inerte (burbujeo de 20 minutos de N_2). La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,3 u.a. y se usó un volumen de 3 ml para cada disolución.

Medidas por fotólisis de destello láser a $\lambda_{\text{ex}}=266\text{nm}$ en escala de nanosegundos

Los experimentos de nano-FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm, con una $[\text{DTPZ}]=1*10^{-5}$ M, una duración de pulso <10 ns y una potencia de 9 mJ. Las medidas de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 10×10 mm y a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente), previa purga en atmósfera inerte (burbujeo de 20 minutos de N_2). La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,3 u.a. y se usó un volumen de 3 ml para cada disolución.

Medidas de fluorescencia

Los experimentos de emisión de fluorescencia se realizaron con una absorción de las muestras menor a 0.1 u.a. $[\text{DTPZ}]=1*10^{-4}$ M en acetonitrilo, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de nitrógeno.

Medidas de fosforescencia

Los experimentos de emisión de fosforescencia se realizaron a baja temperatura (77 K) con una absorción de las muestras menor a 0.1 u.a. $[\text{DTPZ}]=5*10^{-5}$ M en disoluciones de etanol.

3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kumar, R.; Sirohi, T. S.; Singh, H.; Yadav, R.; Roy, R. K.; Chaudhary, A.; Pandeya, S. N., *Mini-Rev. Med. Chem.* **2014**, *14*, 168-207.
- 2- Daniels, J. S.; Gates, K. S.; Tronche, C.; Greenberg, M. M., *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1254-1257.
- 3- Laderoute, K.; Watchman, P.; Rauth, A. M., *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 1487-1495.
- 4- Monge, A.; Palop, J.A., Lopez de Cerain, A.; Senador, V.; Martinez, J. M.; Sainz, Y.; Narro, S.; Garcia, E., de Miguel, C., *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1786-1792.
- 5- Brown, J. M.; Koong, A., *Br. J. Cancer* **1993**, *26*, 79-81.
- 6- Brown, J. M., *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1163-1170.
- 7- Fuchs, T.; Chowdhary, G.; Barnes, C. L.; Gates, K. S., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 107-114.
- 8- Shi, X.; Mandel, S. M.; Platz, M. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *129*, 4542-4550.
- 9- Chowdhury, G.; Junnotula, V.; Daniels, J. S.; Greenberg, M. M.; Gates, K. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12870-12877.
- 10- Hwang, J.-T.; Greenberg, M. M.; Fuchs, T.; Gates, K. S., *Biochemistry* **1999**, *38*, 14248-14255.
- 11- Junnotula, V.; Sarkar, U.; Sinha, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 748-156.
- 12- Shi, X.; Poole, J. S.; Emenike, I.; Burdzinski, G.; Platz, M. S., *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1491-1496.
- 13- Poole, J. S.; Hadad, C. M.; Platz, M. S.; Fredin, Z. P.; Pickard, L.; Guerrero, E. L.; Kessler, M.; Chowdhury, G.; Kotandeniya, D.; Gates, K. S., *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 339-345.
- 14- Tari, M. T.; Ahmadinejad, N., *Struct. Chem.* **2014**, *25*, 1281-1287.
- 15- Brown, J. M., *Cancer Res.* **1999**, 5863-5870.

4

Caracterización fotofísica del *N*-óxido de 4-Nitroquinolina

4.1. INTRODUCCIÓN

El heterociclo aromático 4-nitroquinolina N-óxido (NQNO) (**Figura 4.1.**) es usado como modelo carcinogénico desde que Nakahara *et al.*¹ descubrieran en 1957 sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas, que están ligadas a su capacidad para formar complejos de transferencia de carga (TC) con ADN.²⁻⁴

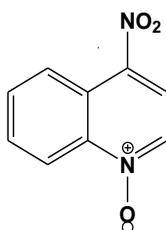


Figura 4.1.: Estructura molecular de 4-nitroquinolina N-óxido (NQNO)

La fotofísica de NQNO es parcialmente conocida, pero aún existen muchos aspectos por investigar. Específicamente se ha encontrado publicado el espectro de fluorescencia de NQNO en disolución acuosa con un máximo a 485 nm, pero no se muestra el espectro de excitación de éste y tampoco se conoce su tiempo de vida o la energía del estado excitado singlete.⁵

Aunque el estado excitado triplete de NQNO ha sido más estudiado, su caracterización es incompleta. Los estudios de Kubota y Yamakawa muestran el espectro de emisión y excitación de fosforescencia en una disolución de éter (y en mezclas con isopropanol) a 77 K, con un máximo de emisión a 700 nm (y 708-675 nm), que se atribuye a una banda de naturaleza π - π .⁶ Aunque no se mide su tiempo de vida se indica que debe estar alrededor de los 10 ms. Por otra parte Arai determina la energía del triplete en una disolución de metanol:etanol en proporción 1:1 con un valor de $E_T=177$ kJ/mol (**Figura 4.2.**)⁷

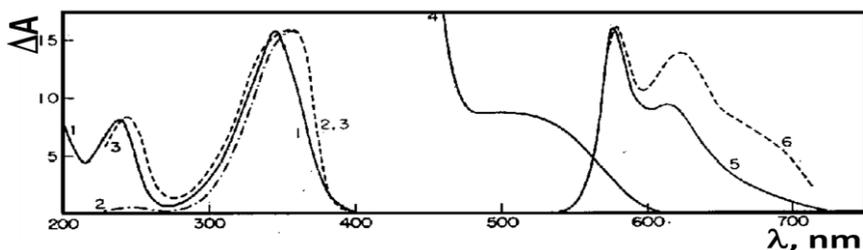


Figura 4.2.: Datos de fosforescencia (referencia 6). Espectros de NQNO: (1) espectro de absorción de NQNO (éter; Tª amb); (2) espectro excitación de fosforescencia (éter, 77 K); (3) espectro 2 corregido; (4) absorción singlete-triplete (atmósfera de oxígeno en cloroformo; [NQNO]=0,489 M); (5) espectro de fosforescencia (éter, 77 K); (6) espectro 5 corregido.

Tanto en los trabajos de Arai, así como posteriormente en los publicados por el grupo de Basu, se pueden encontrar datos sobre la caracterización del NQNO por Fotólisis de Destello Láser (FDL), que da lugar a un espectro de absorción transitorio en acetonitrilo con un máximo a 560 nm asignado a la transición triplete-triplete (**Figura 4.3.**).^{5,7} Arai analiza NQNO por FDL en disolución de benceno y registra un espectro con máximo a 530 nm y tiempo de vida de $\tau=26 \mu\text{s}$ ($\lambda_{\text{ex}}=347 \text{ nm}$); la asignación de esta especie como triplete de NQNO ($^3\text{NQNO}^*$) se confirma por transferencia de energía al tetraceno observando la formación de su triplete con máximo a 460 nm, que ocurre con una constante de desactivación de $k_d=8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.⁸

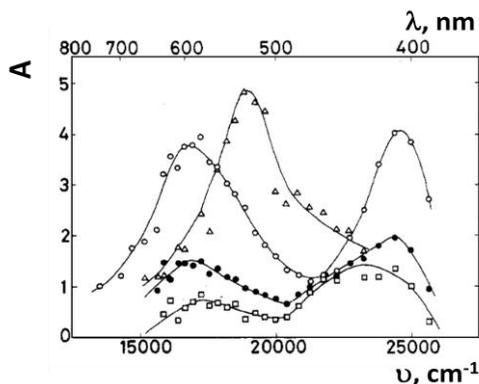
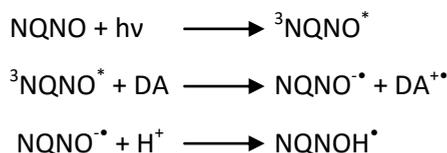


Figura 4.3.: Datos de FDL de NQNO (referencia 7). Espectros de absorción transitoria de disoluciones acuosas de NQNO tamponados a pH=7 registrados a 40, 80 μs después del pulso (puntos, cuadrados) y al final del pulso (círculos) ([NQNO]= $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}}=347 \text{ nm}$), así como en benceno a 4,8 μs después del pulso (triángulos) ([NQNO]= $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm}$).

También se ha observado que $^3\text{NQNO}^*$ tiene un comportamiento diferente dependiendo del medio. En el espectro de absorción transitorio de NQNO ($\lambda_{\text{ex}}=347$ nm) en disolución acuosa tamponada (pH=7) se observan máximos a 410 y 590 nm ($\tau=50$ μs) así como a 470 nm ($\tau>100$ μs) las dos primeras bandas corresponden al $^3\text{NQNO}^*$ mientras que la tercera se asigna al radical protonado de NQNO. La diferencia entre ambos disolventes se atribuye a la fuerte interacción entre el disolvente prótico y el enlace N-O del N-óxido.^{7,9}

Según la bibliografía el triplete de NQNO, en presencia de dadores de electrones (DA), puede dar lugar a transferencia electrónica (Tel) generando el radical anión de NQNO ($\text{NQNO}^{\bullet-}$) y el radical catión del dador ($\text{DA}^{+\bullet}$), que posteriormente puede sufrir una protonación por el medio dando lugar al radical protonado de NQNO (NQNOH^{\bullet}) (**Esquema 4.1.**).⁷⁻¹⁰



Esquema 4.1.: Reactividad de NQNO (referencia 7).

En los antecedentes bibliográficos, se ha identificado por FDL la formación del radical protonado de NQNO (con un máximo de absorción que oscila entre 440 y 470 nm, dependiendo del disolvente) y posteriormente la del radical anión de NQNO (que fue caracterizado por Kubota como un espectro de absorción transitoria con máximos a 520 nm y 490 nm).^{7,9,11}

El anión radical $\text{NQNO}^{\bullet-}$ fue detectado al medir por FDL una disolución de NQNO en acetonitrilo y en presencia de diazabiciclooctano (DABCO) como dador de electrones. Al realizar las medidas en una mezcla de acetonitrilo y agua al 20%, se observó la formación del NQNOH^{\bullet} . Sin embargo no se dio ninguna constante de interacción entre $^3\text{NQNO}^*$ y DABCO ni se pudo determinar que la formación de $\text{NQNO}^{\bullet-}$ ocurre a partir de $^3\text{NQNO}^*$.¹⁰

El espectro obtenido para NQNOH^{\bullet} sugiere que el lugar de protonación preferido en el anión radical de NQNO es el oxígeno de la función N-óxido. Esto está de acuerdo con los cálculos teóricos y con los resultados experimentales obtenidos mediante espectroscopia infrarroja (**Figura 4.4.**).¹⁰⁻¹²

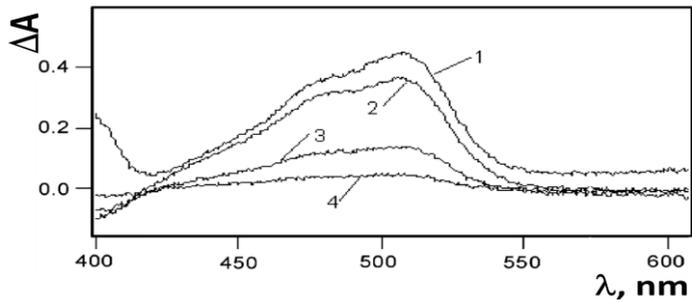


Figura 4.4.: Datos de FDL de NQNO (referencia 10). Espectros de absorción transitoria de una mezcla de NQNO y DABCO en acetonitrilo a diferentes tiempos después del disparo láser (1.- justo después del pulso láser; 2.- 500 ns; 3.- 3 μ s y 4.- 10 μ s) ($[NQNO]=3 \cdot 10^{-4}$ M; $[DABCO]=8 \cdot 10^{-3}$ M) ($\lambda_{ex}=355$ nm).

4.2. OBJETIVOS

El objetivo general del capítulo es caracterizar los estados excitados del compuesto 4-nitroquinolina *N*-óxido por distintas técnicas y en distintos medios.

Específicamente se pretende conseguir los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar el estado excitado singlete de NQNO mediante espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y determinar el valor de la energía de singlete.
2. Realizar un estudio dinámico del estado excitado singlete de NQNO mediante espectroscopia de absorción transitoria en la escala de los femtosegundos. Caracterizar la absorción transitoria $S_1 \rightarrow S_n$, así como determinar el tiempo de vida y monitorizar en tiempo real el cruce intersistema.
3. Medir el tiempo de vida del triplete de NQNO en matriz sólida a baja temperatura mediante espectroscopia de fosforescencia.
4. Estudiar la reacción de transferencia electrónica entre aminas terciarias (trietilamina y DABCO) y el estado excitado triplete de NQNO determinando la constante de velocidad y monitorizando la formación del radical anión ($NQNO^{\bullet-}$) y del radical protonado ($NQNOH^{\bullet}$).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se registró el espectro de absorción UV-vis de 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) (**Figura 4.5.**), para seleccionar longitudes de onda de excitación apropiadas para la técnica de fotólisis de destello láser (FDL) en las escalas de los nanosegundos (355 nm) y de los femtosegundos (400 nm).

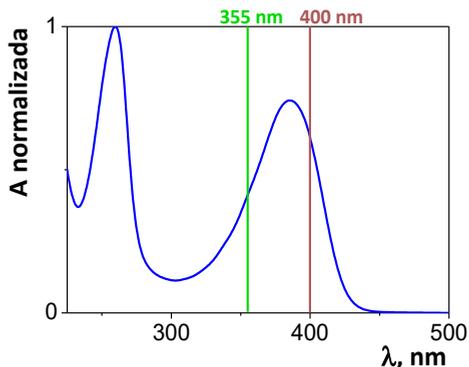
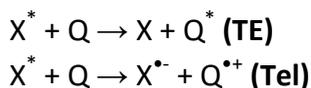


Figura 4.5.: Espectro de UV-vis de NQNO en MeCN.

Por otro lado, puesto que en el presente estudio se realizan varias desactivaciones dinámicas de los estados excitados se explica dicho fenómeno esquemáticamente como una transferencia de energía (TE) o de electrones (Tel) entre una especie excitada (X^*) y una especie desactivadora (Q)] (**Esquema 4.2.**).



Esquema 4.2.: Reacción de transferencia de energía y electrónica.

Como muestra la ecuación de Stern-Volmer (**Ecuación 1.1.**), en estas desactivaciones dinámicas se puede medir un parámetro particular de A (como el tiempo de vida) que modifica su valor al añadir concentraciones crecientes de Q. Así, τ_0 y τ son el tiempo de vida de la especie excitada (X^*) en ausencia y en presencia de aceptor, respectivamente. Tras representar τ_0/τ vs [Q] y hacer un ajuste lineal de los datos obtenidos, del valor de la pendiente se puede calcular la constante de desactivación (k_d) que indica la eficiencia de la interacción entre X y Q.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_d \cdot \tau_0 \cdot [Q]$$

Ecuación 4.1.: Relación de Stern-Volmer (S-V) para el cálculo de la constante de desactivación a partir de la pendiente de un ajuste lineal.

En consecuencia, se procedió a caracterizar el estado excitado triplete de NQNO ($^3\text{NQNO}^*$) por FDL y a estudiar su reactividad frente a diversos dadores de electrones.

4.3.1. Caracterización del estado excitado singlete de NQNO

Estudio de la fluorescencia

Se registró el espectro de emisión y el espectro de excitación de fluorescencia (F) de NQNO en una disolución de acetonitrilo (**Figura 4.6.**) de cuya intersección se pudo calcular la energía del estado excitado singlete ($^1\text{NQNO}^*$), que resultó de un valor de 255 kJ/mol (470 nm). El rendimiento cuántico de fluorescencia calculado, usando naftaleno como patrón, dio un valor de tan sólo $\phi_F=0,001$.

El tiempo de vida de fluorescencia no se pudo determinar con los equipos disponibles, debido a una resolución temporal insuficiente.

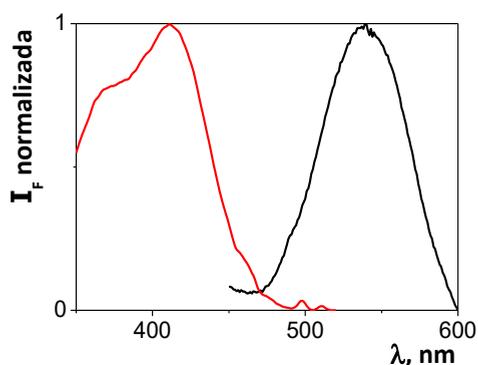


Figura 4.6.: Comparación de los espectros de excitación ($\lambda_{em}=540$ nm) (rojo) y de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex}=390$ nm) (negro) de NQNO, normalizados en sus máximos (MeCN/ N₂/ 298 K).

Espectroscopía de absorción transitoria en la escala de los femtosegundos (femto-FDL)

Usando la técnica de femto-FDL, se caracterizó el espectro de absorción transitoria en esta escala ultrarrápida. Las medidas se realizaron con una fuente de excitación de 400 nm y con dos tipos de cristales que generaban rangos de registro de longitudes de onda diferentes (cristal de zafiro y CaF₂).

Tras realizar las correcciones necesarias y aplicar ajustes matemáticos de análisis de componentes principales (ACP), se obtuvieron los mejores resultados para un total de tres componentes que fueron asignadas según su tiempo de vida y máximos de absorción como (**Tabla. 4.1.**): i) relajación vibracional (RV) producida por la solvatación del disolvente con un tiempo de vida aproximado de 2 ps; ii) absorción del estado excitado singlete (S₁-S_n) con un tiempo de vida aproximado de 10 ps; iii) absorción del estado excitado triplete (T₁-T_n) con un tiempo de vida muy largo que no se puede medir en esta escala temporal y coincide con el triplete asignado por FDL en la escala de los nanosegundos (ver **Capítulo 3 Apartado 3.3.2. y Capítulo 1. Introducción**).

Compuesto	Cristal	λ (nm)	τ (ps)	Asignación
NQNO/MeCN	CaF ₂	460 (+)	2	RV
		425 (+), 560(-)	12	S ₁ -S _n
		560 (+)	-	T ₁ -T _n
NQNO/MeCN	zafiro	460 (+)	1.6	RV
		425 (+), 560(-)	10	S ₁ -S _n
		560 (+)	-	T ₁ -T _n

Tabla. 4.1.: Valores obtenidos tras el análisis de componentes principales de los datos generados en femto-FDL para ambos cristales de NQNO (λ_{ex}=400 nm/ MeCN/ 298 K).

Al monitorizar los datos obtenidos en femto-FDL, se observa como la banda de absorción S₁-S_n, con un máximo a 420 nm, disminuye de forma simultánea al aumentar la banda de absorción T₁-T_n con máximo a 560 nm, apareciendo un punto isobéptico a 500 nm (**Figura 4.7.**). Esto demuestra la formación del triplete a partir del singlete y corrobora que la asignación de las especies transitorias es coherente.

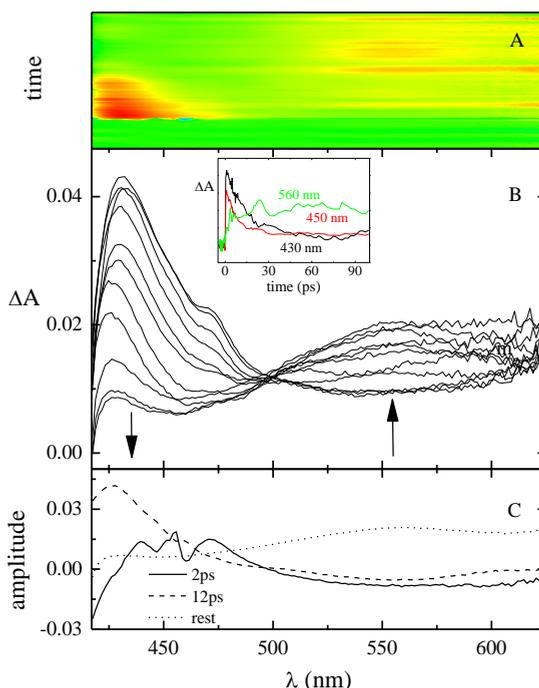
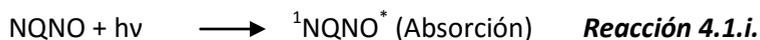


Figura 4.7.: Datos obtenidos por femto-FDL de NQNO en MeCN. **A:** Gráfico de contorno de los datos. **B:** Monitorización de los espectros de absorción transitoria a distintos tiempos (0,6/1/1,6/2,6/4,4/6/10/14/19/39 y 115 ps). **Inserción:** Desaparición y formación de señales a las longitudes de onda más representativas. **C:** Espectros de absorción transitoria de las componentes principales obtenidas por ACP y sus tiempos de vida ($\lambda_{\text{ex}}=400$ nm/ CaF₂/ MeCN/ 298 K).

Resumiendo lo anterior se puede decir que al excitar NQNO se forma el estado excitado singlete (**Reacción 4.1.i.**), que por un cruce intersistema da lugar al estado excitado triplete (**Reacción 4.1.ii.**). Mediante femto –FDL se puede observar claramente el isobéstico, que apoya experimentalmente la formación de una especie transitoria a partir de la otra.



Reacción 4.1.: Reacción de absorción de luz (*i*) y cruce intersistemas de los estados energéticos de NQNO (*ii*)

Observando el corto tiempo de vida de la banda de absorción S_1-S_n (~ 10 ps), se explica que el tiempo de vida de fluorescencia no se pudiese caracterizar con la instrumentación disponible.

4.3.2. Caracterización del estado excitado triplete de NQNO

Estudio de la fosforescencia

Como se puede observar en la **Figura 4.8.**, se caracterizó el espectro de emisión de fosforescencia (P) de NQNO desde el primer estado excitado triplete ($^3NQNO^*$) al estado fundamental, cuyas medidas se realizaron en estado estacionario y en matriz sólida a baja temperatura. De esta banda de emisión, se pudo calcular la energía del $^3NQNO^*$ con un valor obtenido de $E_T=655$ nm, equivalente a 183 kJ/mol. Al monitorizar la desaparición de la señal de fosforescencia en su máximo de emisión (**Figura 4.8. Inserción**) se obtuvo un ajuste del tiempo de vida de $\tau=3,0 \pm 0,5$ ms.

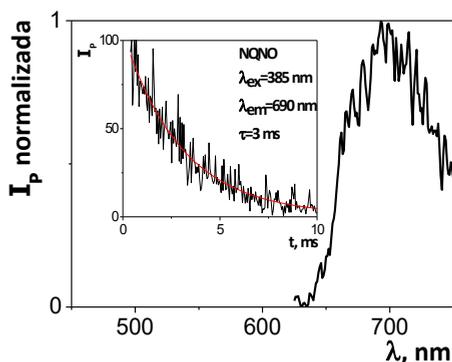


Figura 4.8.: Espectro de fosforescencia a baja temperatura de NQNO normalizado en el máximo. **Inserción:** Desaparición de la señal de fosforescencia (EtOH/ 77 K).

Espectroscopía de absorción transitoria en la escala de los nanosegundos

Con el objetivo de caracterizar el estado excitado triplete de NQNO se registró el espectro de especies transitorias de una disolución en acetonitrilo por fotólisis de destello láser (FDL) con resolución temporal en la escala de los nanosegundos. Como se observa en la **Figura 4.9.**, se obtuvo un espectro con un máximo de absorción a 560 nm, que se atribuye a la absorción triplete-triplete (T_1-T_n) de NQNO y coincide con lo publicado en bibliografía.

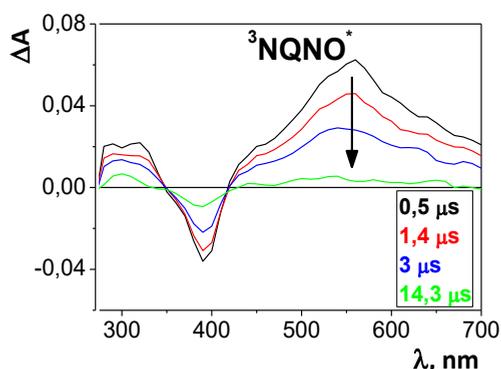


Figura 4.9.: Espectros de FDL de NQNO registrados a distintos tiempos después del pulso del láser (MeCN/ λ_{ex} =355 nm/ N_2).

Para confirmar la asignación y una vez conocida su energía ($E_T=183$ kJ/mol), se estudió su interacción con agentes desactivantes como el β -caroteno ($E_T=64$ kJ/mol) o el oxígeno molecular ($E_T=92$ kJ/mol). Para cada una de las interacciones se determinó una constante de velocidad de desactivación (k_d).

Transferencia de energía a β -caroteno

El β -caroteno (β CAR) tiene un rendimiento cuántico de cruce intersistemas prácticamente nulo. Pero son conocidos tanto su baja energía del estado excitado triplete (${}^3\beta\text{CAR}^* \sim 64$ kJ/mol) como la forma característica de su banda de absorción T_1-T_n (muy estrecha y con máximo a 510 nm). El espectro de absorción transitoria registrado por FDL (**Figura 4.10.A.**) de la mezcla en disolución de NQNO y β CAR en proporción 1:2, muestra los espectros de absorción T_1-T_n de ${}^3\text{NQNO}^*$ y ${}^3\beta\text{CAR}^*$

después del pulso del láser, lo cual estaría de acuerdo con una transferencia de energía ya que $E_T(\text{NQNO}) > E_T(\beta\text{CAR})$.

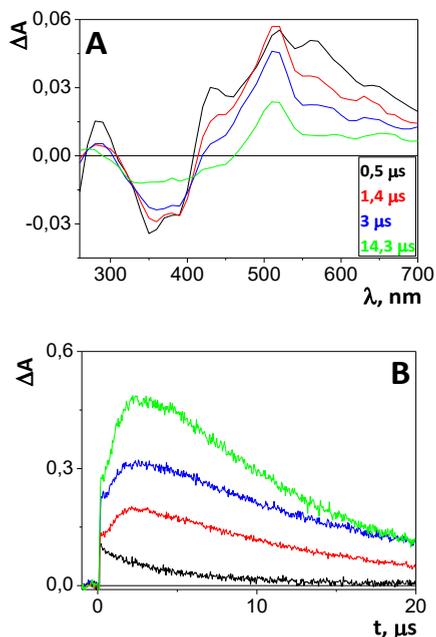


Figura 4.10. A: Espectro de absorción transitoria por FDL ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm) a distintos tiempos después del pulso del láser de la mezcla NQNO: β CAR/ 1:2. **B:** Monitorización de la desaparición de la señal de $^3\text{NQNO}^*$ y de la cinética de formación de $^3\beta\text{CAR}^*$ en el tiempo a distintas concentraciones de βCAR (NQNO - negro, y NQNO: β CAR en proporción 1:1- rojo, 1:2- azul, 1:3- verde, donde $[\text{NQNO}]=5,5 \cdot 10^{-5}$ M) ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ $\lambda_{\text{obs}}=510$ nm/ MeCN/ N_2).

Además como se puede observar en la **Figura 4.10.B.**, al comparar las cinéticas monitorizadas en el máximo del $^3\beta\text{CAR}^*$ de mezclas de NQNO y βCAR , manteniendo la concentración de NQNO constante, se observa como aumenta tanto la velocidad de formación de $^3\beta\text{CAR}^*$ como su concentración máxima. Se estudió el proceso de desactivación de $^3\text{NQNO}^*$ por βCAR mediante el cálculo de la constante (k_d) haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer (**Ecuación 4.1.**) donde se obtuvo un valor de $k_d=3,3 \pm 0,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Desactivación por oxígeno

Es conocido que el oxígeno molecular (O_2) es un buen desactivador de los estados excitados triplete ($E_T=92$ kJ/mol). Por ello se prepararon dos disoluciones de NQNO en MeCN, ambas con la misma absorción UV de 0,35 a la longitud de onda de excitación 355 nm ($[NQNO]=5,5 \cdot 10^{-5}$ M), con dos concentraciones diferentes de O_2 en cada disolución. Una de ellas estaba expuesta a aire a presión atmosférica ($[O_2]=1,9 \cdot 10^{-3}$ M, para el acetonitrilo) y la otra se purgó con nitrógeno ($[O_2]=0$ M).

Tras registrar por FDL ($\lambda_{ex}=355$ nm) la desaparición de la especie asignada como ${}^3NQNO^*$ en su máximo de absorción ($\lambda_{T1-Tn}=560$ nm) en ambas disoluciones, y siguiendo la **Ecuación 4.2.**, se calculó la constante de interacción intermolecular del proceso de desactivación, tomando como τ_0 el tiempo de vida de la especie excitada de NQNO en la disolución saturada de N_2 y τ el tiempo de vida para dicha especie excitada en la disolución con O_2 atmosférico. De esta forma se calculó la constante de desactivación intermolecular del ${}^3NQNO^*$ por O_2 , cuyo resultado fue de $k_d=1,4 \pm 0,1 \cdot 10^9$ M⁻¹s⁻¹. Se puede decir pues, que la especie excitada asignada como triplete de NQNO queda desactivada por la presencia de oxígeno en el medio.

4.3.3. Reactividad de los estados excitados de NQNO con dadores de electrones

Para el siguiente estudio de 4-nitroquinolina N-óxido (NQNO) se realizaron medidas de FDL paralelamente en dos disolventes distintos con una absorción de 0,35 a la longitud de onda de excitación 355 nm (**Figura 4.11.**).

- Acetonitrilo (MeCN) (aprótico)
- Acetonitrilo:Agua/4:1 (MeCN:H₂O) (prótico)

Se utilizaron concentraciones de NQNO distintas en ambos disolventes, $[NQNO]=5,5 \cdot 10^{-5}$ M y $4,0 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente.

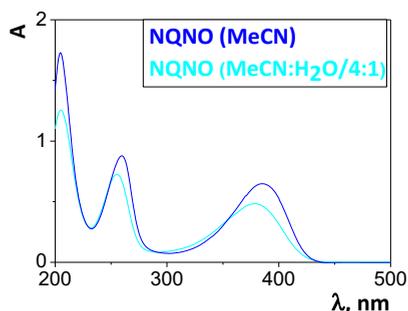


Figura 4.11.: Espectros de absorción de UV-vis de NQNO en dos disolventes (prótico y aprótico) a las concentraciones de trabajo.

Por otro lado, se realizaron medidas en FDL de NQNO en ambos disolventes y en presencia de proporciones crecientes de diazabicyclooctano (DABCO) como dador de electrones y trietilamina (Et_3N) como dador de electrones y protones.

En primer lugar se registraron los espectros de absorción transitoria de las especies excitadas formadas (**Figura 4.12.**) y sus cinéticas de desaparición en los máximos de absorción para NQNO. Como se ha comentado anteriormente, el espectro en disolvente aprótico (**Figura 4.12.A.**), muestra un máximo de absorción transitoria a 560 nm, asignado al triplete de la NQNO ($^3\text{NQNO}^*$), que desaparece con el tiempo de vida de 6 μs , sin dar lugar a ninguna otra especie.

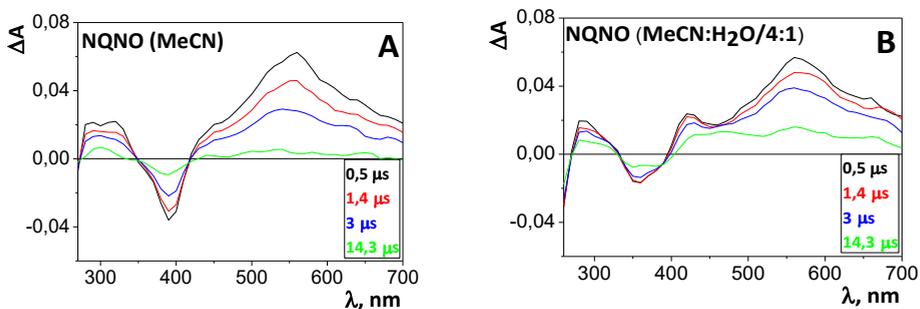


Figura 4.12.: Espectros de absorción transitoria registrados por FDL de NQNO en diferentes disolventes a distintos tiempos después del pulso del láser ($\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm}/\text{N}_2$). **A:** MeCN **B:** MeCN:H₂O/4:1.

Cuando se estudió el espectro en el disolvente prótico (**Figura 4.12.B.**), también se observó la desaparición de la señal asignada al $^3\text{NQNO}^*$ con máximo a 560 nm y

con un tiempo de vida aproximado de 8 μ s. Sin embargo, a tiempos más largos (línea verde-14,3 μ s) apareció una señal residual con máximo de absorción a 450 nm y un tiempo de vida diferente $\tau=25$ μ s. Esta observación se atribuye a la interacción entre el triplete y el disolvente prótico que reaccionarían para dar lugar a la formación del radical protonado ($^{\bullet}$ NQNOH).

La banda negativa en los espectros de FDL (360-390 nm) también disminuye con el tiempo. Esto es debido a la absorción UV-vis asociada al consumo reversible (**Figura 4.12.A.**) o parcialmente irreversible (**Figura 4.12.B.**) de NQNO en su estado fundamental.

Posteriormente, se analizaron y compararon los datos obtenidos para NQNO por FDL en presencia de DABCO y Et₃N, tanto en el disolvente aprótico como en el prótico. Se determinaron los máximos de absorción de las distintas especies transitorias formadas, así como sus tiempos de vida en las diversas condiciones.

Fotorreacción de NQNO con DABCO en MeCN

Analizando los datos de FDL para NQNO en presencia de un dador de electrones (DABCO) en disolvente aprótico, se observaron cambios con respecto al espectro del N-óxido solo, debidos a la formación de una nueva especie transitoria con máximo de absorción a 500 nm y con un $\tau=8$ μ s (**Reacción 4.2.**). Esta especie se asignó como radical anión de NQNO ($^{\bullet}$ NQNO).



Reacción 4.2.: Reacción de transferencia electrónica entre el triplete de NQNO y DABCO en estado fundamental.

Centrando la atención en las líneas roja y negra (0,5 μ s y 1,4 μ s después del pulso del láser, respectivamente) de la **Figura 4.13.A.** se observa un entrecruzamiento, lo que sugiere que la especie radicalaria se forma a partir de ${}^3\text{NQNO}^*$.

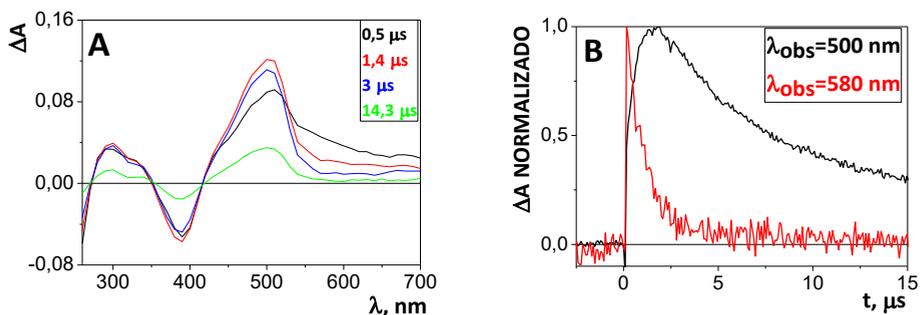


Figura 4.13.: FDL de NQNO en presencia de DABCO (proporción 1:2) ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ MeCN/ N_2). **A:** Espectro de absorción transitoria a distintos tiempos después del pulso del láser. **B:** Comparación de la desaparición de la señal del $^3\text{NQNO}^*$ y formación de radical anión de NQNO.

La desaparición de la señal del triplete de forma paralela a la formación del radical anión (**Figura 4.13.B.**) confirma la hipótesis. Usando mezclas de NQNO:DABCO en distintas proporciones, se observó el progresivo acortamiento del tiempo de vida del triplete del *N*-óxido (**Figura 4.14.**), lo que permitió calcular una constante de desactivación (**Ecuación 4.1.**) de $k_d=7,8 \pm 0,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

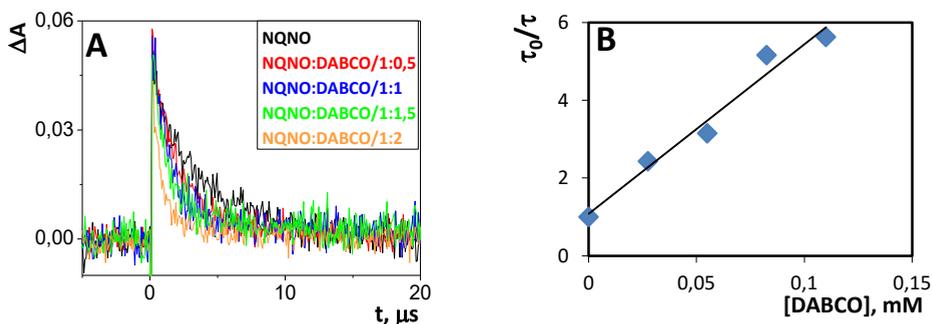


Figura 4.14.: FDL de NQNO en presencia de DABCO ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ MeCN/ N_2). **A:** Cinéticas de desaparición a distintas proporciones NQNO:DABCO ($\lambda_{\text{obs}}=600$ nm). **B:** Ajuste Stern-Volmer para calcular la constante de desactivación.

Fotorreacción de NQNO con Et_3N en MeCN

Por otro lado, al añadir trietilamina (Et_3N) a la disolución de NQNO en disolvente aprótico, se observó claramente la aparición de un punto isobéptico

en el espectro registrado (**Figura 4.15.A.**), que nos indica la formación de una nueva especie diferente del triplete observado (**Reacción 4.3.**), en ausencia de la amina. Además la similitud de los tiempos de desaparición del triplete ($\tau=1,7 \mu\text{s}$ a 560 nm) y de formación de la nueva especie ($\tau=1,4 \mu\text{s}$ a 450 nm) (**Figura 4.15.B.**), apoyan que la primera especie es precursora de la segunda.



Reacción 4.3.: Reacción de transferencia electrónica entre el triplete de NQNO y el estado fundamental de trietilamina.

La nueva especie con máximo de absorción a 450 nm y un tiempo de vida $\tau=25 \mu\text{s}$, se asigna como radical protonado (${}^*\text{NQNOH}$), resultante de la reacción de ${}^3\text{NQNO}^*$ con el dador de electrones y protones (Et_3N).

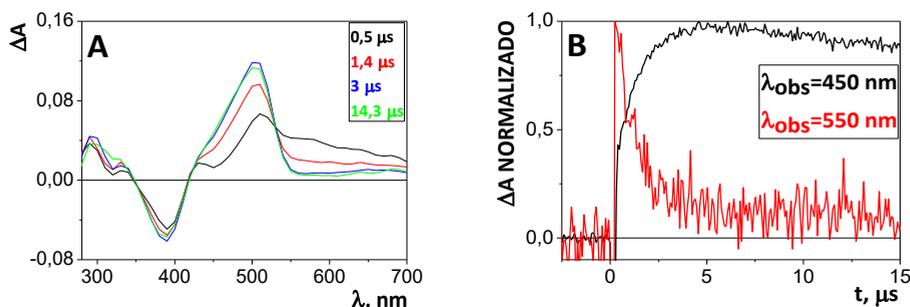


Figura 4.15.: Datos de FDL de NQNO en presencia de Et_3N (proporción 1:15) ($\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm/ MeCN/ N}_2$) **A:** Espectro de absorción transitoria a distintos tiempos después del pulso de láser. **B:** Comparación de la desaparición de la señal del ${}^3\text{NQNO}^*$ (rojo) y formación de radical protonado de NQNO (negro).

Se realizaron estas medidas de FDL para diferentes proporciones de NQNO: Et_3N (**Figura 4.16.A.**), de donde se calcularon los tiempos de vida de desactivación del triplete de NQNO, así como los tiempos de vida de formación del radical protonado. Observando el progresivo acortamiento (**Figura 4.16.B.**) se calculó una constante por el ajuste lineal Stern-Volmer (**Ecuación 4.1.**) con valor de $k_d = 8,8 \pm 0,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

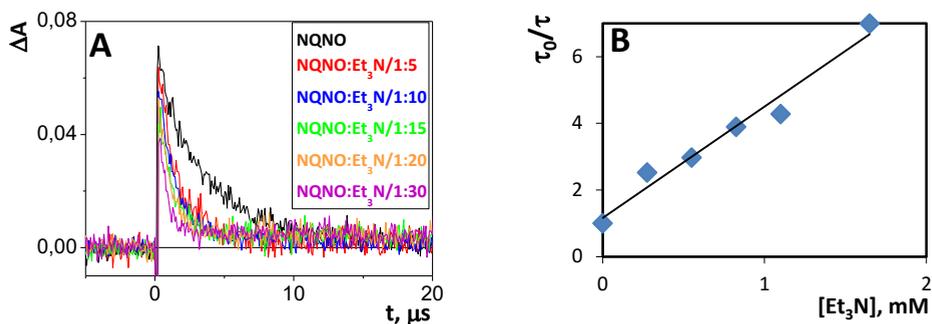


Figura 4.16: A: Comparación de las cinéticas de desaparición registradas por FDL, de NQNO en presencia de distintas concentraciones de Et_3N ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ $\lambda_{\text{obs}}=550$ nm/ MeCN/ N_2). B: Ajuste Stern-Volmer para cálculo de la constante de desactivación

Fotorreacción de NQNO con DABCO en MeCN:H₂O/4:1

Continuando con el estudio, se realizaron medidas de FDL de disoluciones de NQNO en presencia de diferentes concentraciones de DABCO, usando la mezcla de acetonitrilo y agua como disolvente. Como se observa en la **Figura 4.17**, se produjo nuevamente un isobéstico en el espectro registrado, lo que indica que a partir de la especie asignada como triplete, con máximo a 560 nm, se forma el radical protonado de NQNO, con máximo a 450 nm.

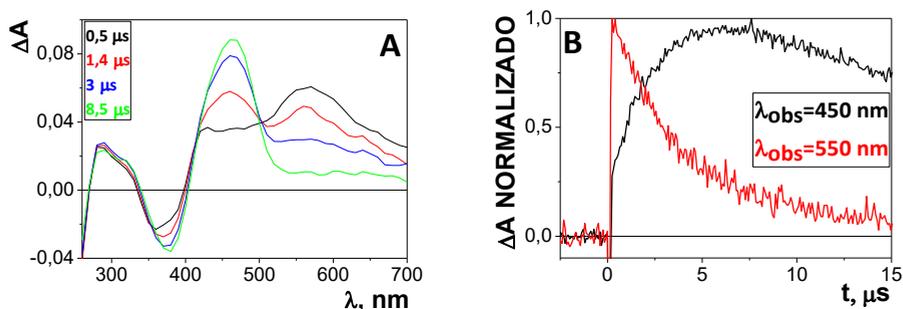


Figura 4.17: FDL de NQNO en presencia de DABCO (proporción 1:5) ($\lambda_{\text{ex}}=355$ nm/ MeCN:H₂O/4:1/ N_2) A: Espectro de absorción transitoria a distintos tiempos después del pulso del láser. B: Comparación de desaparición de la señal del $^3\text{NQNO}^*$ (rojo) y formación de radical protonado de NQNO (negro).

Se puede observar cómo al añadir concentraciones crecientes de DABCO, al monitorizar por FDL las cinéticas a los máximos de absorción del $^3\text{NQNO}^*$ y del $^1\text{NQNOH}$, se produce un acortamiento del tiempo de vida del triplete (**Figura 4.18.A.**) a la vez que aumenta la formación de radical protonado (**Figura 4.18.B.**).

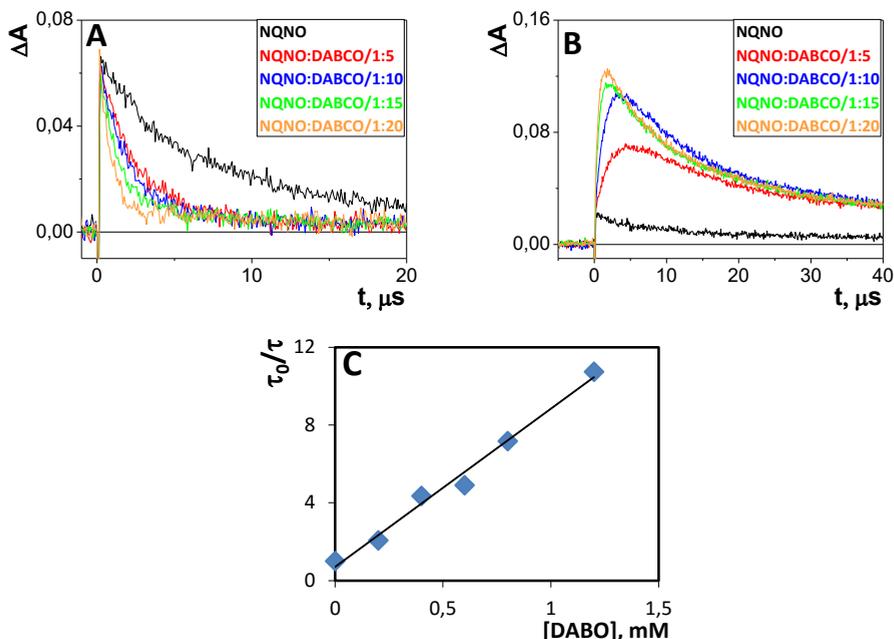


Figura 4.18.: Comparación de las cinéticas FDL de NQNO en presencia de DABCO en distintas proporciones ($\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm/ MeCN:H}_2\text{O}/4:1/ \text{N}_2$)
A: $\lambda_{\text{obs}}=560 \text{ nm}$. **B:** $\lambda_{\text{obs}}=450 \text{ nm}$. **C:** Ajuste Stern-Volmer para cálculo de la constante de desactivación.

Los reactivos en el medio están experimentando transferencia electrónica y de protón (**Reacción 4.4.**). Con los datos obtenidos, se calculó una constante por el ajuste lineal (**Figura 4.18.C.**) Stern-Volmer (**Ecuación 4.1.**) para el proceso, con valor de $k_d=1,02 \pm 0,06 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



Reacción 4.4.: Reacción de transferencia electrónica entre el triplete de NQNO y el estado fundamental de trietilamina, así como una transferencia de protón por el disolvente.

Fotorreacción de NQNO con Et₃N en MeCN:H₂O/4:1

Para finalizar se realizaron medidas de FDL de disoluciones de NQNO en presencia de diferentes concentraciones de Et₃N usando la mezcla de acetonitrilo y agua como disolvente. Como se observa en la **Figura 4.19.A.**, se produce asimismo un isobéstico, lo que indica que la especie asignada ³NQNO* se transforma en la especie asignada como *NQNOH (**Figura 4.19.B.**)

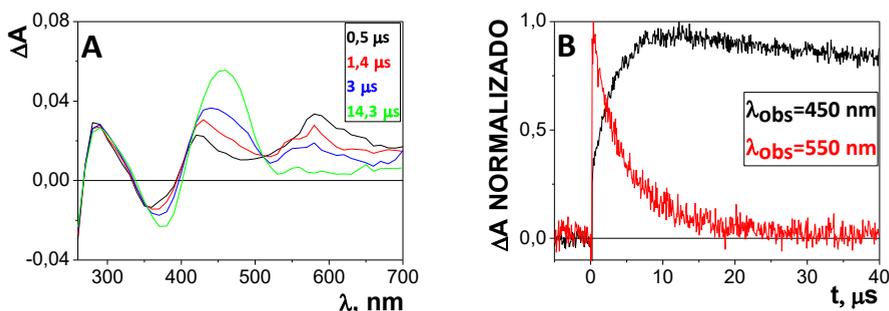
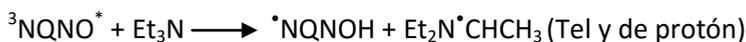


Fig. 4.19.: FDL de NQNO en presencia de Et₃N (proporción 1:15) (λ_{ex}=355 nm/ MeCN:H₂O/4:1/ N₂) **A:** Espectro de absorción transitoria a distintos tiempos después del pulso del láser. **B:** Comparación de decaimiento de la señal del ³NQNO* (rojo) y formación de *NQNOH (negro).

El radical recibe ahora tanto protones del disolvente como del dador, es por esto que su formación es mucho más rápida (**Reacción 4.5.**).



Reacción 4.5.: Reacción de transferencia electrónica entre el triplete de NQNO y el estado fundamental de trietilamina.

Del mismo modo que en los casos anteriores, tras realizar un ajuste lineal Stern-Volmer, siguiendo tanto la disminución del tiempo de vida del ³NQNO* como el aumento de formación de radical protonado (**Figura 4.20.**) se obtuvo como resultado una constante $k_d = 2,8 \pm 0,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

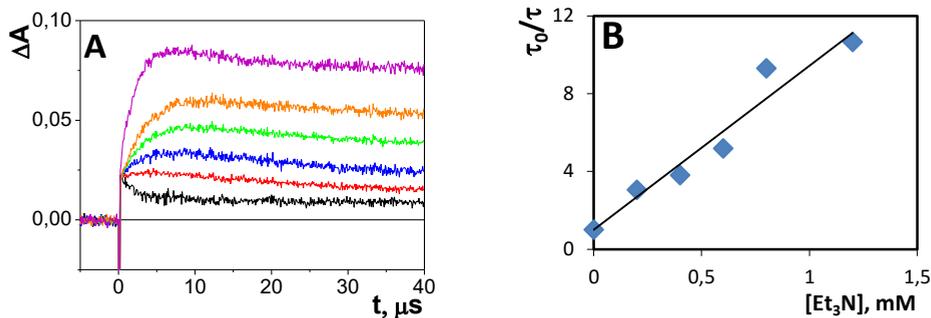


Figura 4.20. **A:** Cinéticas de formación de *NQNOH por FDL en presencia de Et_3N en distintas proporciones (NQNO sola-negro/ 1:5-rojo/ 1:10-azul/ 1:15-verde/ 1:20-naranja/ 1:30-violeta) ($\lambda_{ex}=355$ nm/ MeCN:H₂O/4:1/ N₂/ $\lambda_{obs}=450$ nm). **B:** Ajuste Stern-Volmer para cálculo de la constante de desactivación.

4.4. CONCLUSIONES

Conclusiones

En el capítulo, se ha caracterizado el estado excitado singlete del compuesto 4-nitroquinolina *N*-óxido ($^1\text{NQNO}^*$) por distintas técnicas. Se ha registrado su espectro de fluorescencia utilizando espectroscopia de emisión en estado estacionario, de donde se ha calculado su energía (255 kJ/mol). Además por FDL en la escala ultrarrápida se ha podido caracterizar el espectro de absorción S_1-S_n , (con máximo a 425 nm y un tiempo de vida de 10 ps).

MeCN	EMISIÓN			ABSORCIÓN	
	λ	Tiempo	E	λ_{max}	tiempo
SINGLETE	470 nm	-	255 kJ/mol	425 nm	10 ps
TRIPLETE	655 nm	3 ms	183 kJ/mol	560 nm	6 μs

De forma similar, se ha caracterizado el estado excitado triplete de 4-nitroquinolina *N*-óxido ($^3\text{NQNO}^*$), por espectroscopia de emisión primero en estado estacionario, de donde se ha obteniendo su espectro de fosforescencia y calculado su energía de $^3\text{NQNO}^*$ (183 kJ/mol). Y posteriormente utilizando espectroscopia de emisión con resolución temporal se ha calculando su tiempo de vida (3 ms). Se ha completado la caracterización de $^3\text{NQNO}^*$ utilizando como desactivadores oxígeno ($k_d = 1,4 \pm 0,1 * 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y β -caroteno ($k_d = 3,3 \pm 0,8 * 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Además, se ha identificado la reactividad del estado excitado triplete desde su formación (como se observa en el isosbético por femto-FDL, **Figura 4.7.**) a su desactivación (nano-FDL) desencadenando diversos comportamientos según las condiciones. Así se observa que el triplete en presencia de dadores de electrones (DABCO) en disolvente aprótico (MeCN) da lugar al radical anión ($^-\text{NQNO}$) tras una transferencia electrónica. Por el contrario, si existe en el medio un dador de protones, ya sea del reactivo (Et_3N) o del disolvente ($\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}/4:1$) se produce

una protonación del radical anión obteniendo el radical protonado de NQNO como resultante (\cdot NQNOH).

Cabe puntualizar, que tras el análisis de todos los experimentos se puede observar que como era de esperar, los procesos en disolvente prótico están ralentizados debidos a su esfera de solvatación. Además, debido a su menor potencial de oxidación, el valor de las constantes de desactivación muestra que el proceso de transferencia electrónica con Et₃N es más lento que con DABCO.

También se ha observado, que el radical protonado cuando se forma en presencia de DABCO vive menos. Asimismo, los tiempos de vida de las especies en disolvente prótico se alargan y también las constantes disminuyen.

	NQNO	+ DABCO	+ Et₃N
MeCN	3 NQNO* (560 nm y 6 μ s)	3 NQNO* \cdot NQNO (500 nm y 8 μ s) $k_d=7,8 \pm 0,8 * 10^9 M^{-1} s^{-1}$	3 NQNO* \cdot NQNOH (450 nm y 25 μ s) $k_d=8,8 \pm 0,8 * 10^8 M^{-1} s^{-1}$
MeCN:H₂O (4:1)	3 NQNO* (560 nm y 8 μ s) \cdot NQNOH (450 nm y 25 μ s)	3 NQNO* \cdot NQNOH (450 nm y 8 μ s) $k_d=1,02 \pm 0,06 * 10^9 M^{-1} s^{-1}$	3 NQNO* \cdot NQNOH (450 nm y 1 ms) $k_d=2,8 \pm 0,8 * 10^8 M^{-1} s^{-1}$

Conclusions

In this chapter, the singlet excited state of 4-nitroquinoline *N*-oxide ($^1\text{NQNO}^*$) has been characterized by different techniques. Thus, from the steady-state fluorescence spectrum, it has been possible to determine its energy (255 kJ/mol). In addition, femto-LPF has allowed us to register the S_1-S_n absorption spectrum (with maximum at 425 nm and live time of 10 ps).

MeCN	EMISSION			ABSORPTION	
	λ	Time	E	λ_{max}	time
SINGLET	470 nm	-	255 kJ/mol	425 nm	10 ps
TRIPLET	655 nm	3 ms	183 kJ/mol	560 nm	6 μs

Similarly, the triplet excited state of 4-nitroquinoline *N*-oxide ($^3\text{NQNO}^*$) has been characterized by emission spectroscopy in solid matrix, at low temperature; in this way, the triplet energy has been estimated as 183 kJ/mol from the phosphorescence spectrum, and the emission lifetime has been determined as 3 ms. Formation of $^3\text{NQNO}^*$ by intersystem crossing from its precursor $^1\text{NQNO}^*$ has been evidenced by femto-FDL (as shown by the isosbestic point in Figure 4.7).

Then, the reactivity of $^3\text{NQNO}^*$ under different conditions has been investigated by nano-FDL. As expected for a triplet excited state, it is quenched by oxygen ($k_d=1,4 \pm 0,1 *10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y β -carotene ($k_d=3,3 \pm 0,8 *10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). In the presence of electron donors (such as DABCO) in aprotic solvents (MeCN), electron transfer occurs to give the radical anion ($^-\text{NQNO}$). Conversely, if proton donors are present in the medium, arising either from a reagent (Et_3N) or from the solvent (MeCN:H₂O/4:1), the protonated radical of NQNO ($^-\text{NQNOH}$) is produced.

It is worth pointing out that in protic solvents all processes are retarded, probably because of the solvation sphere. Hence, all transient species generated in protic media have typically longer lifetimes and slower decays. Besides, the electron transfer rate constants are lower with Et_3N than with DABCO, which is attributed to the relative oxidation potentials; moreover, the protonated radical formed in

the presence of DABCO lives shorter than when the same species is produced in the presence of Et₃N.

	NQNO	+ DABCO	+ Et₃N
MeCN	³ NQNO* (560 nm and 6 μs)	³ NQNO* *NQNO (500 nm and 8 μs) $k_d=7,8 \pm 0,8 * 10^9 M^{-1} s^{-1}$	³ NQNO* *NQNOH (450 nm and 25 μs) $k_d=8,8 \pm 0,8 * 10^8 M^{-1} s^{-1}$
MeCN:H₂O (4:1)	³ NQNO* (560 nm and 8 μs) *NQNOH (450 nm and 25 μs)	³ NQNO* *NQNOH (450 nm and 8 μs) $k_d=1,02 \pm 0,06 * 10^9 M^{-1} s^{-1}$	³ NQNO* *NQNOH (450 nm and 1 ms) $k_d=2,8 \pm 0,8 * 10^8 M^{-1} s^{-1}$

4.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos y disolventes

Los reactivos (NQNO, β CAR, DABCO, Et_3N , naftaleno) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® y los disolventes de Merck®.

Medidas de absorción UV-vis

Los experimentos en el espectrofotómetro de absorción fueron tomados con una disolución de NQNO en acetonitrilo en celdas de cuarzo de dimensiones 10 mm x 10 mm con capacidad máxima de 4 ml, a 22 °C y atmósfera de nitrógeno, con una concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ M.

Medidas de fluorescencia

Los experimentos fueron registrados en disoluciones de NQNO en acetonitrilo a una concentración de $1 \cdot 10^{-5}$ M. El espectro de excitación se registró con una longitud de onda de emisión de 540 nm. Mientras que el espectro de emisión, fue registrado a su máximo de excitación, 390 nm.

Se empleó naftaleno (NAF) como patrón ($\phi_{\text{NAF}} = 0.1$ en MeCN/ N_2)¹³ para el cálculo de los rendimientos cuánticos de los distintos compuestos, utilizando la **Ecuación 4.2.**

$$\phi_{\text{NQNO}} = \phi_{\text{NAF}} \cdot A_{\text{NAF}}/A_i \cdot I_i/I_{\text{NAF}} \cdot n^2/n_{\text{NAF}}^2 \quad \text{Ecuación 4.2.}$$

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 “ NAF ” al patrón naftaleno. Las medidas de emisión se llevaron a cabo en el rango de 320-500 nm. No fue posible determinar el tiempos de vida de fluorescencia de modo preciso, ya que la cinéticas de desaparición fue muy similar a la de la lámpara de irradiación (~ 1 ns).

Medidas por fotólisis de destello láser en la escala de los femtosegundos

Los experimentos de femto-FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 400 nm, con una disolución $[NQNO]=2 \cdot 10^{-5}$ M en MeCN. Las medidas se tomaron en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 2 mm y a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,3 u.a. y se usó un volumen de 40 ml de disolución.

Medidas de fosforescencia

Los experimentos de emisión de fosforescencia se realizaron a baja temperatura (77 K) con una absorción de las muestras menor a 0.1 u.a., una concentración de $5 \cdot 10^{-5}$ M en disoluciones de etanol.

Medidas por fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos

Los experimentos de nano-FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 355 nm ($[NQNO]=3 \cdot 10^{-5}$ M), con una duración de pulso <10 ns y una potencia de 15mJ. Las medidas de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 10x10 mm y a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente) si no se especifica lo contrario, previa purga en atmósfera inerte (burbujeo de 20 minutos de N_2). La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,4 u.a. y una cantidad de 3 ml para cada disolución.

4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Nakahara, W.; Fukuoka, F.; Sugimura, T. *Gan.* **1957**, *48*, 129-137.
- 2- Winkle, S. A.; Tinoco, I., J. *Biochemistry* **1978**, *17*, 1352-1356.
- 3- Paul, J. S.; Montgomery, P. O. B., Jr; Louis, B., *Cancer Res.* **1971**, *31*, 413-419.
- 4- Nagao, M.; Sugimura, T., *Cancer Res.* **1972**, *32*, 2369-2375.
- 5- Sheng, Z.; Song, Q.; Gao, F.; Zhou, X.; Li, J.; Dai, J.; Sun, H.; Li, Q.; Yu, S.; Ma, X., *Res. Chem. Intermed.* **2000**, *26*, 715-725.
- 6- Yamakawa, M.; Kubota, T.; Ezumi, K.; Mizuno, Y., *Spectrochem. Acta Part A* **1974**, *30*, 2103-2119.
- 7- Kasama, K.; Takematsu, A.; Yamamoto, S.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4918-4921.
- 8- Choudhury, S. D.; Basu, S., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8850-8855.
- 9- Seki, H.; Takematsu, A.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 176-179.
- 10- Shi, X.; Platz, M. S., *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4385-4390.
- 11- Ezumi, K.; Kubota, T.; Miyazaki, H.; Yamakawa, M., *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 980-988.
- 12- Daniels, J. S.; Gates, K. S.; Tronche, C.; Greenberg, M. M., *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1254-1257.
- 13- Bosca, F.; Encinas, S.; Heelis, P. F.; Miranda, M. A., *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 820-827.

5

**Interacción de 4-Nitroquinolina
N-óxido con triptófano y
proteína transportadora humana**

5.1. INTRODUCCIÓN

Después de ser estudiados en el capítulo 4 los estados excitados de 4-nitroquinolina N-óxido (NQNO) y su reactividad con dadores de electrones, se procedió a un estudio paralelo incluyendo como dadores estructuras biológicas (B) que pudieran reaccionar con NQNO por mecanismos similares (**Figura 5.1.**).

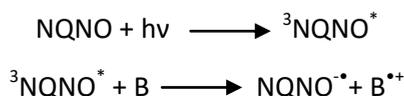


Figura 5.1.: Reactividad del estado excitado triplete de NQNO en presencia de biomoléculas dadoras de electrones.

Trabajos previos con biomoléculas han mostrado la capacidad que tiene NQNO para formar complejos de transferencia de carga con ADN, potencialmente causantes de lesiones mutagénicas y carcinogénicas.¹⁻⁴ Sin embargo los estudios con proteínas, más directamente relacionados con la presente tesis, son escasos e incompletos.

Las publicaciones que abordan la interacción de NQNO con aminoácidos (a.a.) aromáticos y proteínas se remontan hasta 1968 cuando el grupo de Y. Sato analizó los espectros de absorción de las mezclas de NQNO con triptófano (Trp), histidina (His), fenilalanina (Phe) o albúmina sérica bovina (ASB), observando complejos de estequiometría 1:1 y bajas constantes de formación (< 10).⁵

Posteriormente, O. Yamamoto aplicando técnicas computacionales combinadas con análisis de los espectros de emisión, examinó la unión no covalente de NQNO a proteínas, sugiriendo una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el enlace N-O de NQNO y sustituyentes de tipo XH presentes en diferentes residuos de aminoácidos de la proteína.⁶⁻⁷

Más recientemente se ha analizado por fotólisis de destello láser (FDL) la interacción de NQNO con aminoácidos y proteínas.⁸ Así cuando se añade a la

disolución de NQNO cantidades crecientes de triptófano (Trp) o tirosina (Tyr), se observa una disminución progresiva del tiempo de vida de la especie asignada como triplete de NQNO, de donde se calcula una constante de desactivación del orden de la difusión ($4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Simultáneamente a la desaparición del triplete de NQNO se observa la formación de otra especie con máximo a 450 nm y conocida como el radical protonado de NQNO (NQNOH^*). Radiolisis pulsada de NQNO en disolución acuosa conduce a la obtención de los mismos intermedios. Además, también se detectan los radicales neutros de Trp y Tyr, indicando una transferencia de carga acoplada con una transferencia de protón entre el *N*-óxido y el a.a..

Teniendo en cuenta las posibles vías de desactivación del triplete de NQNO, la más favorable en presencia de Trp y Tyr (>90%) es la transferencia electrónica intermolecular.⁹ Por otra parte, S. Yu *et al.* observan al disminuir el pH una reducción en los valores de las constantes de las reacciones fotoquímicas entre NQNO y aminoácidos, atribuido al aumento del potencial de oxidación de los dadores.¹⁰ Estos datos están de acuerdo con los estudios teóricos realizados por Q. Zhu *et al.*¹¹ Proteínas como lisozimas, ribonucleasas e histonas, que contienen Trp y Tyr, dan unas interacciones del mismo tipo que las observadas para los aminoácidos.⁵

Un trabajo más reciente de S. Basu *et al.* (2006) usando FDL se centra en las interacciones entre NQNO y albúmina sérica bovina (ASB). Los espectros de absorción transitoria de disoluciones de NQNO conteniendo ASB en proporción 1:5, tienen una gran similitud con los obtenidos para las mezclas de NQNO y Tyr en proporción 1:30, lo cual indica nuevamente transferencia electrónica y sugiere por consiguiente una proximidad espacial entre NQNO, Trp y Tyr dentro de la proteína (**Figura 5.2.**).¹²

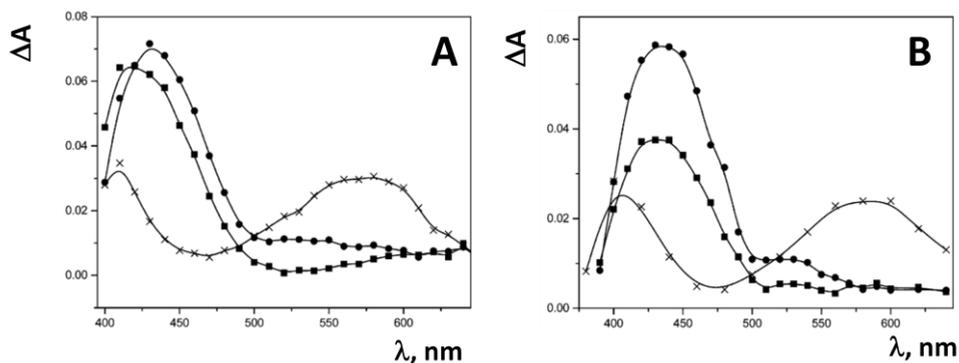


Figura 5.2.: Espectros de absorción transitoria publicados por Basu en la referencia 8. **A:** NQNO sola (cruces); NQNO:Tyr/1:30 (cuadrados) y NQNO:Tyr/1:30 con un 10 % de SDS (puntos) ($[NQNO]=1 \cdot 10^{-4}$ M; $\lambda_{ex}=355$ nm; $\tau=2$ μ s). **B:** NQNO sola (cruces); NQNO:liscimas/1:5 (puntos) y NQNO:ASB/1:5 (cuadrados) ($[NQNO]=1 \cdot 10^{-4}$ M; $\lambda_{ex}=355$ nm; $\tau=0,8$ μ s).

La albúmina sérica humana (ASH) es una proteína transportadora que forma parte del grupo de proteínas llamadas dianas farmacológicas ya que puede interactuar (por lo general por fuerzas iónicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van de Waals) con sustratos de diferente naturaleza para su distribución plasmática. Es una proteína presente en diferentes tejidos, pero su mayor proporción se encuentra en la sangre donde su concentración normal oscila entre 3,5 y 5,0 g/dl, lo que significa más de la mitad del contenido del plasma sanguíneo.

Esta proteína presenta muchos sitios de unión potencialmente accesibles, pero en su estructura terciaria se establecen dos sitios preferentes de unión diferenciados entre sí (**Figura 5.3.**), a través de los cuales puede interactuar tanto con agentes endógenos (biomoléculas) como exógenos (fármacos). Estas cavidades pueden alterar la solubilidad de los sustratos con los que interactúa siendo la mayoría de las interacciones que se producen reversibles. La principal diferencia entre ambos sitios de unión es que el llamado **Sitio I** presenta un carácter hidrofóbico con un residuo de triptófano (Trp) próximo, mientras que el **Sitio II** es una cavidad menor y contiene un residuo de tirosina (Tyr).

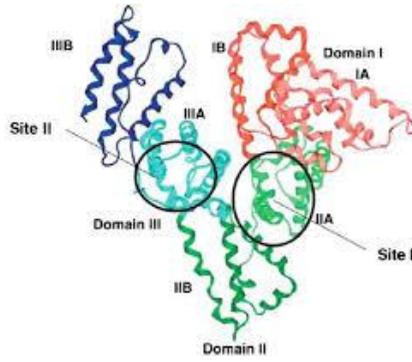


Figura 5.3.: Estructura terciaria de la proteína ASH.

5.2. OBJETIVOS

El objetivo específico del presente capítulo es establecer las interacciones existentes entre los estados excitados de NQNO y el aminoácido triptófano tanto en su estructura monomérica, como formando parte de una macroestructura como es la proteína transportadora albúmina sérica humana (ASH). Para ello se hará uso de técnicas como FDL y espectroscopía de emisión, siguiendo dos aproximaciones:

1. Excitación selectiva de NQNO a 355 nm para observar la desactivación de su estado excitado triplete en presencia de Trp y ASH.
2. Excitación a 295 nm, para estudiar los cambios de los espectros de emisión de Trp (el único residuo emisor de la ASH) en presencia de NQNO como desactivador.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Desactivación del estado excitado triplete de NQNO por triptófano

En el capítulo 4 de la presente tesis se han caracterizado las especies transitorias de 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) por diferentes técnicas espectroscópicas. En él se ha descrito la formación del estado excitado triplete de NQNO ($^3\text{NQNO}^*$) con máximos de absorción a 560 nm y 410 nm (**Figura 5.4.**). También se ha mostrado como esta especie evoluciona si en el medio existe un dador de electrones que propicie la formación del radical anión ($^{\bullet}\text{NQNO}$). En presencia de dadores de protón, $^{\bullet}\text{NQNO}$ puede reaccionar dando lugar al radical protonado ($^{\bullet}\text{NQNOH}$), con máximo de absorción a 450 nm y tiempo de vida más largo que el del resto de especies transitorias.

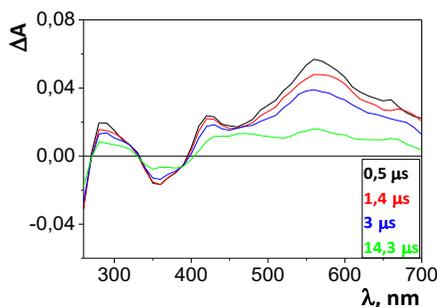


Figura 5.4. Espectros de absorción transitoria registrados por FDL de NQNO en la mezcla MeCN:H₂O/4:1 como disolvente a distintos tiempos después del disparo láser ($[\text{NQNO}] = 3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M} / \lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm} / \text{N}_2$).

Siguiendo con esta metodología, se realizaron experimentos utilizando distintas técnicas en disoluciones conteniendo NQNO y *L*-triptófano (Trp). Así, al comparar los espectros registrados por FDL de NQNO en disolvente prótico en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Trp, se observó la aparición y crecimiento de la especie asignada y caracterizada en el *Capítulo 4* como $^{\bullet}\text{NQNOH}$ (**Figura 5.5.A.**). Ello indica que existe una transferencia electrónica entre Trp y $^3\text{NQNO}^*$, dando lugar al radical catión del Trp ($^{+\bullet}\text{Trp}$) y $^{\bullet}\text{NQNO}$. Este proceso está

seguido de una protonación que da lugar al ${}^3\text{NQNO}^*$. Como se observa en la **Figura 5.5.B.** al aumentar la concentración de Trp en disolución, también lo hace la formación de ${}^3\text{NQNO}^*$, poniendo de manifiesto la interacción existente entre ambos.

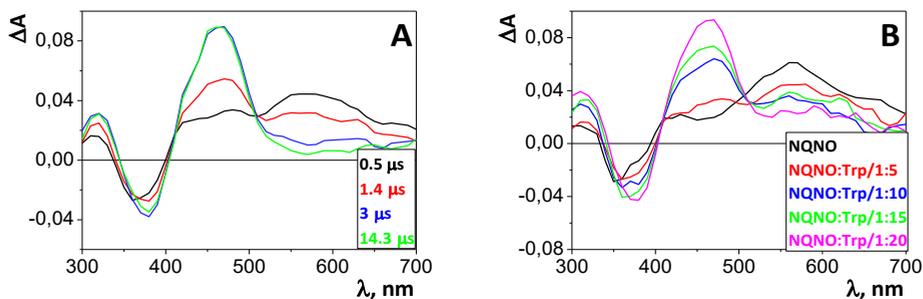


Figura 5.5.: Espectros de absorción transitoria registrados por FDL **A:** Disolución NQNO:Trp/1:5 a distintos tiempos después del pulso del láser. **B:** Comparación de los espectros transitorios a $t=0,5\mu\text{s}$ en mezclas de NQNO con diferentes concentraciones de Trp. ($[\text{NQNO}]=3,5*10^{-5}\text{M}$ / $\lambda_{\text{ex}}=355\text{nm}$ / MeCN:H₂O/4:1/ N₂).

Además, al monitorizar las cinéticas de desaparición de ${}^3\text{NQNO}^*$ a 560 nm (**Figura 5.6.A.**) se observa como su tiempo de vida se acorta al aumentar la concentración de Trp. Y a su vez, se aprecia como la velocidad de formación de ${}^3\text{NQNO}^*$ (con máximo de absorción a 450 nm) es más rápida al aumentar la concentración del aminoácido en disolución (**Figura 5.6.B.**).

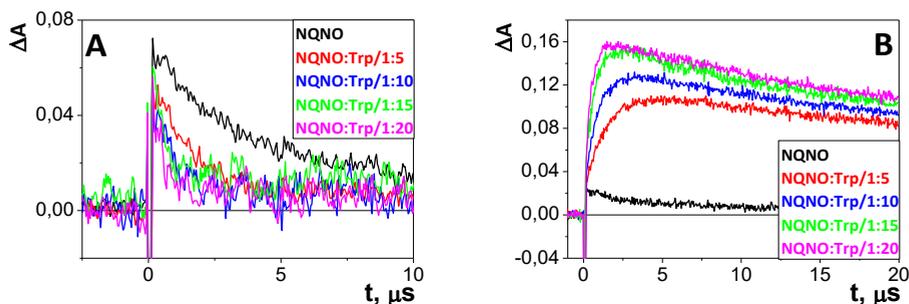


Figura 5.6.: Comparación de las cinéticas de NQNO obtenidas por FDL en presencia de Trp en distintas proporciones ($\lambda_{\text{ex}}=355 \text{ nm}$ / MeCN:H₂O/4:1/ N₂) **A:** Desactivación de ${}^3\text{NQNO}^*$ registrada a $\lambda_{\text{absT-T}}=560 \text{ nm}$. **B:** Formación y desactivación de ${}^3\text{NQNO}^*$ registrado a $\lambda_{\text{absT-T}}=450 \text{ nm}$.

Ambos cambios corresponden a procesos relacionados y de ellos se calcula una constante de desactivación de ${}^3\text{NQNO}^*$ por Trp a través de un ajuste lineal utilizando la ecuación de Stern-Volmer (**Figura 5.7.**) con un valor de $k_d=3,0\pm 0,7*10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

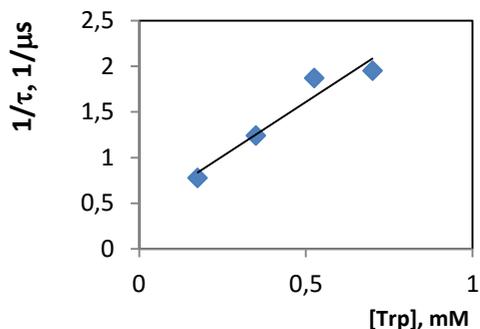


Figura 5.7.: Ajuste Stern-Volmer para calcular la constante de desactivación del triplete de NQNO en presencia de Trp, representando la inversa del tiempo de vida de formación del radical protonado de NQNO frente a la concentración del a.a..

5.3.2. Desactivación del estado excitado triplete de NQNO por albúmina

Analizando los resultados obtenidos, se estudió la posible interacción del ${}^3\text{NQNO}^*$ con albúmina sérica humana (ASH). Para ello se realizaron espectros de absorción transitoria mediante FDL, usando una disolución tamponada de PBS a pH=7 para no desnaturalizar la proteína.

En primer lugar se puede observar en la **Figura 5.8.A.** el espectro de absorción transitoria del ${}^3\text{NQNO}^*$ con máximos de a 420 y 580 nm, que tras protonación da lugar al ${}^1\text{NQNOH}$ con máximo de absorción transitoria 450 nm, tiempo de formación detectable y tiempo de vida muy largo (línea verde que corresponde al espectro registrado a los 11,2 μs después del pulso del láser). Así pues, al comparar los espectros registrados por FDL de NQNO en presencia de concentraciones crecientes de ASH, se observa que la formación de la especie asignada como ${}^1\text{NQNOH}$ aumenta de forma proporcional (**Figura 5.8.B.**).

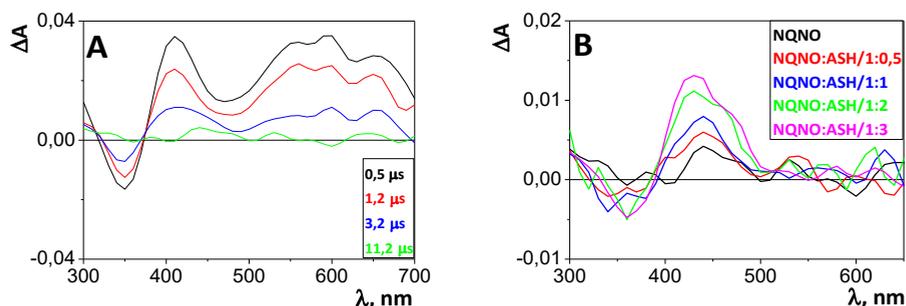


Figura 5.8.: Espectros de absorción transitoria registrados por FDL: **A.:** Disolución de NQNO en PBS registrada a distintos tiempos después del pulso láser. **B.:** Comparación de los espectros transitorios registrados a $t=11,2\mu$ s después del pulso del láser en mezclas de NQNO con diferentes concentraciones de ASH ($[NQNO]=3,5 \cdot 10^{-5} M / \lambda_{ex}=355 nm / PBS / N_2$).

Además, al analizar las cinéticas de desactivación de ${}^3NQNO^*$ en presencia de concentraciones crecientes de ASH, se observa como el tiempo de vida y la cantidad de triplete de NQNO formado disminuyen para el caso de los primeros μ s de la cinética. Por el contrario, si nos fijamos a tiempos más largos (10 μ s por ejemplo), se observa como la formación de 1NQNOH aumenta de forma proporcional a la presencia de la proteína (**Figura 5.9.**).

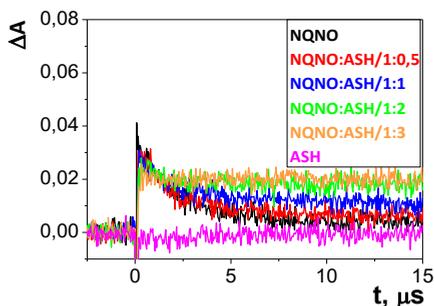


Figura 5.9.: Comparación de las cinéticas obtenidas por FDL de NQNO en presencia de ASH en distintas proporciones ($[NQNO]=3,5 \cdot 10^{-5} M / \lambda_{ex}=355 nm / \lambda_{em}=440 nm / MeCN:H_2O/4:1 / N_2$).

5.3.3. Desactivación de la fluorescencia del Trp por NQNO

Es conocida la fluorescencia del aminoácido triptófano (Trp) con máximo de emisión a 330 nm (dependiendo del disolvente). Al añadir concentraciones

crecientes de NQNO a una disolución de Trp, se observan espectros con una progresiva disminución en la intensidad de emisión (330 nm) (**Figura 5.10.A.**). Al mismo tiempo, se observa la aparición de un máximo relativo de fluorescencia a longitudes de onda mayores (420 nm). Al realizar los espectros de excitación en ambos máximos de emisión, se obtienen resultados similares (**Figura 5.10.C.**), lo que es consistente con la formación de un exciplexo entre el Trp en estado excitado y el NQNO en su estado fundamental (Trp^{*}-NQNO), que es el responsable de la nueva emisión a mayor longitud de onda (420 nm). Tanto la eficiencia de desactivación como la posición de los máximos de absorción y emisión dependen de la naturaleza del disolvente, de acuerdo con lo que cabría esperar para este tipo de procesos (**Figura 5.10.B. y D.**)

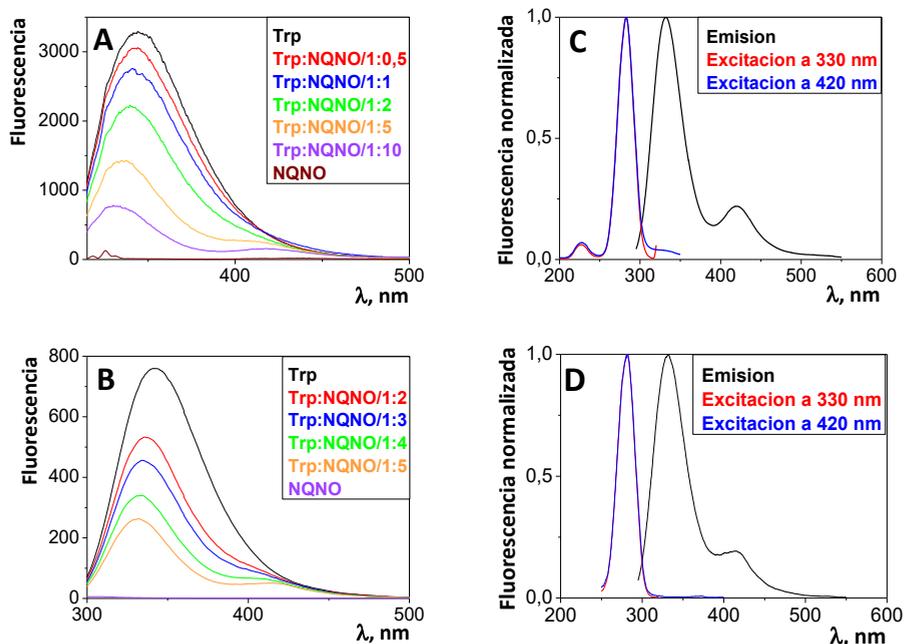


Figura 5.10.: Espectros de emisión de fluorescencia de Trp en presencia de concentraciones crecientes de NQNO, excitando a distintas λ_{ex} y en diferentes disolventes: **A:** Disoluciones acuosas a pH=7 y λ_{ex} =295 nm. **B:** Disoluciones con MeOH y λ_{ex} =280 nm. Comparación de los espectros normalizados en los máximos de emisión y excitación de fluorescencia: **C:** Disolución acuosa a pH=7 de la mezcla Trp:NQNO/1:10 (λ_{ex} =295 nm). **D:** Disolución en MeOH de la mezcla Trp:NQNO/1:5 (λ_{ex} =280 nm). ([Trp]= $2 \cdot 10^{-5}$ M/ N₂).

5.3.4. Desactivación de la fluorescencia de ASH por NQNO

Al registrar la fluorescencia de ASH, se observa la emisión del residuo de Trp que posee en su cadena. Al añadir concentraciones crecientes de NQNO en una disolución de proteína transportadora (ASH) la fluorescencia del residuo de Trp disminuye. Esto es atribuido a la interacción entre el Trp de la proteína y el N-óxido. Además, el máximo de la banda de emisión del Trp se desplaza progresivamente y aparece una nueva banda a longitud de onda mayor de 400 nm (como pasa con el Trp en disolución), confirmando la formación de un excíplejo (Trp^{*}-NQNO) (**Figura 5.11.A.**). Así, al normalizar los espectros de emisión de la proteína en ausencia y en presencia de NQNO (**Figura 5.11.B.**), se observa que el máximo se ha desplazado ligeramente de 332 nm a 330 nm y aparece una nueva banda a 420 nm.

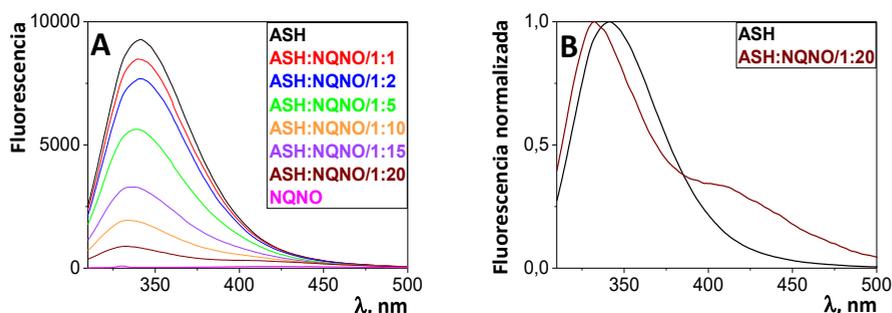


Figura 5.11.: **A:** Espectros de emisión de fluorescencia de ASH con concentraciones crecientes de NQNO. **B:** Espectros normalizados de fluorescencia. ($[ASH]=5 \cdot 10^{-5}$ M/PBS/ $\lambda_{ex}=295\text{nm}/N_2$).

Además se produce un acortamiento en el tiempo de vida de fluorescencia al añadir NQNO en la disolución de ASH (**Figura 5.12.**). Esto es nuevamente debido a que se produce una interacción entre el estado excitado singlete del Trp y NQNO, lo que corrobora su proximidad espacial.

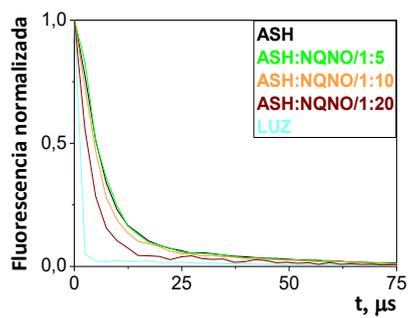


Figura 5.12.: Desaparición de la señal de emisión de fluorescencia de Trp con el tiempo, de disoluciones de ASH en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de NQNO (PBS/ $\lambda_{\text{ex}}=295\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}}> 340\text{nm}/\text{N}_2$).

5.4. CONCLUSIONES

Conclusiones

En los resultados mostrados, se ha estudiado la interacción entre los estados excitados de NQNO y el aminoácido triptófano (Trp), tanto en forma aislada como formando parte de la albúmina sérica humana (ASH). Específicamente, cómo el estado excitado triplete de NQNO se desactiva por Trp, con una constante $k_d=3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mediante un mecanismo de transferencia electrónica, dando lugar al radical protonado de NQNO ($^*\text{NQNOH}$), observándose en la proteína ASH un proceso similar.

Por lo que respecta al estado excitado singlete del Trp, se ha detectado en los estudios presentados previamente que se desactiva con la presencia de NQNO, produciéndose una interacción que conduce a la formación de un excíplejo ($\text{Trp}^* - \text{NQNO}$) que emite a longitudes de onda mayores que la de emisión del singlete del triptófano. Dicho proceso también ocurre en la proteína ASH, lo que nos indica una proximidad entre Trp y NQNO. Además, desvela que la molécula de NQNO se sitúa dentro de la estructura terciaria de la proteína en una cavidad próxima a la ubicación del aminoácido Trp.

Conclusions

In this chapter, the studies have been focused on the interactions between the NQNO excited states and tryptophan (Trp), not only as the isolated amino acid but also inserted in the human serum albumin protein (ASH). Specifically, the NQNO triplet excited state is quenched by Trp via electron transfer, with a rate constant of $k_d=3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, giving rise to the NQNO protonated radical ($\cdot\text{NQNOH}$). A similar process is observed in the protein.

The Trp singlet excited state is also quenched in the presence of NQNO, but in this case an exciplex is formed, which emits at longer wavelength. This process is also observed in the whole protein, pointing to the neighborhood between Trp and NQNO within the albumin. Thus, the obtained results indicate that NQNO is located inside the protein binding site containing the only available Trp residue.

5.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos y disolventes

Los productos NQNO, Trp y ASH fueron adquiridos comercialmente. Los disolventes fueron suministrados por Merk®. Las disoluciones de PBS (0.01 M, pH=7.4) fueron preparadas disolviendo las pastillas comerciales en la cantidad apropiada de agua desionizada.

Medidas de absorción transitoria por fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos

Los experimentos de nano-FDL se realizaron a una longitud de onda de 355 nm ($[NQNO]=3 \cdot 10^{-5}$ M), con una duración de pulso <10 ns y una potencia de 15 mJ. Las medidas de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo con una distancia de paso óptico de 10x10 mm y a temperatura de 20 °C (ambiente), en atmósfera inerte (burbujeo de 20 minutos con N₂). La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,4 u.a. y se empleó una cantidad de 3 ml para cada disolución.

Medidas de emisión de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal

Los experimentos de emisión de fluorescencia se realizaron con una absorción de las muestras menor de 0.1 u.a. y con unas condiciones de temperatura ambiente y atmósfera de N₂. Para la medidas de $[Trp]=2 \cdot 10^{-5}$ M (solo o con concentraciones crecientes de NQNO en disolución) se midieron con una longitud de onda de excitación de 295 nm en disoluciones acuosas a pH=7 y a 280 nm para las de metanol, mientras que para las de $[ASH]=5 \cdot 10^{-5}$ M (sola o con concentraciones crecientes de NQNO en disolución) se midieron con una longitud de onda de excitación de 295 nm.

5.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Winkle, S. A.; Tinoco, I. J., *Biochemistry* **1978**, *17*, 1352-1356
- 2- Paul, J. S.; Montgomery, P. O. B., Jr; Louis, B., *Cancer Res.* **1971**, *31*, 413-419
- 3- Nagao, M.; Sugimura, T., *Cancer Res.* **1972**, *32*, 2369-2375
- 4- Nakahara, W.; Fukuoka, F., Sugimura, T., *Gan.* **1957**, *48*, 129-137
- 5- Okano, T.; Takenaka, S.; Sato, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 556-558.
- 6- Yamamoto, O., *Ionizing radiation-induced DNA-protein crosslinking*. Plenum Press: New York, 1976; p 165-192
- 7- Yamamoto, O., *J. Radiat. Res.* **1979**, *20*, 276-283.
- 8- Kasama, K.; Takematsu, A.; Yamamoto, S.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4918-4921.
- 9- Seki, H.; Takematsu, A.; Arai, S., *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 176-179.
- 10- Sheng, Z.; Song, Q.; Gao, F.; Zhou, X.; Li, J.; Dai, J.; Sun, H.; Li, Q.; Yu, S.; Ma, X., *Res. Chem. Intermed.* **2000**, *26*, 715-725.
- 11- Liu, J.-F.; Li, X.-Y.; Zhu, Q., *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *98*, 33-43.
- 12- Choudhury, S. D.; Basu, S., *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8850-8855.

6

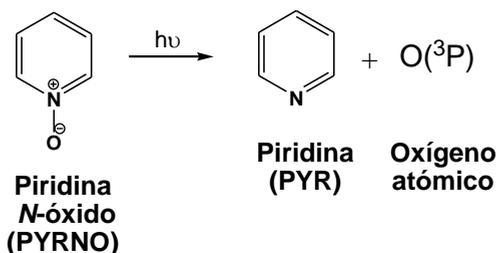
**Filtros solares con capacidad
para captar oxígeno atómico**

6.1. INTRODUCCIÓN

El oxígeno atómico [$O(^3P)$] en su estado fundamental, con dos electrones desapareados, tiene configuración electrónica triplete y está considerado como una especie reactiva de oxígeno (ERO) ya que puede provocar daño oxidativo a biomoléculas.¹ Sin embargo, la información disponible sobre este tema es muy limitada.

Existen diversos estudios sobre el comportamiento del oxígeno atómico en fase gas, pero son pocos los trabajos realizados en disolución.² Esto se debe en gran medida a la dificultad que implica generar de forma controlada $O(^3P)$.

Uno de los métodos usados para obtener $O(^3P)$ en disolución es la fotólisis de *N*-óxidos heterocíclicos. Estas moléculas al ser excitadas fotoquímicamente, pueden sufrir una ruptura homolítica del enlace dativo entre el átomo de nitrógeno y el de oxígeno (N-O), produciendo así oxígeno atómico (ver **Capítulo 1. Introducción**). Aunque el rendimiento cuántico de desoxigenación depende de la estructura del *N*-óxido, es conocido que ésta no es la ruta fotoquímica predominante (rendimientos < 5%). No obstante, es uno de los procesos que ocurre de forma general y se postula que se produce a través del estado excitado triplete (reacción 6.1.).³⁻⁴



Reacción 6.1.: Desoxigenación fotoquímica de PYRNO y formación de oxígeno atómico.

Para detectar el $O(^3P)$ formado, se adaptó el método de J. C. Scaiano descrito en la literatura, en el cual la formación de oxígeno atómico se consigue a partir de una

disolución de piridina *N*-óxido (PYRNO) en acetonitrilo (MeCN) por la técnica de Fotólisis de Destello Láser (FDL). Al ser irradiada PYRNO (**Reacción 6.1.**) se produce la escisión del enlace N-O generando oxígeno atómico. Éste reacciona con MeCN (**Reacción 6.2.**), dando lugar a óxido de acetonitrilo (MeCNO), que se detecta por FDL como una especie transitoria con máximo de absorción a 325 nm y un tiempo de vida de 500 ns.⁵



Reacción 6.2.: Oxidación de acetonitrilo por oxígeno atómico.

Tomando como base dicho método de obtención de $\text{O}(^3\text{P})$, se extrapoló para el análisis de la fotorreactividad de otros *N*-óxidos. Tras estudiar la desoxigenación en diversos análogos heterocíclicos, fueron seleccionados para el presente capítulo los *N*-óxidos de 4-nitroquinolina (NQNO) y piridacina (PDZNO) (**Figura 6.1.**), ya que tienen una eficiencia de fotodesoxigenación relativamente alta, lo cual permite disponer de una fuente de $\text{O}(^3\text{P})$ conveniente para el estudio.

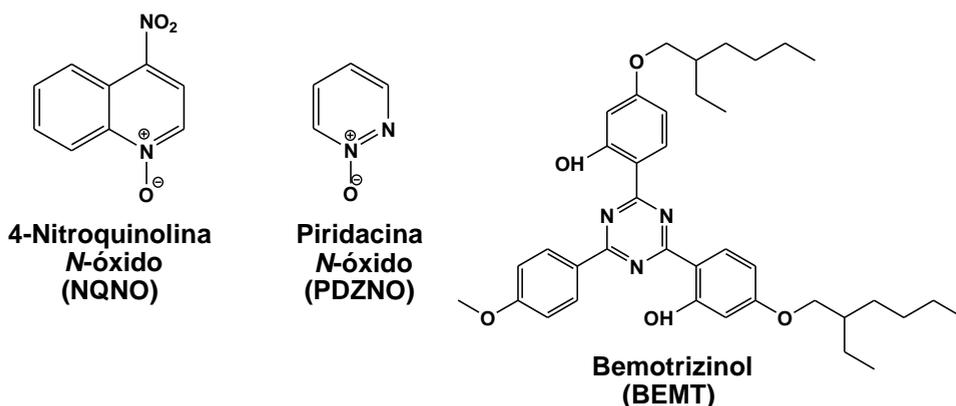


Figura 6.1.: Estructuras moleculares de los *N*-óxidos NQNO y PDZNO y el filtro solar BEMT.

Por otro lado, es sabido que una exposición intensa y/o prolongada a la radiación solar puede inducir daño celular, por lo que se aconseja minimizarla y prevenir el posible daño mediante el uso de fotoprotectores adecuados. Estos son formulados actualmente como una mezcla de principios activos con funciones diversas. Como componentes esenciales se incluyen filtros solares que protegen

de la luz solar y deben cubrir un rango amplio de radiación (UVA, UVB e IR), disminuyendo el flujo de fotones que llegan a la piel. Además se suelen añadir antioxidantes que evitan la posible oxidación celular mediante un bloqueo de las EROs. Paradójicamente existen estudios que indican que algunos filtros podrían fotosensibilizar daño sobre el ADN, y por tanto se deben extremar las precauciones para evitar que el uso de filtros resulte perjudicial para la salud (regulado en Europa por COLIPA).⁶⁻⁷

Puesto que ambos principios activos (filtros y antioxidantes) pueden actuar de forma sinérgica para prevenir los posibles daños producidos por la radiación solar, un objetivo interesante, tanto desde el punto de vista científico como por su posible aplicación en la industria cosmético-farmacéutica, sería descubrir que una misma molécula pudiera realizar ambas funciones.

En este contexto, el filtro solar bemotrizinol (BEMT) (**Figura 6.1.**) está catalogado como de amplio espectro, ya que absorbe tanto en el rango de luz UVA como en el UVB y se ha comprobado que es uno de los filtros químicos vigentes más fotoestables, ya que disipa la energía absorbida a través de una transferencia reversible de hidrógeno intramolecular en el estado excitado. Por estas razones BEMT fue seleccionado en el presente trabajo como un buen candidato para evaluar su capacidad como aceptor de oxígeno atómico.⁸⁻⁹

6.2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente capítulo es comprobar si bemotrizinol puede actuar como un aceptor potencial de oxígeno atómico y actuar así como antioxidante, además de como filtro solar. Ello implica abordar los siguientes objetivos específicos:

1. Generar oxígeno atómico por fotólisis de *N*-óxidos heterocíclicos, revelando su formación mediante captura química para dar especies detectables en estado estacionario o mediante técnicas con resolución temporal.
2. Adaptar el método descrito por Scaiano para determinar mediante fotólisis de destello láser la constante de velocidad de reacción de $O(^3P)$ con BEMT.
3. Identificar los sitios de reacción de BEMT frente a $O(^3P)$ mediante análisis directo de los fotoproductos, en combinación con estudios en sistemas modelo basados en las subestructuras principales de BEMT.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 FDL de *N*-óxidos a 266 nm

Adaptando el método descrito en la bibliografía, se realizaron las medidas de formación de oxígeno atómico, detectado por su reacción con acetonitrilo.⁵

Se prepararon dos disoluciones, una para uno de los *N*-óxidos seleccionados en el estudio, piridacina *N*-óxido (PDZNO) y piridina *N*-óxido (PYRNO), con la misma absorbancia a $\lambda=266$ nm (a la longitud de onda de excitación de $\lambda_{\text{ex}}=266$ nm) (**Figura 6.2.**). Al realizar la FDL y comparar las señales de las especies transitorias a $\lambda_{\text{em}}=340$ nm obtenidas a partir de ambas disoluciones, se observó una relación señal/ruido más favorable para PDZNO (**Figura 6.3.A.**). Por ello, para los siguientes experimentos se seleccionó PDZNO como fuente de generación de $[\text{O}(^3\text{P})]$.

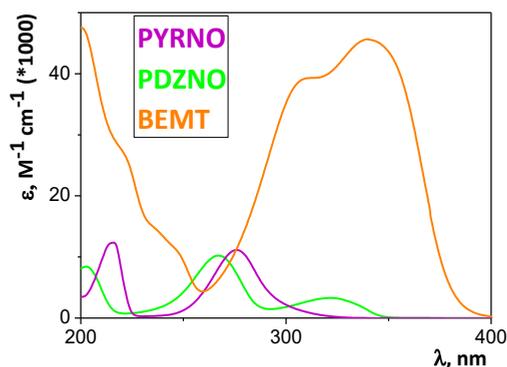


Figura 6.2.: Espectros de absorción UV de disoluciones en MeCN.

El espectro de absorción transitoria obtenido por FDL de la disolución de PDZNO se muestra en la **Figura 6.3.B.**. El $\text{O}(^3\text{P})$ formado por escisión del enlace entre nitrógeno y oxígeno del *N*-óxido, reaccionó con el disolvente dando lugar al óxido de acetonitrilo (MeCNO) que no desaparece en la escala de tiempo registrada (<10 μs).

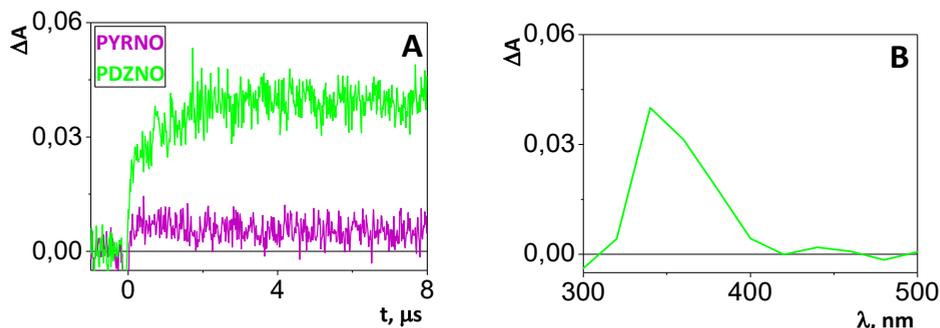


Figura 6.3.: **A:** Comparación de las trazas cinéticas FDL de PYRNO ($4 \cdot 10^{-5}$ M) y PDZNO ($5,4 \cdot 10^{-5}$ M) ($\lambda_{ex}=266$ nm/ $\lambda_{obs}=340$ nm/ N_2 / MeCN). **B:** Espectro de absorción transitoria de PDZNO obtenido 0,8 μs después del pulso láser ($\lambda_{ex}=266$ nm/ N_2 / MeCN).

Para comprobar la capacidad del filtro solar bemotrizinol (BEMT) como antioxidante se realizó un experimento de FDL donde se mantuvo constante la concentración de piridacina *N*-óxido y se añadieron concentraciones crecientes de BEMT (ratio PDZN:BEMT: 1:0,1/ 1:0,2/ 1:0,4). Cabe destacar que se seleccionó la longitud de onda de excitación de 266 nm porque, como se puede observar en los espectros de absorción (**Figura 6.2.**), PDZNO posee un máximo de absorción a esta longitud de onda, lo que implicaría una formación más eficiente de oxígeno atómico. Por el contrario BEMT posee un mínimo de absorción a 266 nm, permitiendo minimizar a esta λ el posible efecto filtro de esta molécula que repercutiría negativamente en la formación de $O(^3P)$.

Al monitorizar la especie asignada como MeCNO a 340 nm para estas disoluciones (**Figura 6.4.**), se observó que ésta especie transitoria disminuye al aumentar la concentración de BEMT en el medio. Ello indica una interacción entre BEMT y el oxígeno atómico, que compite con la reacción entre el $O(^3P)$ y el disolvente.

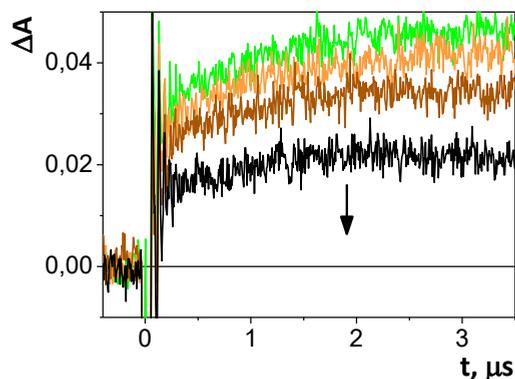


Figura 6.4.: Cinéticas de formación obtenidas por MeCNO en FDL a 266 nm, al excitar PDZNO ($4 \cdot 10^{-5}$ M) en MeCN (verde) en presencia de concentraciones crecientes de BEMT (PDZN:BEMT 1:0,1-naranja/ 1:0,2-marrón/ 1:0,4-negro) ($\lambda_{\text{ex}}=266$ nm/ $\lambda_{\text{obs}}=340$ nm/ / N_2).

La dependencia de la intensidad de la señal de absorción de CH_3CNO vs [BEMT] se analizó mediante la ecuación de Stern-Volmer dando lugar a un ajuste lineal (**Figura 6.5.**); cuya pendiente de la recta permitió obtener la constante de la desactivación (k_d) de formación de MeCNO por BEMT. El elevado valor de $k_d=1,0 \pm 0,5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ indica una gran afinidad de BEMT por $\text{O}(^3\text{P})$. Cabe comentar que se observó una leve curvatura en los puntos del ajuste, atribuible a un ligero efecto filtro del desactivante (BEMT) o al error intrínseco de la medida.

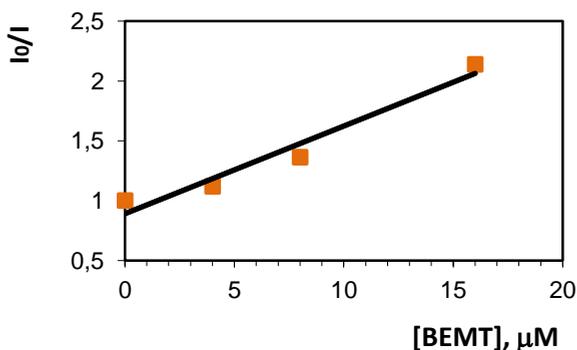


Figura 6.5.: Representación del ajuste lineal de Stern-Volmer para la dependencia de la intensidad de absorción de MeCNO frente a la concentración de BEMT.

6.3.2. FDL de *N*-óxidos a 355 nm

Para descartar el posible efecto filtro por BEMT en la formación de oxígeno atómico y con el fin de ampliar el estudio a otros *N*-óxidos de heterociclos, se realizaron las medidas de FDL a la longitud de onda de excitación de $\lambda_{\text{ex}}=355$ nm de 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) (**Figura 6.6.A.**) con distintas concentraciones de BEMT. Al excitar NQNO sola en disolución de acetonitrilo se registró un espectro de absorción transitorio (**Figura 6.6.B.**) donde se observó a 550 nm la banda de una especie asignada como triplete ($^3\text{NQNO}^*$) y a 340 nm la banda asignada a la absorción del MeCNO formado.

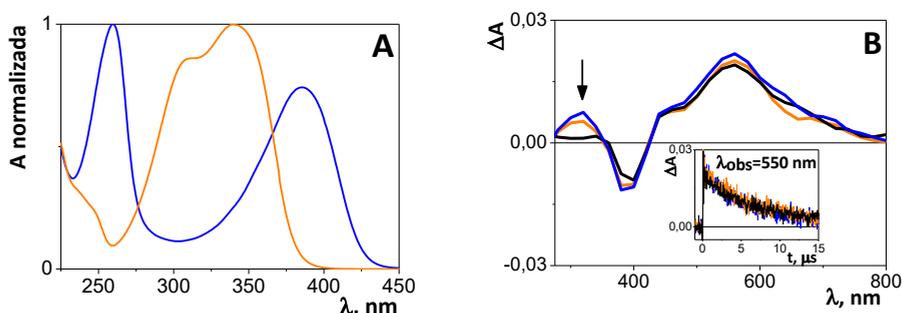
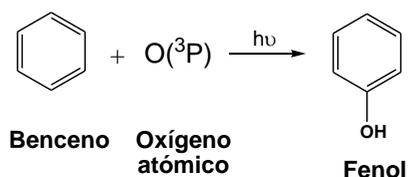


Figura 6.6.: **A:** Espectros normalizados UV-vis de NQNO (azul) y BEMT (naranja) en MeCN. **B:** Espectro de absorción T-T obtenido por FDL de NQNO ($3 \cdot 10^{-5}$ M) (azul) y en presencia de diferentes concentraciones de BEMT (NQNO:BEMT/ 1:0,1-naranja/ 1:1-negro). **Inserción:** Monitorización de las cinéticas de desaparición de la banda a 550 nm para las distintas relaciones NQNO:BEMT.

En presencia de concentraciones crecientes de BEMT se observó que el máximo de absorción del triplete de NQNO ($\lambda_{\text{T-T}}=550$ nm) no varía su intensidad (**Figura 6.6.B.**) ni tampoco el tiempo de vida de dicha especie (**Figura 6.6. Inserción**), mientras que la banda correspondiente a la formación de MeCNO (340 nm) disminuye al aumentar la concentración de BEMT (**Figura 6.6. B.**). Ello indica que la cantidad formada de estado excitado triplete de *N*-óxido es constante y por tanto la generación de oxígeno atómico también lo es. Así pues, la disminución en la banda correspondiente al MeCNO en presencia de BEMT se atribuye a la reacción competitiva de BEMT y MeCN por $\text{O}(^3\text{P})$ y no a un efecto filtro del derivado de triazina.

6.3.3. Irradiación de *N*-óxidos en estado estacionario

En paralelo a los estudios en tiempo resuelto, se investigó la reacción de BEMT y $O(^3P)$ en estado estacionario, mediante irradiación de una muestra de piridacina *N*-óxido en benceno a 254 nm. La oxidación de benceno por el oxígeno atómico se detectó analizando el fenol obtenido (**Reacción 6.3.**). El seguimiento de la reacción se hizo por GC-MS, midiendo el fenol formado y comparando su área de pico con la de un patrón interno.⁸⁻⁹



Reacción 6.3.: Oxidación de benceno por oxígeno atómico.

Se realizaron experimentos en presencia y en ausencia de filtro solar, monitorizando la formación de fenol con el tiempo y analizando la influencia de la concentración de BEMT en el proceso. Todas las medidas se realizaron bajo atmósfera inerte, para asegurar que la posible oxidación fuera producida únicamente por $O(^3P)$ y no por oxígeno atmosférico. En la **Figura 6.7.** se compararon las pendientes de las representaciones lineales de la formación de fenol a distintos tiempos en presencia y en ausencia del filtro BEMT, a partir de las cuales se calculó la constante de desactivación del precursor del fenol el $O(^3P)$, por BEMT obteniendo un valor de $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado es consistente con el obtenido por medidas de absorción transitoria con FDL en el **apartado 6.3.1.**

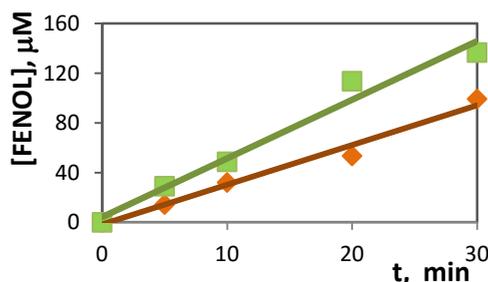


Figura 6.7.: Cantidad de fenol formada al irradiar vs tiempo de irradiación, en presencia (naranja) (PDZNO:BENCENO:BEMT/1:10:0,03) y en ausencia de BEMT (verde) (PDZNO:BENCENO/1:10).

6.3.4 Detección de fotoproductos oxidados de BEMT

Se realizó una irradiación monocromática a 266 nm de disoluciones de PDZNO y BEMT, y se analizaron los posibles fotoproductos formados mediante la técnica UPLC-MS/MS. Fueron detectados dos fotoproductos con masa 644,3691 y 644,3682 correspondientes a la fórmula molecular $C_{38}H_{50}N_3O_6$ (MH^+) que coinciden con la incorporación de un átomo de oxígeno a la estructura de BEMT. El experimento control confirmó que estos productos no se forman cuando la mezcla se mantiene en la oscuridad.

Con la finalidad de profundizar en el mecanismo de actuación del oxígeno atómico sobre BEMT, se irradió PDZN en presencia de compuestos más simples relacionados con sus subestructuras (ver *Figura 6.1.*). Las moléculas seleccionadas fueron trimetoxitriazina, como modelo del núcleo central del filtro solar; así como m-metoxifenol y metoxibenceno, como modelos de los sustituyentes del heterociclo (*Figura 6.8.*).

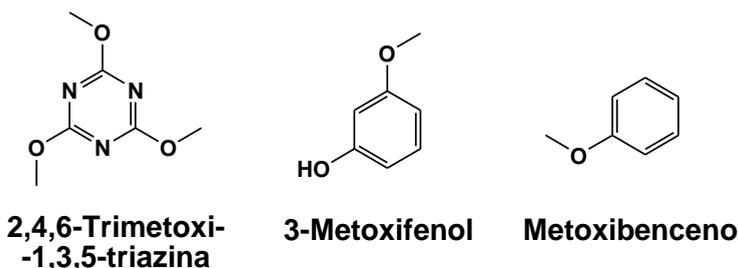


Figura 6.8.: Estructuras moleculares de los fragmentos de BEMT seleccionados como modelos.

Se analizaron todas las mezclas de irradiación por la técnica UPLC-MS/MS y la única subestructura donde se encontró un fotoproducto con incorporación de oxígeno fue el metoxibenceno, que dio lugar al orto-metoxifenol.

6.4. CONCLUSIONES

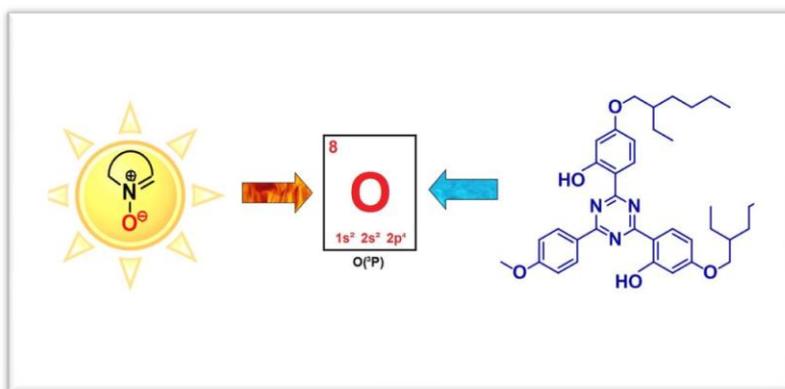
Conclusiones

En el presente capítulo se ha identificado la formación de $O(^3P)$ a partir de la ruptura fotoquímica del enlace N-O de los *N*-óxidos heterocíclicos en estudio. Aunque no ha sido posible la detección directa de oxígeno atómico, se han desarrollado dos métodos para revelar la formación de esta especie reactiva de oxígeno, basados en su captura química.

Así, mediante la técnica de FDL se ha observado la formación del óxido de acetonitrilo como especie transitoria en las disoluciones de acetonitrilo de PYRNO, PDZNO y NQNO. Por otra parte, a través de la irradiación de PDZNO en estado estacionario se ha detectado la formación de fenol a partir de benceno.

Además se ha demostrado la gran reactividad de BEMT frente al oxígeno atómico, con una constante de la interacción de $k_d=1*10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ calculada por dos métodos diferentes y se ha evidenciado la incorporación de oxígeno a la estructura del filtro solar por UPLC-MS/MS, teniendo lugar la oxidación preferentemente en el sustituyente metoxilado.

En resumen, el BEMT puede ser usado en protección solar con una doble acción. Por un lado es un filtro de amplio espectro y por otro actúa como antioxidante, por lo que podría reducir y prevenir la fotooxidación celular y por tanto un posible envejecimiento acelerado de la piel e incluso enfermedades severas como el melanoma.



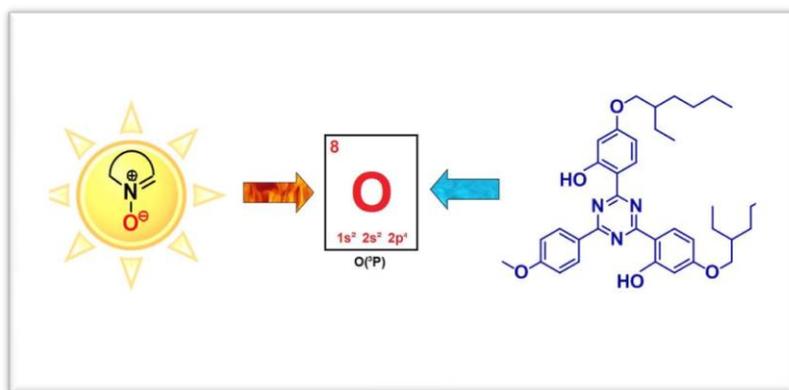
Conclusions

In this chapter, experimental evidence is provided supporting generation of atomic oxygen ($O(^3P)$) by photolytic cleavage of the N-O bond in heterocyclic *N*-oxides. Although the direct detection of $O(^3P)$ is not possible, two methods have been used to reveal its formation via chemical trapping of this reactive oxygen species.

Thus, laser flash photolysis (LFP) of pyridine *N*-oxide (PYRNO), pyridazine *N*-oxide (PDZNO) and nitroquinoline *N*-oxide (NQNO) in acetonitrile solutions allows detecting the corresponding nitrilium oxide as a transient species. In a different approach, steady-state irradiation of a benzene solution of PDZNO leads to the formation of phenol.

Also, a remarkable reactivity has been found between the solar filter BEMT and atomic oxygen, with a rate constant as high as $k_d=1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Using UPLC-MS/MS analysis it has been established that the trapped oxygen atom is incorporated to the structure of the filter, specifically to the methoxylated aromatic ring.

These results suggest that certain sunscreen ingredients could be working in sun protection with a double action, namely as broad spectrum UV filters and as antioxidants. This way, they can be effective reducing cellular photooxidation and retarding skin aging or even the appearance of severe diseases such as melanoma.



6.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos y disolventes

Los *N*-óxidos (PYRNO, PDZNO y NQNO) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® y el filtro solar BEMT de BASF®. Los disolventes suministrados por Merck®.

Medidas de irradiación por fotólisis de destello láser

Los experimentos de FDL se realizaron a longitudes de onda de 266 nm ([PDZNO]= $4 \cdot 10^{-5}$ M y [PYRNO]= $5,2 \cdot 10^{-5}$ M), y 355 nm ([NQNO]= $3 \cdot 10^{-5}$ M), con una duración de pulso <10 ns y una potencia en ambos casos de 15 mJ. Las medidas de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo (V=3 ml) con una distancia de paso óptico de 10x10 mm y a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente) previa purga para obtener atmósfera inerte (burbujeo de 20 minutos de N₂). La absorbancia de las muestras se mantuvo por debajo de 0,4 u.a..

Medidas de irradiación en fotorreactor en estado estacionario

Las irradiaciones en estado estacionario se hicieron con muestras situadas en el interior de un fotorreactor modelo LZC-UVC de Luzchem con capacidad para 10 lámparas de baja presión de mercurio que poseen un máximo en el espectro de emisión a 254 nm.

Los experimentos se realizaron con agitación constante de disoluciones [PDZNO]= $1 \cdot 10^{-4}$ M, [Benceno]= 0,1 M con y sin presencia del filtro solar (PDZNO:BEMT/1:10). Todas las disoluciones fueron preparadas en MeCN como disolvente y en atmósfera de argón. Se midió la formación de fenol a tiempo 0, 5, 10, 20, 30 min, por cromatografía de gases-masas, determinando el área del pico de fenol en el cromatograma con bifenilo como patrón interno.

Medidas de irradiación monocromática en estado estacionario

Para la irradiación monocromática a 266 nm, se utilizó una lámpara de xenón de 100 W acoplada con un monocromador Czerny-Turney. Las disoluciones empleadas fueron mezclas de NQNO sola con MeCN como disolventes ($[NQNO]=1 \cdot 10^{-4}$ M) y NQNO presencia del filtro solar BEMT (1:1) y de las estructuras modelos seleccionadas (1:1). Las muestras en atmósfera de argón fueron en agitación continua, expuestas a la lámpara durante 30 minutos y bajo agitación continua.

Detección UPLC-MS/MS

Para la detección de la masa exacta de los fotoproductos, se realizó sobre las muestras filtradas expuestas a la irradiación monocromática, trabajando en modo de ionización positiva con un voltaje de 3 kV generando los iones $[M + H]^+$. La separación se llevó a cabo con una columna C18 (50 mm * 2.1 mm i.d. * 1,7 μ m) y como eluyente un gradiente de acetonitrilo y agua.

6.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Wauchope, O. R.; Shakya, S.; Sawwan, N.; Liebman, J. F.; Greer, A., *J. Sulfur Chem.* **2007**, 28, 11-16.
- 2- Zhang, M.; Ravilious, G. E.; Hicks, L. M.; Jez, J. M.; McCulla, R. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 16979-82.
- 3- Fasani, E.; Amer, A. M.; Albini, A., The photo-deoxygenation of heterocyclic N-oxides. *Heterocycles* **1994**, 37, 985-992
- 4- Albini, A.; Alpegiani, M., The photochemistry of N-oxide function. *Chem. Rev.* **1984**, 84, 43-71.
- 5- Bucher, G.; Scaiano, J. C., *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 12471-12473.
- 6- Bastien, N.; Millau, J. F.; Rouabhia, M.; Davies, R. J.; Drouin, R., *J. Invest. Dermatol.* **2010**, 130, 2463-71;
- 7- Venditti, E.; Bruge, F.; Astolfi, P.; Kochevar, I.; Damiani, E., *J. Dermatol. Sci.* **2011**, 63, 55-61.
- 8- Lhiaubet-Vallet, V.; Marin, M.; Jimenez, O.; Gorchs, O.; Trullas, C.; Miranda, M. A., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 552-558;
- 9- Herzog, B.; Wehrle, M.; Quass, K., *Photochem. Photobiol.* **2009**, 85, 869-878.

7

Instrumentación

MEDIDAS DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los espectros de absorción UV-vis se realizaron con un espectrómetro de Jasco® modelos V-650 y V-630, y usando cubetas de cuarzo 10*10 mm con una capacidad para 4 ml.

MEDIDAS DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO

Espectrofluorímetro Jasco FP-8500, equipado con un SCE-846 y lámpara de Xenon de 150 W.

MEDIDAS DE FLUORESCENCIA EN TIEMPO RESUELTO

Se usó un espectrofluorímetro EasyLife X (Optical Building Blocks) con un detector PTI de resolución temporal en la escala de los nanosegundos, acoplado a lámparas LED de diferentes longitudes de onda así como filtros para poder cortar la radiación con longitud de onda inferior.

MEDIDAS DE FOSFORESCENCIA

Tanto los espectros de emisión como los tiempos de vida se registraron en un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) modelo TM 2/2003 equipado con una lámpara de Xenón.

IRRADIACIÓN FOTOQUÍMICA MONOCROMÁTICA

Irradiación con lámpara de Xenon de 150 W acoplada a un monocromador SCE-846.

IRRADIACIÓN FOTOQUÍMICA EN ESTADO ESTACIONARIO

Irradiación estacionaria en un fotorreactor multilámpara modelo LZC-ICH1 de Luzchem® de 300 W, con capacidad para 10 lámparas de baja presión de mercurio con un máximo en el espectro de emisión a 254 nm y una potencia de 8 W modelo LZC-UVC de la misma casa comercial. El equipo posee un ventilador para termostatar la muestra y un agitador para homogeneizarla.

MEDIDAS EN CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASAS

El equipo usado de la casa Agilent Technologies es Modelo Agilent® 7683 Series Injector, HP® 6890 Serie GC System y Agilent® 5973 Network Mass Selective Detector, .

MEDIDAS DE DETECCIÓN DE UPLC-MS

Para la detección de la masa exacta de los fotoproductos, se usó un sistema Acquity UPLC (Waters Corp.) con un inyector automático acondicionado a 4 °C, conectado con un espectrómetro Acquity XevoQToF (Waters Corp.) conectado por interfaz de ionización por electrospray (ESI) trabajando en modo de ionización positiva con un voltaje de 3 kV generando los iones $[M + H]^+$. La separación se llevó a cabo con una columna C18 (50 mm * 2.1 mm i.d. * 1,7 μ m) como eluyente un gradiente de acetonitrilo y agua.

MEDIDAS DE FOTÓLISIS DE DESTELLO LÁSER EN LA ESCALA DE LOS NANOSEGUNDOS

Para los experimentos se usó un Láser Nd-YAG Quantel Brilliant (donde los pulsos tienen una duración de 5 ns) con un equipo miniaturizado mLFP-111 Luzchem®. Este espectrómetro de absorción transitoria incluye una fuente de luz de Xenon, un monocromador de 125 mm, un osciloscopio Tektronix de la serie TDS-3000 de 9 bit con ancho de banda de 300 MHz, un fotomultiplicador compacto y una fuente de alimentación, un portacubetas termostatzado, conectores de fibra óptica y programa desarrollado en el entorno LabVIEW de National Instruments. El equipo de FDL proporciona un voltaje de pulsos de corte de 5V con frecuencia y retardo de señal programables. El diámetro del disparo en la cubeta es de aproximadamente 4mm. Las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo 10*10mm con una capacidad para 4 ml.

MEDIDAS DE FOTÓLISIS DE DESTELLO LÁSER EN LA ESCALA DE LOS FEMTOSEGUNDOS

Para las medidas ultrarápidas en FDL, se usó un pulso de excitación a 400 nm de 60 fs de duración generado con una lámpara titanio-zafiro (Spectra Physics,

Mountain View, CA) que emite luz a 800 nm, acoplado a un convertor (Halcyone, Ultrafast System) que produce una luz a 400 nm. La resolución temporal del equipo es de unos 250 fs, con una resolución espectral de 5 nm. Los pulsos en la escala de los femtosegundos se generaron con un sistema láser amplificado titanio-zafiro, que produce pulsos de 1W con máximo centrado en 800 nm y con repetición de 1 kHz. Con un cristal de b-bario borato, se genera el tercer armónico centrado a 267 nm. El haz pasa colimado por las cubetas de 2 mm de cuarzo donde se sitúa la muestra donde se registra la absorción transitoria (Helios, Ultrafast Systems, Sarasota, FL). El pulso de prueba para las medidas ópticas se produce con el paso de una pequeña porción de luz de 800 nm con un retraso (ventana de 3200 ps) centrado en un cristal de zafiro de 2 mm de espesor que genera la luz blanca continua en el rango 430–800 nm. La resolución temporal del tiempo calculado es de 150 fs. Todas las muestras fueron medidas con el ángulo mágico para evitar los decaimientos rotacionales. Se usó el software "Glotaran 1.3" para realizar los ajustes de análisis de datos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral, se han caracterizado los estados excitados singlete y triplete del compuesto conocido como 4-desoxitirapazamina ($^1\text{DTPZ}^*$ y $^3\text{DTPZ}^*$, respectivamente), así como sus energías, tiempos de vida y bandas de absorción de los estados excitados. También se ha asignado como fluorescencia retardada (FR) de Tipo P una banda observada por fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos (nano-FDL). Dicha emisión viene dada por la aniquilación de dos estados excitados triplete de DTPZ que dan lugar al singlete $^1\text{DTPZ}^*$. La FR de tipo P aumenta al incrementar el número de estados excitados triplete de DTPZ, ya sea por un aumento de la concentración de DTPZ, como por una mayor energía de disparo del láser. También disminuye la intensidad de la FR al aumentar la concentración de oxígeno (por desactivación del estado excitado triplete). En cambio no se observa activación térmica, lo cual es característico de la FR de tipo P y permite descartar la intervención de una FR de tipo E.

Por otro lado, se han caracterizado los estados excitados singlete y triplete del compuesto 4-nitroquinolina *N*-óxido ($^1\text{NQNO}^*$ y $^3\text{NQNO}^*$, respectivamente) por distintas técnicas. Se ha registrado su espectro de fluorescencia de donde se ha calculado la energía de $^1\text{NQNO}^*$ y por FDL en la escala ultrarrápida se ha podido caracterizar el espectro de absorción S_1 - S_n y su tiempo de vida. Además, por espectroscopia de emisión se ha obtenido el espectro de fosforescencia y se ha calculado la energía del $^3\text{NQNO}^*$ y su tiempo de vida. También se ha caracterizado el estado excitado triplete utilizando desactivadores de este estado excitado.

Además, se ha confirmado la formación del estado excitado triplete de NQNO desde la especie identificada como $^1\text{NQNO}^*$ por la interpretación del isobéstico obtenido en la representación de los datos de femto-FDL, y su posterior desactivación (observada por FDL) desencadenando diversos comportamientos según las condiciones. Así, se observa que el triplete en presencia de dadores de electrones (DABCO) en disolvente aprótico da lugar al radical anión ($^{\bullet}\text{NQNO}$) tras una transferencia electrónica. Mientras que si en el medio existe un dador de protones (ya sea en presencia de trietilamina (Et_3N) en disolventes apróticos o por la presencia de disolventes próticos) se produce una protonación del $^{\bullet}\text{NQNO}$

obteniendo el radical anión protonado de NQNO ($^{\bullet}\text{NQNOH}$). También se observa que los procesos en disolvente prótico están ralentizados debidos a su esfera de solvatación y por tanto que los tiempos de vida de las especies en disolvente prótico se alargan y sus constantes de desactivación disminuyen

Se ha observado interacción entre el estado excitado triplete de NQNO y el aminoácido triptófano (Trp), tanto en su forma aislada como formando parte de la albúmina sérica humana (ASH). Específicamente, $^3\text{NQNO}^{\bullet}$ se desactiva por el aminoácido Trp mediante un mecanismo de transferencia electrónica, dando lugar al $^{\bullet}\text{NQNOH}$. También se ha observado un proceso similar en presencia de la proteína transportadora ASH. Por lo que respecta al estado excitado singlete del Trp ($^1\text{Trp}^{\bullet}$), éste se desactiva en presencia de NQNO, dando lugar a la formación de un exciplexo que emite a longitudes de onda mayores a la de emisión de $^1\text{Trp}^{\bullet}$. Dicho proceso también ocurre en la proteína ASH, lo que desvela que la molécula de NQNO se sitúa dentro de la estructura terciaria de la proteína próxima a la posición del aminoácido Trp.

Se ha identificado la formación de oxígeno atómico ($\text{O}(^3\text{P})$) a partir de la ruptura fotoquímica del enlace N-O de los *N*-óxidos heterocíclicos en estudio (piridina *N*-óxido (PYRNO), piridazina *N*-óxido (PDZNO) y NQNO). Aunque no ha sido posible la detección directa de oxígeno atómico, se han desarrollado dos métodos para revelar la formación de esta especie reactiva de oxígeno, basados en su captura química. Así, mediante la técnica de FDL se ha observado la formación del óxido de acetonitrilo como especie transitoria. Por otra parte, se ha detectado la formación de fenol a partir de benceno a través de la irradiación de PDZNO en estado estacionario.

Además, se ha demostrado que el bemotricinol (BEMT) puede ser usado en protección solar con una doble acción. Por un lado es un filtro solar de amplio espectro y por otro actúa como antioxidante debido a su gran reactividad frente al oxígeno atómico. Así, se ha evidenciado la incorporación de oxígeno a la estructura del filtro solar utilizando técnicas cromatográficas y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), teniendo lugar la oxidación preferentemente en el sustituyente metoxilado.

CONCLUSIONS

In this PhD thesis, a complete characterization of the singlet and triplet excited state of 4-desoxitirapazamine ($^1\text{DTPZ}^*$ y $^3\text{DTPZ}^*$ respectively) has been achieved. Specifically, the excited state energies and live times, as well as the emission and absorption spectra, have been established.

Besides, a negative band has been observed by nano-LPF and assigned to delayed fluorescence (FR). After analyze the experimental results obtained, the DF band has been classified as P type, since it arise from triplet-triplet annihilation of DTPZ. Accordingly, its decay rate is limited by the triplet lifetime ($\tau_{\text{FR}} \approx 5 \mu\text{s}$).

All analyzed factors support the FR P type assignment: the presence of oxygen deactivate both $^3\text{DTPZ}^*$ and RF; the enhanced of the triplet excited state (either by increasing the concentration of DTPZ or the laser energy) is observed a parallel increase of the RF intensity but no thermal activation is detected, as a matter of fact, the RF band intensity decreases with increasing temperature.

Also the singlet excited state of 4-nitroquinoline *N*-oxide ($^1\text{NQNO}^*$) has been characterized by different techniques. Thus, from the steady-state fluorescence spectrum, it has been possible to determine its energy (255 kJ/mol). In addition, femto-LPF has allowed us to register the S_1 - S_n absorption spectrum (with maximum at 425 nm and live time of 10 ps).

Similarly, the triplet excited state of 4-nitroquinoline *N*-oxide ($^3\text{NQNO}^*$) has been characterized by emission spectroscopy in solid matrix, at low temperature; in this way, the triplet energy has been estimated as 183 kJ/mol from the phosphorescence spectrum, and the emission lifetime has been determined as 3 ms. Formation of $^3\text{NQNO}^*$ by intersystem crossing from its precursor $^1\text{NQNO}^*$ has been evidenced by femto-FDL (as shown by the isosbestic point in Figure 4.7).

Then, the reactivity of $^3\text{NQNO}^*$ under different conditions has been investigated by nano-FDL. As expected for a triplet excited state, it is quenched by oxygen ($k_d = 1,4 \pm 0,1 * 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y β -carotene ($k_d = 3,3 \pm 0,8 * 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). In the presence of electron donors (such as DABCO) in aprotic solvents (MeCN), electron transfer occurs to give the radical anion ($^-\text{NQNO}$). Conversely, if proton donors are

present in the medium, arising either from a reagent (Et₃N) or from the solvent (MeCN:H₂O/4:1), the protonated radical of NQNO ([•]NQNOH) is produced.

It is worth pointing out that in protic solvents all processes are retarded, probably because of the solvation sphere. Hence, all transient species generated in protic media have typically longer lifetimes and slower decays. Besides, the electron transfer rate constants are lower with Et₃N than with DABCO, which is attributed to the relative oxidation potentials; moreover, the protonated radical formed in the presence of DABCO lives shorter than when the same species is produced in the presence of Et₃N.

Moreover, the studies have been focused on the interactions between the NQNO excited states and tryptophan (Trp), not only as the isolated amino acid but also inserted in the human serum albumin protein (ALB). Specifically, the NQNO triplet excited state is quenched by Trp via electron transfer, with a rate constant of $k_d=3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, giving rise to the NQNO protonated radical ([•]NQNOH). A similar process is observed in the protein.

The Trp singlet excited state is also quenched in the presence of NQNO, but in this case an exciplex is formed, which emits at longer wavelength. This process is also observed in the whole protein, pointing to the neighborhood between Trp and NQNO within the albumin. Thus, the obtained results indicate that NQNO is located inside the protein binding site containing the only available Trp residue.

Furthermore, experimental evidence is provided supporting generation of atomic oxygen (O(³P)) by photolytic cleavage of the N-O bond in heterocyclic *N*-oxides. Although the direct detection of O(³P) is not possible, two methods have been used to reveal its formation via chemical trapping of this reactive oxygen species. Thus, laser flash photolysis (LFP) of pyridine *N*-oxide (PYRNO), pyridazine *N*-oxide (PDZNO) and nitroquinoline *N*-oxide (NQNO) in acetonitrile solutions allows detecting the corresponding nitrilium oxide as a transient species. In a different approach, steady-state irradiation of a benzene solution of PDZNO leads to the formation of phenol.

Also, a remarkable reactivity has been found between the solar filter BEMT and atomic oxygen, with a rate constant as high as $k_d=1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Using UPLC-MS/MS analysis it has been established that the trapped oxygen atom is

incorporated to the structure of the filter, specifically to the methoxylated aromatic ring.

These results suggest that certain sunscreen ingredients could be working in sun protection with a double action, namely as broad spectrum UV filters and as antioxidants. This way, they can be effective reducing cellular photooxidation and retarding skin aging or even the appearance of severe diseases such as melanoma.

Resúmenes

RESUMEN

Los *N*-óxidos han despertado el interés científico en diferentes ámbitos. Su versatilidad ha hecho que el estudio fotoquímico de este tipo de compuestos constituya el enfoque principal de esta tesis. Así pues, se han seleccionado inicialmente los compuestos 4-desoxitirapazamina (DTPZ) y 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) para su caracterización fotofísica y fotoquímica y el estudio de las interacciones con diversas moléculas.

Se han caracterizado los estados excitados singlete y triplete del compuesto conocido como 4-desoxitirapazamina ($^1\text{DTPZ}^*$ y $^3\text{DTPZ}^*$, respectivamente). Además, aplicando las técnicas espectroscópicas con resolución temporal de fotólisis de destello láser en la escala de los nanosegundos (nano-FDL) y en la escala ultrarrápida de femtosegundos (femto-FDL), se han observado las bandas de absorción transitoria S_1-S_n , con un máximo de absorción a 640 nm y un tiempo de vida para $^1\text{DTPZ}^*$ de 4700 ps y para T_1-T_n , con un máximo de absorción a 310 nm y un tiempo de vida para $^3\text{DTPZ}^*$ de 4 μs . También, por espectroscopía de emisión de fluorescencia y fosforescencia se han caracterizado, respectivamente, las energías de los estados excitados singlete, con un valor de 264 kJ/mol, y triplete de 206 kJ/mol. Así como el tiempo de vida de fosforescencia, siendo de 3,7 ms, mientras que el de fluorescencia se estimó inferior a 1 ns. Así mismo se ha descrito una banda adicional observada por nano-FDL y asignada, según los resultados observados (al realizar cambios de concentración, variar la temperatura, modificar la intensidad del disparo láser, la presencia de oxígeno, etc...), como fluorescencia retardada de Tipo P.

Se ha caracterizado el estado excitado singlete del compuesto 4-nitroquinolina *N*-óxido ($^1\text{NQNO}^*$) por distintas técnicas espectroscópicas de absorción y emisión en estado estacionario y con

resolución temporal. Se ha registrado su espectro de fluorescencia, de dónde se ha calculado la energía del estado excitado singlete (255 kJ/mol), y por FDL en la escala ultrarrápida de femtosegundos se ha podido caracterizar el espectro de absorción S_1-S_n , (con máximo a 425 nm), así como el tiempo de vida del estado excitado singlete (10 ps). También, se ha caracterizado el estado excitado triplete de 4-nitroquinolina *N*-óxido (${}^3\text{NQNO}^*$), por espectroscopía de emisión, obteniendo su espectro de fosforescencia y calculando la energía de ${}^3\text{NQNO}^*$ (183 kJ/mol) y su tiempo de vida (3 ms). Para completar la caracterización del estado excitado triplete se han utilizado como desactivadores: oxígeno (con una $k_d=1,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y β -caroteno (con una $k_d=3,31 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Siguiendo con la caracterización de NQNO, se ha identificado la reactividad de su estado excitado triplete desde su formación (como se observa en el isobéptico por femto-FDL) a su desactivación (observada por nano-FDL), desencadenando diversos comportamientos según las condiciones. Así se observa que el triplete en presencia de dadores de electrones (DABCO) y en disolvente aprótico (MeCN) da lugar al radical anión (${}^{\bullet}\text{NQNO}$) tras una transferencia electrónica. Mientras que si en el medio existe un dador de protones, ya sea del reactivo (Et_3N) o del disolvente (MeCN:H₂O/4:1) se produce una protonación del radical obteniendo el radical anión protonado de NQNO (${}^{\bullet}\text{NQNOH}$) como resultante. Los procesos en disolvente prótico están ralentizados debido a su esfera de solvatación (con un tiempo de vida para ${}^3\text{NQNO}^*$ de 6 μs en MeCN y 8 μs en MeCN:H₂O; y para ${}^{\bullet}\text{NQNOH}$ un tiempo de vida de 21 μs en MeCN y 1 ms en MeCN:H₂O, con presencia de Et_3N en ambas disoluciones).

Por otra parte, se ha observado que el estado excitado triplete de NQNO se desactiva al ser excitado por nano-FDL en presencia de triptófano (Trp) con una constante $k_d=3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esto ocurre por un mecanismo de transferencia electrónica, dando lugar al radical protonado de NQNO. En presencia de proteína transportadora albúmina sérica humana (ASH) se observa una interacción similar, lo que indica que el *N*-óxido se sitúa dentro de la proteína y mantiene

una proximidad espacial con el Trp de la cadena peptídica. Por lo que respecta al estado excitado singlete del Trp, éste se desactiva en presencia de NQNO, dando lugar a la formación de un exciplexo que emite a longitudes de onda mayores a las del singlete del aminoácido. Dicho proceso también ocurre con la ASH, lo que nos vuelve a indicar una proximidad entre el Trp de la proteína y NQNO. Así, se puede afirmar que la molécula de NQNO se sitúa dentro de la estructura terciaria de la proteína próxima a la posición del aminoácido Trp.

De forma paralela, se han usado los *N*-óxidos heterocíclicos piridina *N*-óxido (PYRNO), piridazina *N*-óxido (PDZNO) y NQNO para obtener oxígeno atómico ($O(^3P)$) a partir de la ruptura fotoquímica homolítica del enlace N-O. Aunque no ha sido posible la detección directa de oxígeno atómico, debido a su elevada reactividad, sí se han desarrollado dos métodos para identificar los productos resultantes de la captura química de $O(^3P)$. Así, mediante la técnica espectroscópica de FDL se ha observado la formación del óxido de acetonitrilo como especie transitoria en las disoluciones de PYRNO, PDZNO y NQNO en acetonitrilo. Por otra parte, a través de la irradiación de PDZNO disuelto en benceno en estado estacionario, se ha detectado la formación de fenol por cromatografía de gases. Además se ha demostrado la gran afinidad del filtro solar bemotrizinol (BEMT) por el oxígeno atómico, con una constante de desactivación para la interacción entre ambos de $k_d=1*10^{11} M^{-1}s^{-1}$ calculada por dos métodos diferentes. También se ha evidenciado la incorporación de oxígeno a la estructura del filtro solar a través del uso combinado de cromatografía líquida y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), teniendo lugar la oxidación preferentemente en el sustituyente metoxilado. Por tanto, BEMT usado generalmente como filtro solar, podría actuar también como antioxidante.

RESUM

Els *N*-òxids han sigut objectiu de gran interès científic en diferents àmbits. La seua versatilitat ha fet que l'estudi fotoquímic d'aquest tipus de compostos siga l'objectiu principal d'aquesta tesi. Així donç, s'han seleccionat inicialment els compostos 4-desoxitirapazamina (DTPZ) y 4-nitroquinolina *N*-òxid (NQNO) per a la seua caracterització fotofísica i fotoquímica i l'estudi de les interaccions amb diverses molècules.

S'han caracteritzat els estats excitats singlet i triplet del compost conegut com a 4-desoxitirapazamina ($^1\text{DTPZ}^*$ i $^3\text{DTPZ}^*$, respectivament). A més a més, aplicant les tècniques espectroscòpiques amb resolució temporal de fotòlisi de flaix làser amb escala de nanosegons (nano-FDL), s'han observat les bandes d'absorció transitòria S_1-S_n , amb un màxim d'absorció a 640 nm i un temps de vida per a $^1\text{DTPZ}^*$ de 4700 ps i per a T_1-T_n amb un màxim d'absorció a 310 nm i un temps de vida per a $^3\text{DTPZ}^*$ de 4 μs . També, per espectroscopia d'emissió de fluorescència y fosforescència s'han caracteritzat, respectivament, les energies dels estat excitats singlet amb un valor de 264 kJ/mol, i triplet de 206 kJ/mol. Així com el temps de vida de fosforescència, essent de 3,7 ms, mentre que el de fluorescència es va estimar inferior a 1 ns. Així mateix s'ha descrit una banda addicional observada (al realitzar canvis de concentració, variar la temperatura, modificar l'intensitat del dispar làser, amb la presència d'oxigen, etc...) com a fluorescència retardada de Tipo P.

S'ha caracteritzat l'estat excitat singlet del compost 4-nitroquinolina *N*-òxid ($^1\text{NQNO}^*$) per diferents tècniques espectroscòpiques d'absorció y emissió en estat estacionari i amb resolució temporal. S'ha registrat el seu espectre de fluorescència, d'on s'ha calculat l'energia (255 kJ/mol), y per FDL a l'escala ultrarràpida de

femtosegons s'ha pogut caracteritzar l'espectre de absorció S_1-S_n , (amb màxim a 425 nm), així com el temps de vida (10 ps). També, s'ha caracteritzat l'estat excitat triplet de 4-nitroquinolina *N*-òxid ($^3NQNO^*$), per espectroscopia d'emissió, obtenint el seu espectre de fosforescència y calculant l'energia de $^3NQNO^*$ (183 kJ/mol) i el seu temps de vida (3 ms). Per a completar la caracterització del estat excitat triplet s'ha utilitzat desactivadors (oxigen, con una $k_d=1,4 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$, y β -caroten amb una $k_d=3,31 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$) de l'estat excitat triplet. Seguint amb la caracterització de NQNO, s'ha identificat la reactivitat del seu estat excitat triplet des de la seua formació (com s'observa a l'isobèstic per femto-FDL) a la seua desactivació observada per nano-FDL, desencadenant diversos comportaments segons les condicions. Així s'observa que e triplet en presència de donadors d'electrons (DABCO) amb dissolvents apròtics (MeCN) dona lloc al radical anió ($^{\cdot}NQNO$) després d'una transferència electrònica. Mentre que si al medi existeixen donadors de protons, ja siga del reactiu (Et_3N) o del dissolvent (MeCN:H₂O/4:1) es produeix una protonació del radical i s'obté el radical anió protonat de NQNO ($^{\cdot}NQNOH$) com a resultat. Els processos en dissolvents pròtics està enrederits degut a l'esfera de solvatació ($^3NQNO^*$ amb un temps de vida de 6 μs amb MeCN i 8 μs amb MeCN:H₂O; $^{\cdot}NQNOH$ amb un temps de vida de 21 μs amb MeCN i 1 ms a MeCN:H₂O, amb Et_3N a ambdós dissolucions).

D'altra banda, s'ha observat que l'estat excitat triplet de NQNO es desactiva al ser excitat per nano-FDL en presencia de triptòfan (Trp) amb una constant de $k_d=3 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$. Això ocorre per un mecanisme de transferència electrònica, donant lloc al radical protonat de NQNO. En presència de proteïna transportadora albúmina sèrica humana (ASH) s'observa una interacció similar, el que indica que l' *N*-òxid es situa dintre de la proteïna i es manté una proximitat espacial amb el Trp de la cadena peptídica. Pel que fa a l'estat excitat singlet de Trp, que es desactiva en presencia de NQNO, donant lloc a la formació d'un exciplex que emitix a longituds d'ona majors a les del singlet de l'aminoàcid. Aquest procés també ocorre amb l'ASH, el que

ens torna a indicar la proximitat entre el Trp de la proteïna i NQNO. Així podem afirmar que la molècula de NQNO es situa dins de la estructura terciària de la proteïna pròxima a la posició del aminoàcid Trp.

De forma paral·lela s'han gastat els *N*-òxid heterocíclics piridina *N*-òxid (PYRNO), piridazina *N*-òxid (PDZNO) i NQNO per a obtenir l'oxigen atòmic ($O(^3P)$) a partir de la ruptura fotoquímica homolítica de l'enllaç N-O. Encara que no ha sigut possible la detecció directa de l'oxigen atòmic, degut a la seua elevada reactivitat, s'han desenvolupat dos mètodes per a identificar els productes resultants de la captura química de $O(^3P)$. Així, amb la tècnica espectroscòpica de FDL s'ha observat la formació de l'òxid d'acetonitril com a espècie transitòria a les dissolucions de PYRNO, PDZNO i NQNO en acetonitril. D'altra banda, a través de l'irradiació de PDZN dissolt en bencé en estat estacionari s'ha detectat la formació de fenol per cromatografia de gasos. Amés s'ha demostrat la gran afinitat del filtre solar bemotrizinol (BEMT) per l'oxigen atòmic, amb una constant de desactivació per a la interacció entre ambdós de $k_d=1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, calculada per dos mètodes diferents. També s'ha evidenciat la incorporació d'oxigen a la estructura del filtre solar a través de l'ús combinat de cromatografia líquida i espectroscopia de masses (UPC-MS/MS), produint-se l'oxidació preferentment al substituent metoxilat. Per tant, BEMT utilitzat generalment com a filtre solar, podria actuar també com a antioxidant.

ABSTRACT

Aromatic *N*-oxides have attracted considerable scientific interest in the past for a variety of reasons, which include their easy access, their versatile chemistry and their intriguing photochemical behavior. Hence, the general aim of the present thesis is to undertake a thorough photochemical study on a family of aromatic *N*-oxides. Specifically, the selected compounds are 4-desoxytirapazamine (DTPZ) and 4-nitroquinoline *N*-oxide (NQNO), and the study is focused on their photophysical and photochemical characterization, as well as on the interaction of their excited states with other molecules of interest.

Both the singlet and triplet excited states of DTPZ ($^1\text{DTPZ}^*$ and $^3\text{DTPZ}^*$, respectively) have been spectroscopically characterized. Thus, using laser flash photolysis in the femtosecond time scale (femto-FDL) the transient absorption spectrum corresponding to $^1\text{DTPZ}^*$ (S_1-S_n) has been observed as a band with maximum centered at 640 nm and lifetime of 4700 ps. In addition, laser flash photolysis in the nanosecond time scale (nano-FDL) has allowed us to obtain the transient spectrum corresponding to $^3\text{DTPZ}^*$ (T_1-T_n), with a maximum peaking at 310 nm and a lifetime of 4 μs . From the fluorescence and phosphorescence emission spectra, the energies of the singlet and triplet excited states have been estimated as 264 kJ/mol and 206 kJ/mol, respectively). Time-resolved emission measurements have provided the fluorescence and phosphorescence lifetimes (5,6 ns and 3,7 ms, respectively). Moreover, in the nano-FDL experiments a negative band has been observed and assigned as "P-TYPE delayed fluorescence" based on the influence of different experimental conditions (concentration, temperature, laser intensity, presence of oxygen, etc...).

As regards NQNO, its singlet excited state of ($^1\text{NQNO}^*$) has also been characterized by different spectroscopic techniques, combining transient absorption with steady state and time-resolved emission spectroscopy. The energy of $^1\text{NQNO}^*$ has been established as 255 kJ/mol from the fluorescence spectrum, whereas its lifetime has been found to be 10 ps in the femto-FDL experiments, where a characteristic S_1-S_n absorption band with maximum centered at 425 nm is observed. In a first stage, the triplet excited state of NQNO ($^3\text{NQNO}^*$) has also been characterized by emission spectroscopy. Thus, from the steady-state phosphorescence spectrum the triplet energy has been estimated as 183 kJ/mol, whereas the setup with time resolution has allowed us to determine the phosphorescence lifetime as 3 ms. Formation of $^3\text{NQNO}^*$ by intersystem crossing has been monitored by femto-FDL, which shows the appearance of a band with maximum at 560 nm (T_1-T_n), which increases with the decreasing intensity of its precursor 425 nm (S_1-S_n) band, giving rise to an isobestic point at 500 nm.

The characterization of $^3\text{NQNO}^*$ has been completed by nano-LFP, oxygen ($k_d = 1,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) as well as β -carotene ($k_d = 3,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) as quenchers. In addition, quenching of $^3\text{NQNO}^*$ electron donors (DABCO) is also observed in aprotic solvents, leading to the radical anion of NQNO ($^{\cdot}\text{NQNO}$). If there is a proton source in the medium (Et_3N as electron donor or $\text{MeCN:H}_2\text{O}/4:1$ as solvent system) protonation of the radical anion results in formation of the neutral radical of NQNO ($^{\cdot}\text{NQNOH}$). In general, all processes are slower in protic solvents because of the solvation sphere.

Moreover, it has been observed by nano-FDL that $^3\text{NQNO}^*$ is quenched by tryptophan (Trp) via an electron transfer mechanism, with a rate constant $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In the presence of human serum albumin protein (HSA) a similar interaction is observed, pointing to a close proximity between NQNO and the Trp residue of HSA and revealing that the N-oxide is indeed located in inside the protein cavities.

The singlet excited state of Trp is also quenched by NQNO, leading to formation of an exciplex that emits at longer wavelength (420 nm) than the non-complexed amino acid (330 nm). The same process is observed in HSA, providing further evidence in support of the proximity between NQNO and the Trp residue of the protein and NQNO. Thus, it is proven that NQNO enters into the protein and is hosted close to the Trp unit of HSA.

Finally, pyridine *N*-oxide (PYRNO), pyridazine *N*-oxide (PDZNO) and NQNO have been used to generate atomic oxygen ($O(^3P)$) through photochemical cleavage of the N-O bond. Although it has not been possible to achieve the direct detection of this reactive oxygen species, its generation has been evidenced by nano-LFP, using acetonitrile for chemical trapping. Under these conditions, formation of the nitrilium oxide MeCNO is monitored at 340 nm. Alternatively, using PDZNO as source of $O(^3P)$ and benzene as solvent, atomic oxygen is trapped by benzene to give phenol, which can be analyzed by gas chromatography. Following this approach, it has been demonstrated that $O(^3P)$ is efficiently scavenged by the solar filter bemotrizinol (BEMT) with a rate constant as high as $k_d = 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Incorporation of oxygen to the UV-filter has been demonstrated by UPLC-MS/MS. This incorporation occurs mainly at the methoxylated ring. Therefore, BEMT has a double function, acting both as UV-filter and as antioxidant.

Anexos

PUBLICACIONES

- **"Solar filters as feasible acceptors of atomic oxygen"**; Duran-Giner, Eva de les Neus*; Encinas Perea, Susana; Miranda Alonso, Miguel Ángel; *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2013**, 12, 725-728.

- **"Rapid LC Determination of UV Filters in Cosmetics using Ethanol as the Mobile Phase"**; Angel Balaguer, Silvia Talamantes, Eva de les Neus Duran Giner and Pascual Cuadrado Escamilla; *LC-GC Europe*, **2009**, 1, 562-568

- **"Estimación de la eficacia de los protectores solares: Técnicas in vivo"**; Balaguer, A; Duran-Giner, N.; Talamantes, S.; Romero, M.C.; Cuadrado, P., *Revista NCP: Noticias de Cosméticas y Perfumería*, Noviembre-Diciembre **2009**, 310, 7-13.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

- **“N-oxides Excited States Characterization with Fast and Ultrafast Laser Flash Photolysis Spectroscopy”** Duran-Giner, N.; Encinas, S.; Miranda, M. A; IV Jornadas Ibéricas de Fotoquímica, Junio **2014**, Lisboa (Portugal). Póster.

- **“Sunscreens as feasible acceptors of atomic oxygen”;** Encinas, S.; Duran-Giner, N.; Miranda; I Meeting of the RSEQ Chemical Biology Group, **2012**, Santiago de Compostela (Spain). Póster.

- **“UV filters as atomic oxygen transfer”** Encinas, S.; Duran-Giner, N.; Miranda; ESP Photobiology School 2012 (European Society for Photobiology), Junio **2012**, Bressanone (Italia). Póster

- **“Sunscreens as feasible oxygen acceptors in the photo-deoxygenation of heterocyclic N-oxides”** Encinas, S.; Duran-Giner, N.; Miranda; III Jornadas Ibéricas de Fotoquímica, **2011**, Granada (Spain). Charla (Susana Encinas).

- **“Photophysical characterization of heterocyclic N-oxides”** Duran-Giner, N.; Encinas, S.; Miranda, M. A; III Jornadas Ibéricas de Fotoquímica, Septiembre **2011**, Granada (España). Póster

- **“Sunscreens as feasible oxygen acceptors in the photo-deoxygenation of heterocyclic N-oxides”** Duran-Giner, N.; Encinas, S.; Miranda, M. A; XXXIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ), Julio **2011**, Valencia (España). Póster.

- **“Photoinduced oxidative DNA damage by heterocyclic N-oxides”** Encinas, S.; Duran-Giner, N.; Miranda, M. A.; XXIII IUPAC Symposium on Photochemistry, **2010**, Ferrara (Italia). Póster.

- **“Study of thermal and photoinduced degradation of dihydroxyacetone and erythrose”;** A Balaguer. , N Durán-Giner, S

Talamantes, P Cuadrado; RNB Cosméticos, Spain; 26th Congress of the International Federation of societies of Cosmetic Chemists (IFSCC); **2010**, Buenos Aires (Argentina). Póster.

- **“Avoiding toxic solvents in liquid chromatography methods. Application to the determination of Vitamin E Acetate and Methyl Nicotinate”** A Balaguer, S Talamantes, N Durán-Giner, MC Romero, P Cuadrado; RNB Cosméticos, Spain; 26th Congress of the International Federation of societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), **2010**, Buenos Aires (Argentina). Poster.

- **“Determination of urea in cosmetics using liquid chromatography with ultraviolet detection after a derivatization step”** A Balaguer. , N Durán-Giner, S Talamantes, P Cuadrado; RNB Cosméticos, Spain; 26th Congress of the International Federation of societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), **2010**, Buenos Aires (Argentina). Póster.

- **“Study of thermal degradation of preservatives”** A Balaguer, N Durán-Giner, MC Romero, S Talamantes, P Cuadrado; RNB Cosméticos, Spain; 26th Congress of the International Federation of societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), **2010**, Buenos Aires (Argentina). Póster.