

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto de Tecnología Química

(UPV-CSIC)



**ESTUDIO DE LA FOTOREACTIVIDAD DE LAS
FLUOROQUINOLONAS CON SUS BIOMOLÉCULAS DIANA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Sonia Soldevila Serrano

Dirigida por:

Dr. Francisco Boscá Mayans

Tutor:

Prof. Miguel Ángel Miranda Alonso

Valencia, Noviembre de 2015

D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Profesor Catedrático de Química de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICA Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Estudio de la fotoreactividad de las fluoroquinolonas con sus biomoléculas diana**”, ha sido desarrollada por SONIA SOLDEVILA SERRANO, bajo la dirección de D. FRANCISCO BOSCA MAYANS, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. Miguel A. Miranda Alonso

La vida de cada hombre es un camino hacia sí mismo, el ensayo de un camino, el boceto de un sendero.

Herman Hesse.

A Jordi

Tras cerca de cuatro años, el trabajo como doctorando llevado a cabo en ésta gran familia que es el ITQ ha llegado a su fin. No lo considero un fin en sí, sino más bien un “hasta luego”, ya siempre seguiré teniendo presente los buenos momentos que he pasado en el Instituto junto a todas las personas que lo componen.

Por suerte, he estado siempre rodeada de grandes personas, de las que he intentado aprender día a día, y creo que he conseguido llegar al final de la mejor manera posible, ya que me siento orgullosa del gran recuerdo que me llevo de cada una de ellas.

Todo ello ha sido gracias, en primer lugar, a la oportunidad que me ofreció Miguel Ángel Miranda de formar parte de esta gran familia y que no dudó de mí en ningún momento. Gracias a mi director Paco Boscá, que confió en mí y que tanto me ha ayudado en esta gratificante tarea. Por supuesto hay personas que siempre han estado ahí. Han estado junto a mí tanto en los buenos y malos momentos que tenemos todos en este largo camino que es la Tesis y sin los cuales no hubiera conseguido llegar hasta el final: Edurne, Patri y Faber; gracias por ofrecerme vuestra amistad, paciencia y alegría. No me olvido de Guillermo, que tanto me ha ayudado con mis rutas sintéticas. Gracias a todos aquellos compañeros del ITQ (en especial al grupo de Fotoquímica) y del Departamento de Química a los que en algún momento les he dado un “gracias sincero”, como es el caso de Chelo Cuquerella, Virginie y Marisa. Le estoy muy agradecida a Inma Andreu por ayudarme, asesorarme y por enseñarme a “amar” tanto esta profesión.

Gracias a la Generalitat Valenciana por el contrato PROMETEO, ya que sin él, nada de esto hubiera podido llevarse a cabo.

Entrando en el terreno personal, he de agradecer a mis padres, suegros, Ana, Urmila y Carles (mis hermanos, mis consejeros, mis amigos) el apoyo y el gran cariño con el que me obsequian cada uno de los días de mi vida; me siento muy afortunada de poder contar con cada uno de vosotros.

Gracias a “mis niños de cuatro patas” por darme tanto....

Pero sobre todo gracias a ti Jordi, que me has guiado siempre por el buen camino, y que me has hecho creer en que sí que hay personas imprescindibles en la vida. Gracias por caminar junto a mí, por luchar para mantener nuestro futuro siempre unido y por ayudarme a mejorar cada día en todos los aspectos, sin pedirme nada a cambio. *El hilo de plata que nos une, no podrá romperse nunca, pues somos solo uno.*

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda de todos vosotros.

Sonia

Abreviaturas y símbolos

Fluoroquinolonas

AFQ, aminofluoroquinolona

ALFX, lomefloxacinó N-acetilado

AN, ácido nalidíxico

ANFX, forma acetilada de norfloxacinó

BAY, rivaroxavan

CLQ, cloroquina

CPX, ciprofloxacino

EANFX, éster metílico de la forma acetilada de norfloxacinó

EAPFX, éster metílico de la forma acetilada de pefloxacino

EPFX, éster metílico de pefloxacino

ENRFX, enrofloxacinó

ENX, enoxacinó

FLU, flumequina

FLX, fleroxacinó

FQ, fluoroquinolona/s

LFX, lomefloxacinó

NFX, norfloxacinó

PFX, pefloxacino

RFX, rufloxacinó

SAFX, sarafloxacinó

Generales

A, absorbancia

AS, albúmina sérica

ASB, albúmina sérica bovina

ASH, albúmina sérica humana

ATT, aniquilación triplete-triplete

BC, benzofenona

BFA, ácido tetrafluorobórico

K_{sv}, constante de Stern-Volmer

NAP, naproxeno

PB, tampón fosfato

pK_a, constantes de disociación/protonación

Q, desactivador

RITC, reacción intramolecular transferencia de carga

RMN, resonancia magnética nuclear

BPC, ácido bifenilcarboxílico

CD₃OD, metanol deuterado

CDCl₃, cloroformo deuterado

CIS, cruce intersistema

dGMP, nucleósidoguanosínmonofosfato

dGuo, 2'-deoxiguanosina

E, energía

EE, estado estacionario

F, fluorescencia

FDL, fotólisis de destello láser

IBP, ibuprofeno

I_F, intensidad de fluorescencia

K_a, constantes de asociación

K_q, constante de desactivación

SS, especies secundarias

RP, radiólisis pulsada

TC, transferencia de carga

TEI, transferencia electrónica intramolecular

TFA, ácido trifluoroacético

Thy, timina

TMSCHN₂, trimetilsilildiazometano

Trp, triptófano

Tyr, tirosina

UV, ultravioleta

WAR, warfarina

ϵ , coeficiente de absorción molar

ϕ , rendimiento cuántico

λ , longitud de onda

τ , tiempo de vida

Índice

Índice

Capítulo I: Introducción	1
I.1. Estructura y clasificación de las quinolonas.....	3
I.2. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	7
I.3. Propiedades ácido-base de las quinolonas.....	8
I.4. Propiedades fotosensibilizantes de las fluoroquinolonas.....	10
I.4.1. Fenómenos de fototoxicidad y fotoalergia.....	10
I.5. Fotofísica de las fluoroquinolonas.....	11
I.5.1. Espectros de absorción de las fluoroquinolonas.....	13
I.5.2. Fluorescencia de las fluoroquinolonas.....	14
I.5.3. Fotoionización.....	16
I.5.4. Fosforescencia.....	16
I.5.5. Espectros de absorción del estado triplete.....	17
I.5.6. Reactividad de los estados excitados triplete de las fluoroquinolonas...	18
I.6. Fotoquímica de las fluoroquinolonas.....	20
I.7. Daño fotoinducido a biomoléculas.....	23
I.7.1. Radiación solar.....	23
I.7.2. Mecanismo de fotosensibilización.....	24
I.7.3. Interacción fármaco-proteína.....	25
I.7.4. Interacción fármaco-ADN.....	26
I.8. Daño a biomoléculas fotoinducido por fluoroquinolonas.....	29
I.9. Referencias bibliográficas.....	30
Capítulo II: Objetivos	37
II.1. Objetivo general.....	39
II.2. Objetivos concretos.....	39

Capítulo III: Excímeros triplete de fluoroquinolonas en medio acuoso	41
III.1. Introducción.....	43
III.2. Resultados.....	45
III.2.1. Reacciones de autodesactivación de los estados excitados triplete de fluoroquinolonas.....	45
III.2.2. Reactividad del estado triplete de las fluoroquinolonas (³ FQ) en presencia de tampón fosfato (PB).....	50
III.2.3. Procesos de transferencia de energía de las especies secundarias (SS) con el naproxeno (NAP) y el ácido bifenilcarboxílico (BPC).....	51
III.2.4. Efecto de la concentración de HPO ₄ ²⁻ sobre las propiedades fotofísicas de las fluoroquinolonas.....	52
III.2.5. Reacciones de transferencia electrónica del triplete de las fluoroquinolonas (³ FQ) con triptófano (Trp).....	54
III.2.6. Estudios de fotodegradación de norfloxacino (NFX) y su derivado acetilado (ANFX).....	56
III.3. Discusión.....	57
III.4. Conclusiones.....	60
III.5. Procedimiento experimental.....	60
III.5.1. Materiales.....	60
III.5.2. Preparación de las muestras.....	61
III.5.3. Experimentos de fotólisis de destello láser.....	61
III.5.4. Medidas de fluorescencia.....	62
III.5.5. Irradiaciones.....	62
III.6. Referencias bibliográficas.....	64
Capítulo IV: Fotoreactividad de fluoroquinolonas: Naturaleza de los cationes arilo generados en medio acuoso	67
IV.1. Introducción.....	69
IV.2. Resultados.....	71

Índice

IV.2.1. Fluorescencias de lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado (ALFX).....	71
IV.2.2. Intermedios de fotodegradación de lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado (ALFX).....	72
IV.2.3. Estudios de fotodegradación de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX).....	77
IV.2.4. Mecanismos de fotodegradación de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX).....	78
IV.3. Discusión y conclusiones.....	79
IV.4. Procedimiento experimental.....	80
IV.4.1. Materiales y preparación de disoluciones.....	80
IV.4.2. Equipamiento.....	80
IV.4.3. Medidas de absorción y emisión.....	81
IV.4.4. Experimentos de fotólisis de destello láser.....	81
IV.4.5. Síntesis del ácido 7-(4-acetil-3-metil-1-piperazinil)-1-etil-6,8-difluoro-2,3-dihidro-4-oxo-quinolin-3-carboxílico (ALFX).....	82
IV.4.6. Estudios cinéticos y caracterización de fotoproductos.....	84
IV.5. Referencias bibliográficas.....	90
Capítulo V: Fotoreactividad de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX) con ADN. Estudios mediante radiólisis pulsada, estado estacionario y fotólisis de destello láser.....	93
V.1. Introducción.....	95
V.2. Resultados.....	96
V.2.1. Estudios de emisión.....	96
V.2.2. Experimentos de fotólisis de destello láser.....	100
V.2.3. Experimentos de reducción de lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) mediante la técnica de radiólisis pulsada.....	103
V.2.4. Estudios cinéticos y análisis de los fotoproductos de fotodegradación de lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado (ALFX).....	104
V.2.5. Daño al ADN.....	106

Índice

V.3. Discusión.....	108
V.4. Conclusiones.....	113
V.5. Procedimiento experimental.....	113
V.5.1. Materiales.....	113
V.5.2. Medidas de emisión.....	114
V.5.3. Experimentos de fotólisis de destello láser.....	115
V.5.4. Experimentos de radiólisis pulsada.....	115
V.5.5. Análisis de la fotólisis en estado estacionario y de los fotoproductos....	116
V.5.6. Análisis de la fotodegradación de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX).....	117
V.5.7. Análisis del daño fotoinducido al ADN.....	117
V.6. Referencias bibliográficas.....	118
Capítulo VI: Propiedades fotoalérgicas de las fluoroquinolonas: Fotoreactividad de lomefloxacino (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX) con aminoácidos y albúmina sérica humana (ASH).....	123
VI.1. Introducción.....	125
VI.2. Resultados y discusión.....	127
VI.2.1. Estudio de las interacciones entre lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) con albúmina sérica humana (ASH) mediante estudios de emisión.....	127
- Desactivación de la fluorescencia de proteínas por su interacción con fluoroquinolonas.....	127
- Desactivación de la fluorescencia de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) por su interacción con albúmina sérica humana (ASH).....	128
- Reactividad de los cationes arilo de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) con albúmina sérica humana (ASH).....	133
- Reactividad de los cationes arilo de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) con triptófano (Trp) y tirosina (Tyr).....	134
- Unión covalente entre de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) y albúmina sérica (ASH).....	135
- Unión covalente entre humana de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) y los aminoácidos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr)	137

Índice

- Mecanismos involucrados en la fotounión de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) con albúmina sérica humana (ASH).....	139
VI.3. Conclusiones.....	141
VI.4. Procedimiento experimental.....	142
VI.4.1. Materiales generales.....	142
VI.4.2. Medidas de absorción y emisión.....	143
VI.4.3. Desactivación de la fluorescencia de albúmina sérica humana (ASH) por fluoroquinolonas.....	143
VI.4.4. Desactivación de la fluorescencia de fluoroquinolonas por albúmina sérica humana (ASH).....	143
VI.4.5. Experimentos de fotólisis de destello láser.....	144
VI.4.6. Análisis de la unión covalente entre fluoroquinolonas y albúmina sérica humana (ASH) inducida por luz.....	146
VI.4.7. Análisis de los fotoproductos de la fotólisis de lomefloxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) en presencia de los aminoácidos triptófano (Trp) y tirosina (Tyr).....	146
VI.5. Referencias bibliográficas.....	146
Capítulo VII: Conclusiones.....	153
Resúmenes.....	159
Contribuciones a congresos	
Publicaciones	

Capítulo I: Introducción

I.1. Estructura y clasificación de las Quinolonas.

Las quinolonas son un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos con acción bactericida.

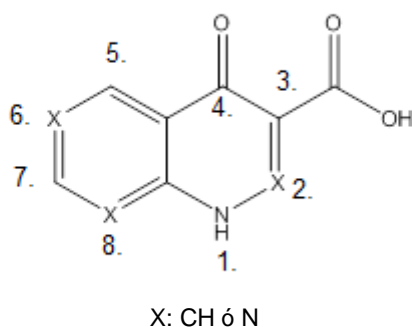


Figura I.1. Estructura general de las quinolonas

Estas moléculas tienen, como estructura básica, el ácido 4-quinolín, 3-carboxílico (4-quinolona) (Figura I.1.).

La primera de las quinolonas apareció en 1962, fue el ácido nalidíxico (AN) el cual era un compuesto intermediario de la síntesis del antipalúdico cloroquina (CLQ).

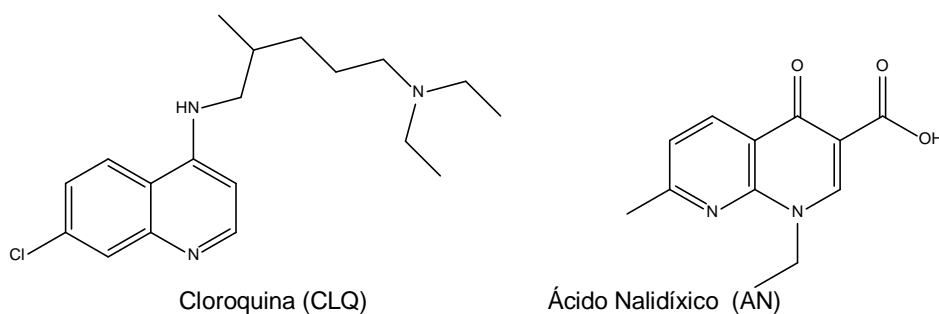
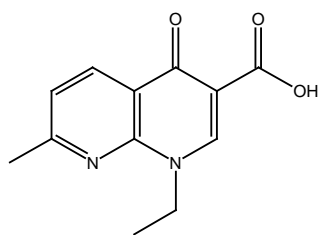


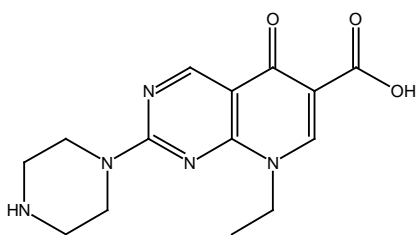
Figura I.2. Estructura de la Cloroquina (CLQ) y el Ácido nalidíxico (AN)

Dicho compuesto, de origen sintético (Figura I.2.), presentaba diversas aplicaciones clínicas limitadas en cuanto a la variedad de bacterias sobre las que podía actuar. Fue introducido en la práctica clínica en 1964, pero su utilidad resultó limitada, ya que sólo alcanzaba concentraciones terapéuticas en la orina por lo que se destinó al tratamiento de infecciones urinarias [1].

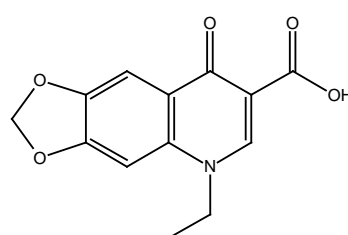
La introducción del anillo piperazínico en la posición 7 dio lugar al ácido pipemídico el cual mejoró su actividad frente a microorganismos gram(-) y a algunos gram-(+).



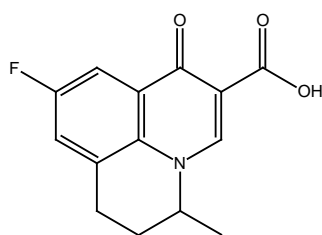
Ácido Nalidíxico (AN)



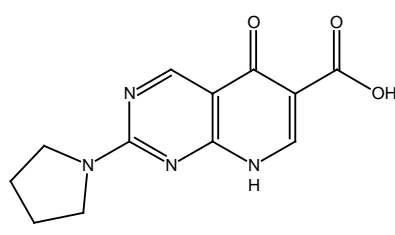
Ácido Pipemídico (APP)



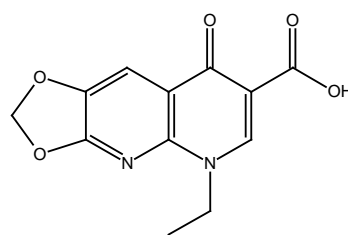
Ácido Oxolínico (AO)



Flumequina (FLU)



Ácido Piromídico (APR)



Cinoxacino (CNX)

Figura I.3. Quinolonas de primera generación

Así el anillo piperazínico, aumentaba el poder de penetración de la quinolona en la pared celular bacteriana, por lo que pequeñas modificaciones de AN dieron lugar a las denominadas quinolonas de primera generación (Figura I.3.) y fueron usadas hasta finales de los 70. A partir de esa década se comenzaron a realizar mayores cambios estructurales con la intención de aumentar su actividad y espectro de acción.

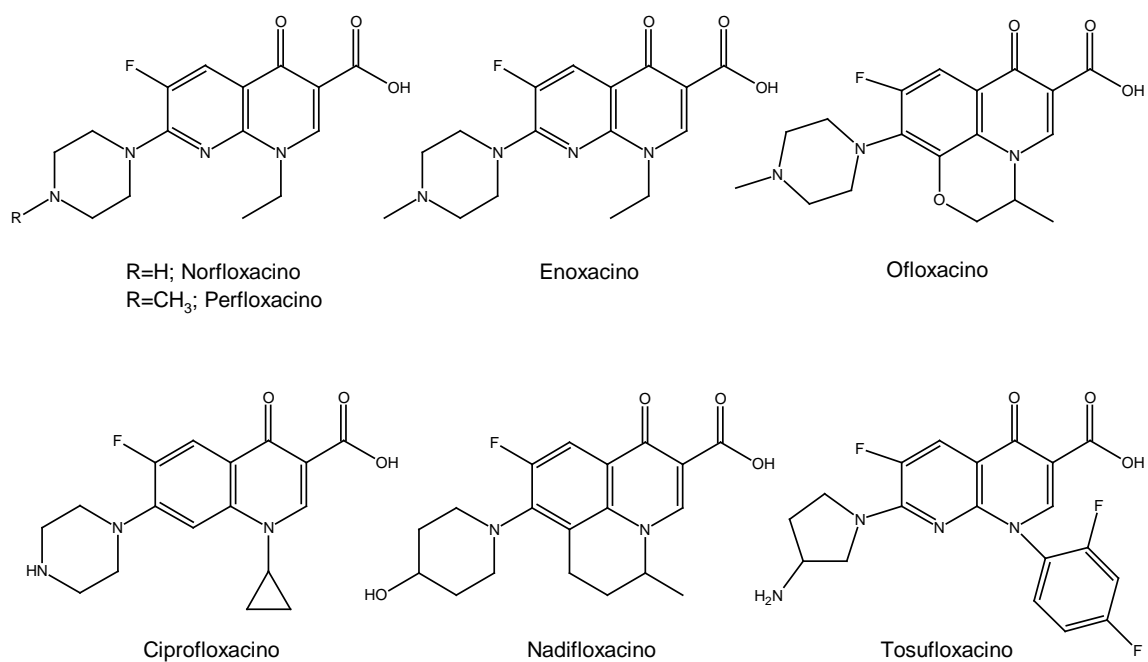
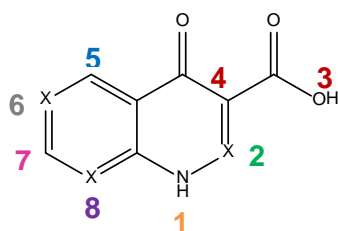


Figura I.4. Quinolonas de segunda generación (monofluoradas)

De estos estudios se obtuvo el norfloxacin (NFX) al combinar la adición del grupo piperazínico en la posición 7 con la adición de un átomo de flúor en la posición 6. De esta forma nacían las quinolonas de segunda generación o también llamadas fluoroquinolonas (FQ) (Figura I.4).

La diferencia estructural entre las FQ depende de los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8 respectivamente (Figura I.1.)










-  1. Influencia la potencia y la farmacocinética
-  2. Lugar que no altera las propiedades de la FQ
-  3,4. Esencial para la unión de las girasas y el transporte a través de la membrana
-  5. Aumenta la actividad contra los microorganismos gran (+) y gran (-)
-  6. X=C-F; controla la girasa y la potencia antibacteriana
-  7. Ejerce influencia sobre el espectro de acción, la potencia y la farmacocinética
-  8. Controla la farmacocinética

Figura I.5. Relación entre la estructura y las propiedades farmacológicas.

La relación entre la estructura química y la actividad biológica de estas moléculas ha motivado la síntesis de compuestos con diferentes sustituyentes en la estructura química base para así aumentar su eficacia, potencia y espectro de acción, además de disminuir sus efectos adversos (Figura I.5).

Posteriormente se han desarrollado quinolonas de tercera generación (compuestos bi o trifluorados) con mayor tiempo de vida media plasmática y superior potencia antibacteriana *in vitro* sobre microorganismos gran (+). Ahora existen también quinolonas de cuarta generación, que además poseen actividad anaerobica.

Todas ellas presentan alta tolerancia, por lo que están destinadas a ocupar un lugar importante en terapéutica antiinfecciosa, fundamentalmente en procesos graves o producidos por bacterias con resistencia a otros antibióticos.

El mayor inconveniente que presentan estas quinolonas es el desarrollo de resistencias a ellas por mutaciones cromosómicas de la topoisomerasa II (ADN-girasa) y topoisomerasa IV bacteriana.

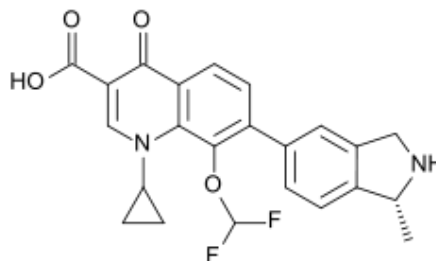


Figura I.6. Estructura de la Garenoxacina.

Sin embargo, actualmente se encuentra en desarrollo un nuevo grupo de quinolonas llamadas 6-desfluoroquinolonas por carecer del átomo de flúor en posición 6, que tienen la posibilidad de lograr una mejor actividad intrínseca como es el caso de la garenoxacina (Figura I.6.) que muestra una elevada actividad inhibitoria de la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, lo cual se asocia con un aumento de la actividad *in vitro*, un amplio espectro antimicrobiano y un reducido potencial para inducir el desarrollo de resistencia [2].

I.2. Mecanismo de acción de las Quinolonas

Las quinolonas son los únicos antibacterianos conocidos cuyas moléculas diana son las topoisomerasas bacterianas II (ADN-girasa) y IV. Estos enzimas mantienen el ADN en un estado adecuado de enrollamiento en las regiones cromosómicas con o sin actividad de replicación. De esta manera, las fluoroquinolonas inhiben la actividad de la ADN-girasa impidiendo la reparación del ADN y la recuperación de su forma superenrollada con lo que aumenta su volumen y detiene la multiplicación celular.

De un modo general, se acepta que la acción bactericida de las quinolonas se logra por la penetración del compuesto en el citoplasma celular donde el fármaco se asocia con la girasa del ADN (topoisomerasa II). Las FQ se ligan específicamente a las subunidades A de la girasa y excepcionalmente a la B y cuando esto ocurre quedan sin sellar dos roturas en el ADN.

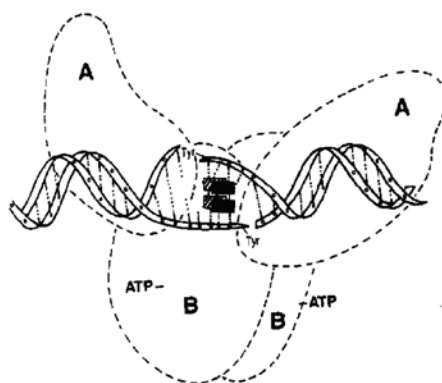


Figura I.7. Modelo de unión cooperativa entre el ADN y la quinolona en la inhibición de la ADN-Girasa.

Es conocido que cuando el ADN contiene interrupciones, estas pueden actuar como señales conductoras del proceso de exonucleosis. Una vez que las quinolonas se fijan a la girasa producen roturas en el ADN que se convierten en brechas permanentes de doble hebra lo cual da lugar a la inhibición de la síntesis de la replicación del ADN bacteriano (Figura I.7.) [2].

El mecanismo de acción de las quinolonas es a través de la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo (ADN-girasa)-ADN. Con la topoisomerasa IV forma complejos similares a los que se forma con la girasa.

I.3. Propiedades ácido-base en las fluoroquinolonas

El hecho de que en las FQ existan equilibrios ácido-base es debido a sus grupos amino y a los ácidos carboxílicos lo cual hace muy complejo su estudio. A través de numerosas técnicas como potenciometría, espectrofluorimetría, espectroscopía ultravioleta (UV) y resonancia magnética nuclear (RMN) se ha mostrado que el grupo carboxilato y la posición (4') del anillo piperazínico son los lugares de protonación más significativos [3].

La presencia del grupo carboxílico determina el que las fluoroquinolonas tengan un carácter ácido, mientras que la introducción de un grupo amino como el piperazinilo, incorpora carácter básico.

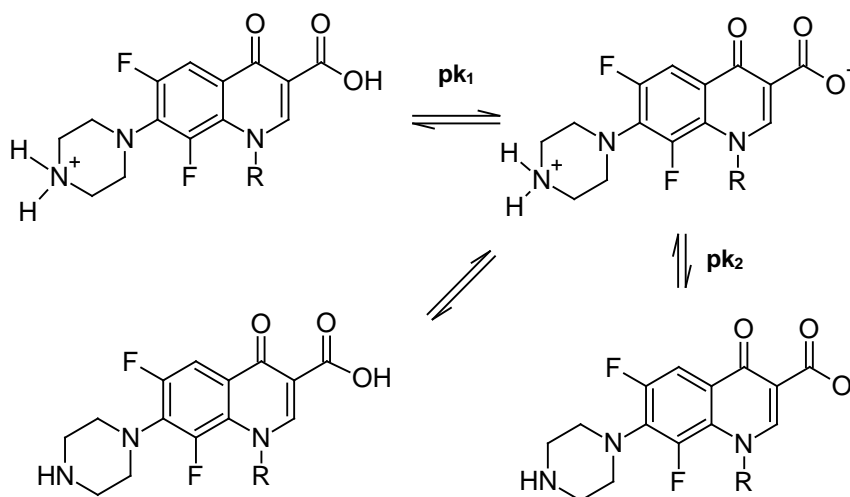


Figura I.8. Equilibrio ácido-base de fluoroquinolonas en función del pH.

Como consecuencia, en solución acuosa y en términos ácido-base las quinolonas de primera generación sólo pueden ser neutras o aniónicas mientras que las fluoroquinolonas con grupos amino como en el anillo piperazinilo presentan especies catiónica, zwitteriónica, aniónica y neutra (Figura I.8.).

Tabla I.1. Constantes de protonación de algunas de las fluoroquinolonas más comunes

Compuesto	pk ₁	pk ₂	Ref.
Pefloxacino (PFX)	6,02	7,8	[3]
Lomefloxacino (LFX)	5,47	8,78	[3]
Enoxacino (ENX)	6	8,5	[4]
Norfloxacino (NFX)	6,22	8,51	[5]
Rufloxacino (RFX)	5,9	8,4	[6]
Ofloxacino (OFX)	5,97	8,28	[7]
Flumequina (FLU)	~6	---	[8]
Ciprofloxacino (CPX)	6	8,8	[9]
Enrofloxacino (ENRFX)	6,2	8,72	[10]
Fleroxacino (FRX)	5,46	8	[11]
Ácido Nalidíxico (AN)	0,94		[12]

Los valores de las constantes de disociación (pK_a) para las quinolonas de primera generación se encuentran entre 6-6.9, mientras que en las fluoroquinolonas, los valores oscilan entre 5.5-6.6 y 7.2-8.9 para pK_1 y pK_2 respectivamente (Tabla I.1).

Es importante conocer estos pK_a en las quinolonas [3], ya que definen su grado de ionización a cualquier valor de pH. Este hecho es fundamental porque su absorción en el tránsito intestinal y su paso a través de las membranas biológicas dependen de la fracción de quinolona presente en un particular estado iónico. Asimismo, permiten entender fenómenos físicos tales como cambios en solubilidad o fluorescencia [4].

I.4. Propiedades fotosensibilizantes de las fluoroquinolonas

La exposición de un paciente a la luz solar en el curso de un tratamiento con alguna quinolona puede producir una reacción de fototoxicidad que se presentará en forma de eritema o de erupción más o menos grave. Se ha observado que las FQ más fototóxicas son las 6,8-dihalogenadas como lomefloxacino (LFX) y fleroxacino (FLX). Estudios *in vivo* e *in vitro* han puesto de manifiesto que estas moléculas además de ser fototóxicas son fotocarcinogénicas [13,14].

Con el objeto de dar explicación a estos efectos adversos, se han realizado un gran número de estudios fotofísicos, fotoquímicos y fotobiológicos sobre las FQ.

En general, aunque no se ha realizado ningún estudio sistemático con todas las FQ fototóxicas, se ha podido establecer mediante estudios *in vitro* que las FQ capaces de desencadenar reacciones de fototoxicidad en humanos pueden producir en mayor o menor medida daño a lípidos (fotoperoxidaciones lipídicas), proteínas (fotooxidaciones de aminoácidos, uniones covalentes fármaco-proteína) y al ADN (fragmentación del ADN por fotooxidaciones de alguna de sus bases y formación de dímeros de timina) [2,15].

I.4.1. Fenómenos de fototoxicidad y fotoalergia

Las fluoroquinolonas presentan una variedad de efectos secundarios que incluyen la fototoxicidad, las alteraciones dermatológicas y las tendinopatías [2, 16].

La fotosensibilidad a agentes exógenos es una reacción cutánea anormal, resultado de la combinación de una sustancia química, generalmente un metabolito de un fármaco administrado tópicamente, oral o parenteralmente y la exposición a radiaciones lumínicas apropiadas y suficientes. Estas radiaciones pueden ser naturales por el sol o artificiales por lámparas especialmente diseñadas para tal fin.

Existen algunos factores que pueden variar la mayor o menor frecuencia de esta fotosensibilidad como la edad del paciente, humedad, temperatura de la piel, espectro de acción, absorción de las radiaciones lumínicas, concentración de la sustancia en la piel o el tiempo entre la administración del fármaco y la exposición solar. Hay dos tipos de reacciones de fotosensibilidad, la fototóxica y la fotoalérgica:

- i. La reacción de fototoxicidad puede producirse en cualquier persona que recibe una sustancia química o fármaco en concentración y dosis suficiente y exposición a radiaciones apropiadas. Esta reacción aparece por lo general unas cuantas horas después de la exposición a las radiaciones lumínicas. La respuesta clínica es variable dependiendo de la sustancia y puede ser muy semejante a la quemadura solar, con sensación de ardor y formación de microvesículas o bien urticaria, cambios pigmentarios y onicolisis. Estas reacciones de fototoxicidad pueden ser causadas por agentes como alquitrán de hulla, psoralenos, perfumes, cosméticos y ciertos medicamentos como tetraciclinas, sulfas, sulfonilureas, fenotiazinas, furosemida, griseofulvina, ácido nalidíxico, colorantes, antiarrítmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Se requiere un espectro de acción lumínico de UVA, ocasionalmente luz visible y raramente UVB.
- ii. La reacción de fotoalergia es el resultado de una respuesta inmunológica a un antígeno (hapteno) producido en la piel al exponerse una sustancia fotosensibilizante a radiaciones solares. Esta reacción, en contraste con la fototóxica se presenta sólo en algunas personas. En estos procesos es necesario una fase de inducción de una a dos semanas y se produce con muy baja energía lumínica y menor dosis de la sustancia [17].

I.5. Fotofísica de fluoroquinolonas

En términos generales, la fotofísica estudia la interacción de la radiación ultravioleta (UV) y visible con la materia que da lugar a efectos físicos tales como la emisión de fluorescencia o fosforescencia. Las distintas técnicas fotofísicas son en realidad distintos métodos de análisis de los estados excitados de compuestos que contienen cromóforos. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental a un estado de mayor energía (estado excitado). Sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o

bandas) que la distingue del resto de moléculas. La absorción a distintas longitudes de onda que presenta una molécula, su espectro de absorción, constituye una señal de identidad de la misma. Las moléculas en sus formas excitadas pueden liberar la energía absorbida pasando a su estado energético fundamental de nuevo [18-20].

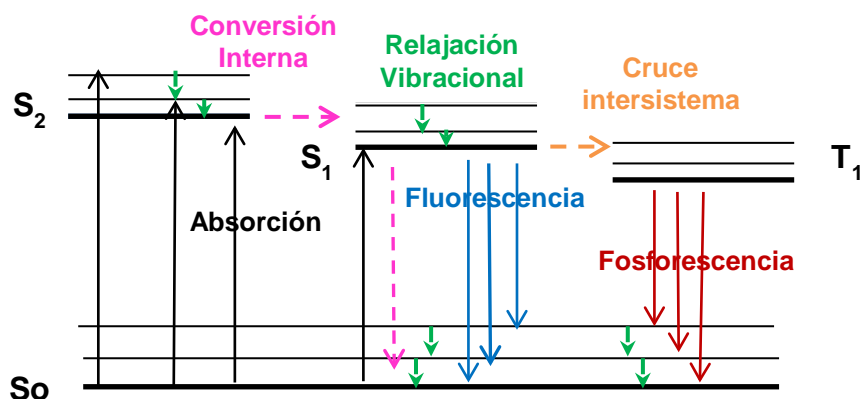


Figura I.9. Diagrama simplificado de Jablonski en el que se representan los niveles de energía y los procesos que pueden ocurrir a partir de la absorción de la luz.

Cuando las moléculas absorben la radiación incidente a una longitud de onda adecuada, alcanzan un estado electrónicamente excitado que regresa al estado inicial por distintas vías o mecanismos entre los que cabe destacar la emisión de radiación desde su estado singlete (fluorescencia) y desde el triplete (fosforescencia). (Figura I.9.)

Los procesos más importantes que pueden producirse se muestran en el diagrama de Jablonski (Figura I.9.).

También podemos observar intervalos de tiempos de los principales procesos fotofísicos tal y como se muestra en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos

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

Las pequeñas variaciones en la posición e intensidad de las bandas se deben a cambios en la estructura, por lo que el análisis de estas variaciones pueden ayudar a comprender las propiedades fotofísicas de las moléculas en entornos biológicos y a determinar correctamente la correlación entre las características estructurales y el daño fotoquímico en un medio biológico.

I.5.1. Espectros de absorción de las fluoroquinolonas

Los espectros de absorción de las FQ varían en función del pH. En ellas se observa un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas y por lo tanto de mayor energía) a pH ácidos y uno batocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda más largas) a pH básicos.

Al pasar de condiciones ácidas a básicas, la banda de longitud de onda larga (λ ca, 330 nm.) de las FQ se desplaza hacia longitudes de onda mayores aumentando su intensidad, mientras que la banda a longitud de onda corta (λ ca, 270 nm.) se desplaza hacia longitudes de onda menores y su intensidad disminuye [5].

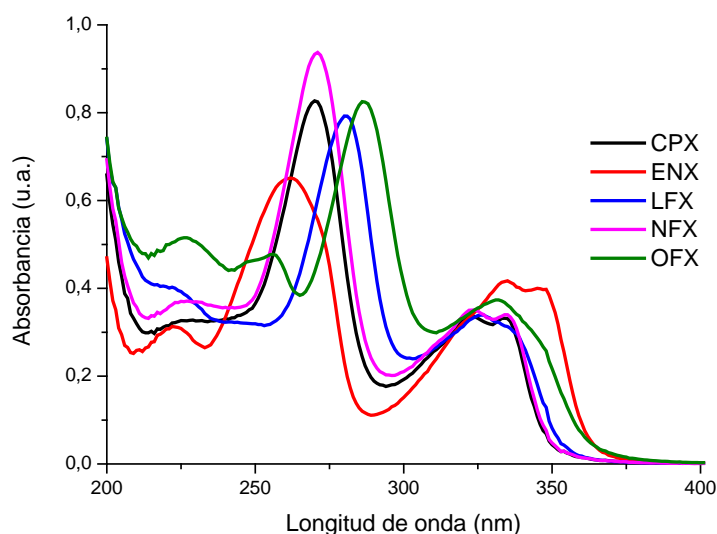


Figura I.10. Espectros de absorción de CPX, ENX, LFX, NFX, OFX en tampón fosfato (PB) 1mM, pH 7.4

En medio acuoso neutro, en el que las FQ principalmente se encuentran en su forma zwitteriónica, el espectro de absorción se caracteriza por una banda intensa en la región de 260-280 nm con un valor de coeficiente de absorción molar (ϵ) de $\epsilon_{\text{máx}}$ ca. $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y por una banda menos intensa hacia 320-340 nm con un $\epsilon_{\text{máx}}$ ca. $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y una cola de absorción débil que se extiende hasta los 380 nm aproximadamente. Las pequeñas variaciones en la posición y la intensidad de las

bandas se deben a sus variaciones estructurales, como en el caso de OFX y ENX que poseen anillos aromáticos más ricos en electrones y por lo tanto espectros de absorción a longitudes de onda más altas, tal y como se muestra en la Figura I.10. [5, 21].

I.5.2. Fluorescencia de las fluoroquinolonas

Generalizando, podemos decir que las FQ sólo presentan una fluorescencia significativa en medios neutro y ácido, siendo prácticamente inexistente en medio básico.

En medios biológicos donde el pH es aproximadamente neutro, los espectros de emisión de las FQ presentan un gran desplazamiento de Stokes (diferencia de energía entre los máximos de emisión y absorción). Este hecho se ha atribuido bien a la existencia de un estado prohibido S_1 oculto bajo la primera transición permitida, o bien a un cambio en la geometría del anillo piperazínico que pueda volver a la planaridad en el estado excitado debido a una variación en el momento dipolar [5, 21]. Así se propuso que una transferencia de carga intramolecular favorecida por el medio polar, podría ocurrir en el estado excitado de la forma zwitteriónica desde el par solitario $1'-N$ como donador al sistema aromático, donde el $-F-$ en el carbono 6, y el $-O-$ en la cetona pueden actuar como electrón aceptores.

Tabla I.3. Efecto del tampón fosfato (PB) sobre las propiedades de fluorescencia de las FQ en medio acuoso (pH 7.2-7.4) [21]

Compuesto	Medio	λ_f / nm	ϕ_f	τ_f / ns
NFX	H ₂ O	436	0.16	2.3
	PB 0.01 M	410	0.11	1.5
	PB 0.1 M	410	0.075	1.4
ENX	PB 0.01 M	380	0.01	< 0.5
OFX	H ₂ O	475	0.2	5.86
	PB 0.01 M	460	0.1	4.0
LFX	H ₂ O	--	--	1.5
	PB 0.01 M	--	--	1.0
	PB 0.1 M	415	0.08	0.91
FLU	H ₂ O	375	0.034	0.73

Dependiendo de la estructura molecular de cada FQ en medio neutro los máximos en las bandas de emisión pueden encontrarse entre 380 y 470 nm. En disolución acuosa donde predomina la forma zwitteriónica (Figura I.8.) se observan rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) entre 0.2-0.02 mientras que en disolventes orgánicos donde predomina la forma neutra no se aprecia prácticamente emisión [23].

En cuanto a los tiempos de vida de fluorescencia (τ_f), son relativamente cortos y varían desde < 0.5 ns para ENX hasta los 4.5 ns para RFX en un medio acuoso tamponado con 0.01 M PB (Tabla I.3.)

Dentro del estudio de fluorescencia es de destacar el efecto de las sales inorgánicas. En general, las quinolonas al poseer un grupo carboxilato tienen capacidad de formar complejos con sales inorgánicas. El carbonilo adyacente al carboxilato ejerce un efecto quelante en virtud de su capacidad de extraer densidad electrónica. Así las FQ en presencia de iones metálicos como el aluminio (III), magnesio (II), hierro (II, III) usualmente conllevan la formación de complejos metálicos insolubles en agua que pueden interferir con los niveles óptimos de concentración en sangre de la quinolona.

La presencia de cationes en el medio acuoso también tiene importancia en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las FQ. De hecho la presencia de sales disueltas influye tanto en el estado fundamental de la FQ como en los estados excitados [24].

En el caso de la interacción con aniones, podemos decir que existen resultados contradictorios en cuanto a la influencia que ejercen los aniones fosfato sobre la intensidad de la fluorescencia de la FQ. Así, Fasani y cols. no observaron desactivación del estado singlete [25] de FQ como NFX, ENX, LFX y OFX por estos aniones, mientras que estos mismos autores años después, detectaron que la intensidad de fluorescencia de NFX, ENX y LFX a pH neutro depende ligeramente de la concentración de sales disueltas tales como sulfito, cloruro o hidrogenocarbonato y en mucha mayor medida de la de los iones fosfato [23].

En este contexto, se ha observado que la fluorescencia de las FQ disminuye al aumentar la concentración de tampón fosfato (relación Stern-Volmer):

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

En donde I_{F0} e I_F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del desactivador (Q) respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la

concentración del desactivador, k_q es la constante bimolecular de desactivación y τ_0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

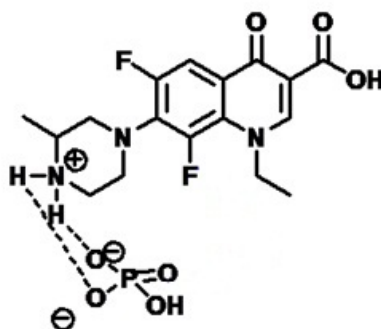


Figura I.11. Asociación electrostática entre el tampón fosfato y la LFX.

Sin embargo, en presencia del tampón fosfato, se han observado pocos cambios en los tiempos de vida de fluorescencia de las FQ. De acuerdo con esto, la desactivación debe ser mayoritariamente estática y podría deberse a una interacción entre el fosfato con el estado fundamental de las FQ. Se ha propuesto una asociación electrostática entre el anión difosfato y el grupo 4'-NH₂ cargado positivamente, a través de dos enlaces de hidrógeno, tal y como se muestra en la Figura I.11. [21].

I.5.3. Fotoionización

Al excitar una molécula esta puede liberar un electrón, que se hidrata *ca.* 10^{-12} s. Estos electrones, que se detectan mediante la técnica de fotólisis de destello láser, presentan un espectro de absorción que consiste en una banda ancha no estructurada con un máximo llano comprendido entre 700 y 800 nm [26].

La mayoría de las FQ son capaces de generar electrones hidratados [23, 27, 28], pero los rendimientos cuánticos obtenidos para las distintas FQ estudiadas no son siempre concordantes. Esto es debido a que parte de la formación de los electrones solvatados detectados se produce a través de un proceso monofotónico y otra parte a través de uno bifotónico [27, 28].

I.5.4. Fosforescencia

Desde el estado excitado triplete de las FQ se han registrado espectros de emisión de fosforescencia a baja temperatura. Son bandas anchas y desestructuradas con máximos en torno a los 500 nm para el caso de NFX y en torno a 450 nm para ENX. De ellos se ha estimado que la energía de los estados excitados triplete (E_T) de las FQ se encuentra en el rango de los 260-280 kJ mol⁻¹ [4].

I.5.5. Espectros de absorción del estado excitado triplete

Mediante la técnica de fotólisis de destello láser (FDL), se han estudiado los estados triplete de las FQ. Por lo general sus espectros de absorción muestran una banda ancha centrada en el intervalo 500-650 nm, con coeficientes de absorción molar ($\epsilon_{T,m\acute{a}x}$) ca. 4000-14000 $M^{-1}cm^{-1}$, como en otros casos, dependiendo de la estructura molecular (Tabla I.3) [5, 7, 8, 9, 23, 27, 29]. Los valores de rendimiento cuántico de formación de triplete (ϕ_T) y de ϵ_T de algunas FQ son discrepantes, lo cual podría deberse a los diferentes métodos que se han usado para calcularlos.

Para la FLU, que no contiene el anillo piperazínico, se sabe que presenta una gran eficiencia de cruce intersistema (CIS) con un valor de rendimiento cuántico de triplete (ϕ_T) de 0.9 [8]. Sin embargo, otras FQ presentan una eficiencia menor de formación de triplete.

Tabla I.3. Propiedades de los estados excitados triplete de las FQ en sus formas neutras (PB = tampón fosfato, pH 7.2-7.4).

Compuesto	Medio	$\lambda_{m\acute{a}x}^{T-T} / nm$	ϕ_T	$\epsilon_T / M^{-1}cm^{-1}$	$\tau_T / \mu s$	Ref.
NFX	NaHCO ₃ (1 mM)	620	≥ 0.5	3400	1.3	[23]
ENX	NaHCO ₃ (1 mM)	520	≥ 0.5	1750	0.85	[23]
	PB (0.01 M)	520	0.85	3500	0.09	[4]
RFX	PB (0.01 M)	640	0.7	2800	10 ^a	[6]
		640	≥ 0.4	2730	--	[23]
OFX	PB (0.01 M)	620	0.3	2300	1.8	[27]
		610	≥ 0.3	3600	40	[23]
LFX	NaHCO ₃ (1 mM)	500	≥ 0.2	900	~ 0.1	[29]
CPX	NaHCO ₃ (1 mM)	610	--	--	1.5	[8]
FLU	H ₂ O pH 9.2	575	0.9	12600	~10	[30]
AN	NaHCO ₃ (1 mM)	620	≥ 0.6	5400	~100	[25]

De acuerdo con la bibliografía, existen discrepancias en torno a cuál es el valor correcto de ϕ_T . Así, para el caso de ENX (ϕ_T de 0.5 ó 0.85) [13, 24] o en el caso de RFX (ϕ_T de 0.3 ó 0.7) [8, 24] (Tabla I.3.).

En general los tiempos de vida de los tripletes (τ_T) dependen mucho de las condiciones experimentales.

Así en experimentos de fotólisis de destello láser, pueden darse aniquilaciones triplete-triplete o triplete-estado fundamental y por tanto entran en juego nuevos factores [8, 30, 31].

Cuando se aplicó la técnica de FDL a disoluciones acuosas de quinolonas monohalogenadas (ENX, NFX) y dihalogenadas (LFX, rivaroxabán (BAY)) se observaron diferencias importantes entre ellas. Así, se detectaban los estados excitados triplete de las monohalogenadas mientras que para LFX y BAY solo era posible detectar cationes arilo.

I.5.6. Reactividad de los estados excitados triplete de FQ

Las reacciones típicas que pueden darse con oxígeno son:

- Transferencia de energía con formación de oxígeno singlete:



- Transferencia electrónica para formar un anión superóxido:



- Desactivación física:

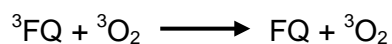


Tabla I.4. Rendimientos cuánticos de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) y constantes de velocidad de la reacción de $^1\text{O}_2$ (k_q) con el estado fundamental de las FQ.

Compuesto	Φ_{Δ}	$k_q/10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Ref.
NFX	0.081	1.8 ± 0.1	[32]
PFX	0.045	12 ± 1	[32]
ENX	0.061	1.4 ± 0.2	[32]
RFX	0.32	--	[6]
OFX	0.076	5.6 ± 0.6	[32]
	0.13	--	[27]
LFX	0.072	18 ± 3	[32]
FRX	0.029	6.9 ± 0.7	[32]
CPX	0.092	5.2 ± 0.2	[32]
FLU	0.34	3.4	[32]

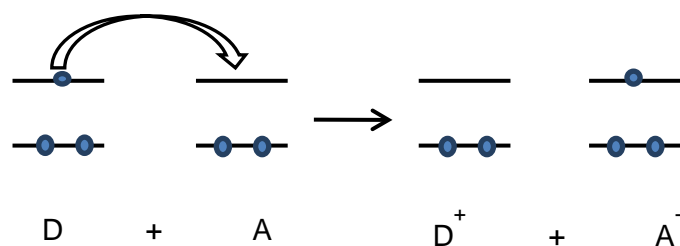
En el caso de la interacción entre el estado excitado triplete de la fluoroquinolona con el oxígeno, se sabe que el cromóforo de la fluoroquinolona reacciona con el oxígeno mayoritariamente por transferencia de energía para generar oxígeno en su estado singlete [31].

También se ha observado cómo las FQ en el estado fundamental reaccionan con el oxígeno singlete que ellas mismas generan (Tabla I.4.).

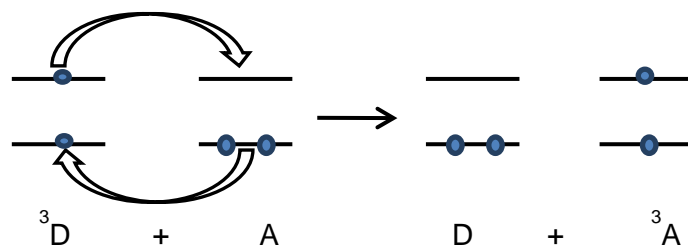
La mayoría de las FQ que presentan el anillo piperazínico parecen tener un rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2 < 0.1$ a pH neutro. De acuerdo con esto, no parece que la fototoxicidad de las FQ pueda deberse a la generación de especies reactivas de oxígeno, ya que a excepción de RFX y FLU todas las demás FQ presentan un rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete muy bajo. (Tabla I.4.)

Existen otras moléculas capaces de desactivar los estados triplete de las FQ, bien por transferencia electrónica (ejemplo a) o por transferencia de energía (ejemplo b) mediante el mecanismo de intercambio electrónico:

a) Esquema general del proceso de transferencia electrónica:



b) Esquema general del proceso de transferencia de energía triplete:



I.6. Fotoquímica de las fluoroquinolonas

Las FQ son fotolábiles. Así cambios en la estructura química base nos permite variar no solo su eficacia y su potencia farmacológica sino aumentar o disminuir su fotoestabilidad y por consiguiente sus efectos adversos (ver Figura I.5 y tabla I.5.).

La fotodegradación de las FQ en medio neutro y acuoso da lugar a la pérdida de un átomo de flúor. Chignell y cols. [32] describieron por primera vez estas fotodeshalogenaciones en un estudio que realizaron sobre FQ monofluoradas (NFX, CPX, ENX) y difluoradas (LFX, FRX). Observaron que la LFX era la FQ con mayor velocidad media de liberación de F⁻ y estimaron un valor de rendimiento de degradación de 0.98 [5].

Tabla I.5. Rendimientos cuánticos de fotodegradación y liberación de anión fluoruro tras irradiación de LFX, ENX, NFX, CPX y OFX [6, 22,24, 29, 33].

Compuesto	Argón		Aire	
	Φ_{deg}	% -F ⁻	Φ_{deg}	% -F ⁻
LFX	0.55/0,98	100	0.49	100
ENX	0.13	99	0.08	100
NFX	0.06	100	0.01	98
CPX	0.07	82	--	--
OFX	0.0012	80	0.0016	87

Otros autores posteriormente han estimado un rendimiento de solo 0.55 [33]. Sin embargo todos coinciden con que el rendimiento de fotodegradación de las FQ monohalogenadas es mucho más bajo, siendo de 0.1 para ENX que es menor que para el resto (Tabla I.5).

La fotodegradación de las 6-monofluoroquinolonas ha sido claramente establecida ya que disminuye en presencia de oxígeno (Tabla I.5).

Se han conseguido aislar los fotoproductos resultantes de irradiar FQ en agua (particularmente ENX, NFX, CPX), de forma que se produce una fotosustitución del fluoruro por un anión hidróxido generándose los derivados 6-hidroxiquinolónicos [29].

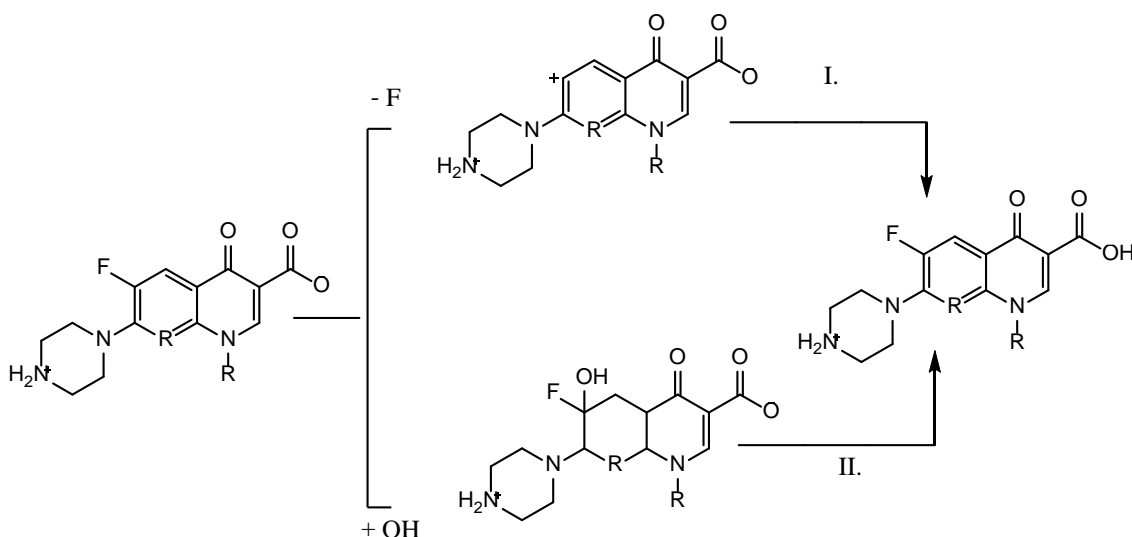
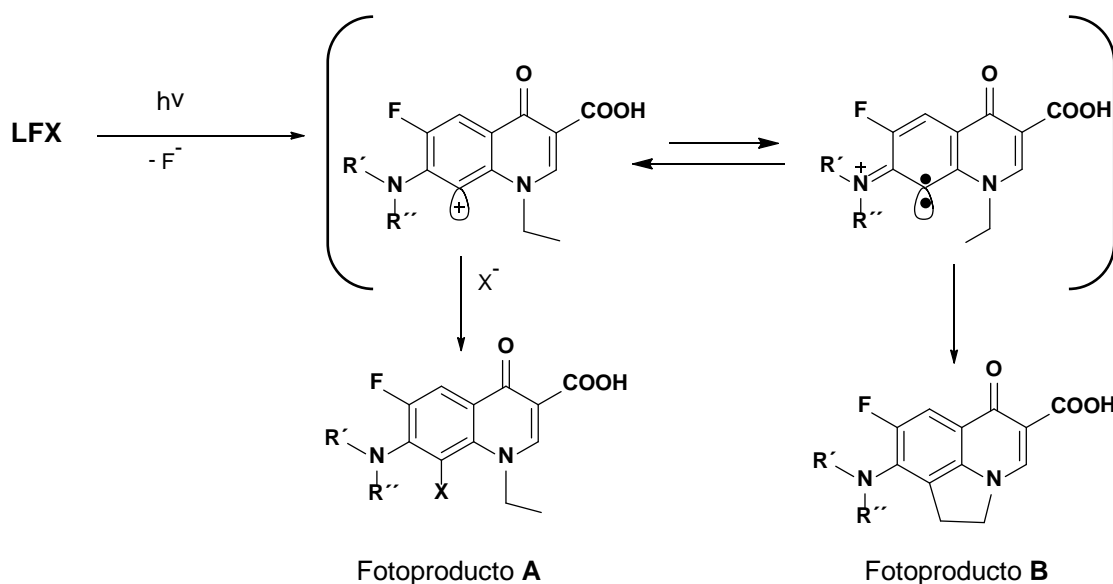


Figura I.12. Posibles mecanismos de fotosustitución para las 6-monofluoroquinolonas.

Esta fotorreacción que podría tener lugar a través de la fragmentación heterolítica unimolecular del enlace C-F en el estado excitado ó a través de una adición nucleofílica seguida por pérdida de anión flúor. Estudios con un derivado N-acetilado de Norfloxacinó demostraron que el camino II de la Figura I.12. será el correcto [29].

También es de destacar que con experimentos de fotólisis de destello láser se ha observado que el triplete de las FQ se desactiva por la presencia de sales como HPO_4^{2-} lo cual produce una disminución en la fotodegradación de las FQ monohalogenadas. Sin embargo no parece claro qué ocurre en estas reacciones.

En cuanto a las FQ dihalogenadas el mecanismo de fotodegradación que se propuso para LFX se muestra en el Esquema I.1. Las especies de tiempo de vida media corta observadas fueron asignadas por unos autores a un catión arílico singlete estabilizado, ya que éste no reaccionaba con oxígeno (reacción típica de los estados excitados triplete de las FQ) y sí que lo podría hacer con especies nucleófilas (cloruros, bromuros) [34]. Sin embargo otros autores mediante cálculos teóricos, decían que tenía que ser un carbeno triplete [32, 33].



Esquema I.1. Fotodegradación de LFX en medio acuoso tamponado a pH 7.2-7.4, siendo X= Cl, Br.

De cualquier forma la presencia de aniones en disoluciones acuosas tamponadas hace que el proceso de fotodegradación de LFX se obtenga el fotoproducto A, mientras que en su ausencia se forme el fotoproducto B. Este último por reacción intramolecular entre el anillo carbeno y el etilo de la posición 1 del propio anillo (Esquema I.1.)

De esta forma la principal vía de fotodegradación de LFX en agua es a través del carbeno [32, 33].

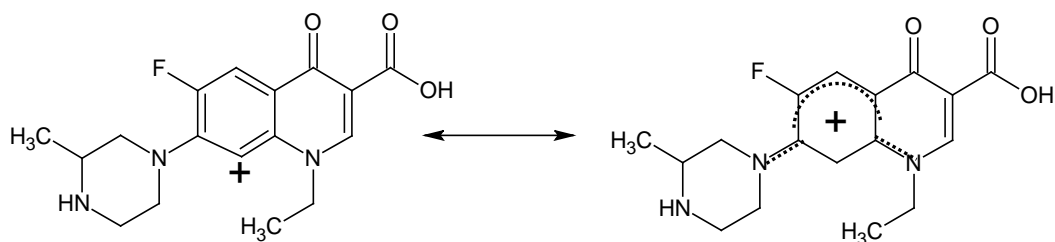


Figura I.13. Estructura mesomérica del catión arilo formado en la degradación de LFX.

De acuerdo con el Esquema I.1., tras la excitación, LFX alcanzaría un estado excitado desde donde se produciría la heterólisis del enlace C-F en posición 8 con la consiguiente formación de un carbeno en equilibrio con su catión arilo en C-8. Esta ruptura del enlace C-F en posición 8 se ve muy favorecida por la estabilización mesomérica del catión que se forma en este caso (Figura I.13.)

Se ha propuesto que la generación de estos intermedios en las proximidades de una molécula de ADN podría dar lugar a la formación de enlaces covalentes con el ácido nucléico, lo cual podría explicar la alta fotomutagenicidad y fotocarcinogenicidad de LFX.

Por todo ello la fotodegradación de las FQ se produce principalmente desde el estado triplete de las FQ monohalogenadas; sin embargo no hay pruebas definitivas de ello en las FQ dihalogenadas y por lo tanto es un punto básico a esclarecer en la presente tesis.

I.7. Daño fotoinducido a biomoléculas

I.7.1. Radiación solar

El sol es una central termonuclear que produce una gran radiación electromagnética, aunque sólo llegan a la superficie de la tierra longitudes de onda comprendidas entre los 290 y 5000 nm, gracias a que la capa de ozono estratosférica detiene las radiaciones más peligrosas (UV-C). La energía radiante está constituida por un 56% de rayos infrarrojos (800 nm - 5000 nm), 39% de luz visible (400 nm - 800 nm) y 5% de radiación ultravioleta o UV (290 nm - 400 nm). Estos últimos divididos en:

- i. UVA (320-400 nm) que constituyen el 98% de los rayos UV atraviesan el vidrio y penetran hasta la epidermis, pero su energía decrece en función de la longitud de onda. Existe una UVA larga o UVA I (340-400 nm) y una corta o UVA II (320-340 nm).
- ii. UVB (290-320 nm), que representan el 2% de los rayos UV tienen una energía altísima y son detenidos por el vidrio y la epidermis.
- iii. UVC (100-280nm) que es absorbida por la capa de ozono y no alcanza a la tierra. De gran energía y capacidad destructiva. Se emplea artificialmente para esterilización [35, 36].

Las proteínas y los ácidos nucleicos pueden absorber directamente la radiación UVB que se la considera más perjudicial. Sin embargo, la UVA puede resultar peligrosa cuando existe un segundo tipo de moléculas llamadas fotosensibilizadores que tras absorber luz, son capaces de modificar biomoléculas. Así, la fotosensibilización la podemos definir como el proceso por el cual la combinación de la luz con agentes exógenos produce reacciones anormales en los sistemas biológicos.

I.7.2. Mecanismo de fotosensibilización

Las especies transitorias generadas por la interacción fármaco-luz (estados excitados singlete y triplete así como otros intermedios reactivos) pueden interaccionar con las biomoléculas a través de dos mecanismos [37]:

- i. Tipo I: el fármaco desde sus estados excitados o desde otros intermedios reactivos pueden generar procesos de transferencia de carga, hidrógeno o energía con las biomoléculas ocasionando diferentes tipos de lesiones donde el oxígeno también puede participar de una forma indirecta.
- ii. Tipo II: se produce una transferencia de energía desde el estado excitado del fármaco al oxígeno molecular, generándose oxígeno singlete (1O_2). Éste agente oxidante reacciona con numerosas moléculas biológicas. Este proceso tendrá lugar cuando la energía del estado excitado de la molécula sea mayor que la del oxígeno singlete y cuando su tiempo de vida sea suficientemente largo para poder reaccionar.

I.7.3. Interacción fármaco-proteína

El conocimiento de las interacciones fármaco/proteína es fundamental para comprender la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo.

Generalmente, las interacciones más significativas que tienen lugar entre un sustrato y los aminoácidos del centro activo de la proteína son de naturaleza iónica, por enlaces de hidrógeno o tipo van der Waals.



Figura I.14. Esquema de la unión encima-sustrato

Las proteínas pueden interactuar con una gran variedad de sustratos, como iones metálicos, vitaminas, ácidos grasos, fármacos, etc. Aquellas que son susceptibles de interactuar con fármacos forman parte de las denominadas dianas farmacológicas. Entre ellas se encuentran algunas enzimas y las proteínas transportadoras. En la Figura I.14. se muestra de forma esquemática la interacción entre un sustrato y el sitio de unión de la proteína.

Las proteínas transportadoras son aquellas que proporcionan un medio de transporte, bien en el plasma o a través de la membrana celular, a aquellos sustratos que interactúan en el centro activo de ésta. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden citar las lipoproteínas (que son las encargadas de transportar las grasas por todo el organismo), las albúminas séricas (AS), que son proteínas plasmáticas que actúan como vehículo de diversos agentes tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas) como exógenos (fármacos) y la α -glicoproteína ácida 6 que, entre otras funciones, se encarga del transporte de fármacos básicos o neutros por el organismo [38-42].

I.7.4. Interacción fármaco-ADN

Existen moléculas pequeñas capaces de interactuar con el ADN y pueden hacerlo a través de diversos mecanismos.

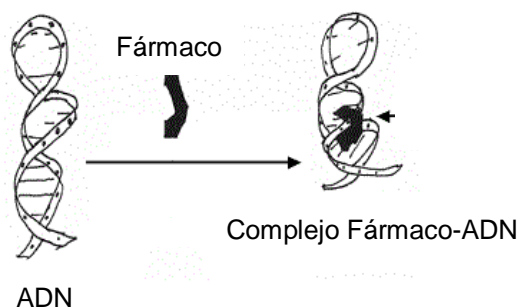


Figura I.15. Modelo de unión fármaco-ADN

El conocimiento de cómo y dónde se produce y la especificidad que presentan, constituye uno de los objetivos principales para el posterior diseño de agentes más afines y más selectivos (Figura I.15.)

Una clasificación muy básica consiste en distinguir interacciones reversibles e interacciones irreversibles. Se entiende como interacción reversible aquella en la que el ligando se une al ADN en unas condiciones determinadas, que si cambian, pueden hacer que el ligando deje de unirse. Estas interacciones son conocidas también como interacciones no enlazantes y son propias de los fármacos que poseen como diana la molécula de ADN.

Dentro de las interacciones reversibles se pueden encontrar varios subtipos como son:

- i) Agentes intercalantes: ligandos que se disponen apilados entre los pares de bases, sus interacciones con las bases nitrogenadas son de tipo electrostático o de van der Waals y en ocasiones mediante la formación de enlaces de hidrógeno [43].
- ii) Agentes que se unen a un surco: la disposición en doble hélice de las cadenas de ADN hace que se formen unas hendiduras a lo largo del exterior de la hélice donde residen los grupos fosfato de los nucleótidos que son conocidas según su amplitud. Así, se habla de surco mayor y de surco menor. Estos surcos, debido a su diferente estructura, muestran preferencia por determinados ligandos [44].

- iii) Rompedores de hebra: Este tipo de agentes interactúan con el ADN de forma que una parte de su estructura es capaz de unirse reversiblemente al ADN, mientras que otra formará radicales libres que rompen la doble hélice imposibilitando su replicación [45, 46].

Las interacciones irreversibles, son también conocidas como interacciones enlazantes. En ellas se forma un enlace que une ambas moléculas el cual no se puede deshacer. Este tipo de interacciones son propias de los gases de guerra y algunos antitumorales como el Cisplatino [47].

Los distintos tipos de interacción ligando-ADN se pueden caracterizar mediante diversas técnicas experimentales que se detallan a continuación:

- i) Técnicas fotofísicas: Un compuesto, al unirse al ADN, modifica su espectro de absorción, ya que sufre modificaciones en su estructura electrónica. En el espectro de absorción se producen desplazamientos en los máximos con respecto al ligando libre. Éste puede ser por desplazamiento a longitudes de onda mayores, efecto batocrómico, junto con una disminución de los coeficientes de extinción molar, efecto hipocrómico. Estos cambios espectrales permiten conocer aspectos como la estequiometría del complejo ligando-ADN y el tamaño del sitio de unión. En un equilibrio químico en el que sólo una especie absorbe, aplicando la ley de Lambert-Beer, se puede determinar la constante de equilibrio midiendo la absorbancia o la emisión como una función de la concentración, eso sí, la relación entre la absorbancia o fluorescencia y la concentración debe ser lineal en los rangos de concentración utilizados en el ensayo. Se pueden conocer el número de sitios de unión realizando estudios de equilibrio de unión y utilizando métodos de titración. Esto consiste en que una disolución de ligando de concentración conocida es transferida a una cubeta con temperatura controlada y el cambio progresivo de absorbancia y fluorescencia se recoge después de la adición de una serie de alícuotas de ADN. La adición de ADN a la disolución del ligando da lugar a un cambio en la absorbancia y de fluorescencia que variará en función del comportamiento óptico del compuesto analizado. Uno de los métodos empleados para la dilucidación de la estequiometría de la unión es el método de variación continua sugerido por Job [48] en 1980 y desarrollado posteriormente por Likussar y Boltz [49], así como por Cantor y Schimmel [50]. Este método consiste en realizar medidas ópticas, tanto de absorción como de fluorescencia, de disoluciones donde las concentraciones del ADN y del

ligando se van variando pero la suma de las concentraciones de ambos permanece constante. El cambio de absorbancia o fluorescencia se representa frente a la fracción molar del ligando y se observa una inflexión que nos va a proporcionar información relativa a la estequiometría del proceso. En la mayoría de los casos, los resultados se ajustan al modelo de McGhee-VonHippel [51, 52]. Por tanto, la utilización de espectrometría UV/VIS permite conocer aspectos como la estequiometría del complejo ligando-ADN y el tamaño del sitio de unión. La extensión de estas técnicas permite además definir la especificidad por una determinada secuencia y la constante de asociación. Sin embargo, no dan información sobre el tipo de unión.

- ii) Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Los métodos de RMN nos proporcionan información sobre el grado y el tipo de interacción entre el ligando y el ADN, mediante la comparación de los espectros de resonancia de los oligonucleótidos libres, los ligandos libres y los complejos formados por cada oligonucleótido y el ligando. Aunque los métodos cristalográficos son las que aportan una mayor cantidad de estructuras resueltas [53] la resonancia magnética nuclear permite una determinación estructural en disolución. En la actualidad, entre el 15 y el 20% de las estructuras tridimensionales conocidas han sido determinadas por resonancia magnética nuclear.

El primer paso para cualquier estudio de RMN es la asignación de las señales a cada átomo y este suele ser el paso limitante de toda la operación. La sustitución selectiva de protones por deuterio puede acelerar este proceso, ya que evitaríamos solapamiento de señales. La RMN se puede aplicar al estudio de dobles y triples hélices tanto de ADN como de ARN, complejos entre ligandos- ADN y entre proteínas-ADN.

Entre los métodos teóricos utilizados hoy en día para el estudio de interacciones fármaco-receptor se incluyen las minimizaciones de energía (ME), las simulaciones de dinámica molecular (DM), las simulaciones de Monte Carlo (MC), y las perturbaciones de la energía libre [54]. A pesar de que los métodos teóricos todavía está en fase de desarrollo, se han conseguido obtener imágenes excelentes de ADN sencillo, tanto libre como unido a un ligando un corto espacio de tiempo. Esta técnica presenta la ventaja de poder trabajar con muestras en vacío, en disolución, en el mismo aire ambiental, a temperaturas altas o criogénicas [55].

I.8. Daño a biomoléculas fotoinducido por fluoroquinolonas

Aunque se conoce que existen fotoreacciones entre fluoroquinolonas (FQ) y biomoléculas, todavía no se ha podido establecer claramente los mecanismos que intervienen en cada FQ. Esto se debe a que pequeñas variaciones estructurales en las fluoroquinolonas también parecen modificar enormemente sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas [21]. Los procesos que pueden intervenir en el desencadenamiento de una reacción de fotosensibilización producida por FQ son:

- i. La generación de oxígeno singlete por transferencia de energía desde el estado excitado triplete de las fluoroquinolonas. Este es uno de los mecanismos de reacción que puede participar en la oxidación de las biomoléculas.
- ii. La formación de especies radicalarias en el proceso de fotodegradación de las fluoroquinolonas puede dar lugar a procesos de oxidación de las moléculas y/o uniones covalentes entre el fármaco y las biomoléculas. La transferencia de energía desde el estado excitado triplete de la FQ a una timina del ADN da lugar a la formación de dímeros de timina si la timina excitada está contigua a otra y el proceso es energéticamente favorable (${}^3\text{FQ} > {}^3\text{Thy}$) [15].

Es de destacar que, las 6,8-difluoroquinolonas LFX y FRX son las moléculas más fotomutagénicas y las únicas capaces de desencadenar procesos de fotocarcinogenicidad [56, 57]. Sin embargo, en estudios *in vitro* no son las que producen mayor daño a las biomoléculas.

En vista de ello, parece evidente que es necesario realizar un estudio más profundo sobre las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de las 6,8-difluoroquinolonas y su reactividad frente a biomoléculas, y ello se abordará en la presente tesis.

I.9. Referencias Bibliográficas

- 1 Jiménez Pacheco, A., Arrabal Polo, M.A., Noguera Ocaña, M. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamas de espectro extendido. *Higiene y sanidad ambiental*. **2009**, 9, 449-466.
- 2 Leyva, S., Leyva, E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.* **2008**, 2(1), 1-13.
- 3 Takas-Novak, K., Noszal, B., Hermez, I., Kereszturi, G.P.B., Szasz, G. Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *J. Pharm. Sci.* **1993**, 79, 1023-1028.
- 4 Sortino, S., De Guidi, G., Giuffrida, S., Monti, S., Velardita, A. pH effects on the spectroscopic and photochemical behavior of enoxacin: a steady-state and time resolved study. *Photochem. Photobiol.* **1998**, 67, 167-73.
- 5 Bilski, P., Martinez, L. J., Koker, E. B., Chignell, C. F. Photosensitization by norfloxacin is a function of pH, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64, 496-500.
- 6 Sortino, S., Marconi, G., Giuffrida, S., De Guidi, G., Monti S. Photophysical properties of rufloxacin in neutral aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 731-736.
- 7 Drakopolulos, A. I., Ioannou, P. C. Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibacterials. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, 354, 197-204.
- 8 Bazin, M., Boscá, F., Marín M. L., Miranda, M. A., Patterson, L. K., Santus, R. A laser flash photolysis and pulse radiolysis study of primary photochemical processes of flumequine. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 451-457.
- 9 Babic, S., Horvat J.M., Pavlovic M., Kastelan-Macan, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal. Chem.* **2007**, 26, 1043-1061.
- 10 Hernández-Arteseros, J.A., Compañó, R., Prat, M.D. Determination of ciprofloxacin and enrofloxacin in edible animal tissues by terbium-sensitized luminescent. *Analyst.* **1998**, 123, 2729-2732.
- 11 Naber K. G., Sörgel, F. Antibiotic therapy-rationale and evidence for optimal drug concentrations in prostatic and seminal fluid and in prostatic tissue. *Andrologia.* **2003**, 35, 331-335.
- 12 Trudy, R., Rowland, M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 2; Predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2006**, 95, 1238-1257.

- 13 Domagala, J.M., Heifetz, C.L., Hutt, M.P., Mich, T.F, Nichols, J.B., Solomon, M., Worth D.F. 1-Substituted 7-[3-[(ethylamino) methyl]-1-pyrrolidiny]-6,8- difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids. New quantitative structure-activity relationships at N1 for the quinolone antibacterials. *Eur.J. Med. Chem.* **1988**, 5, 991–1001.
- 14 Cecchetti, V., Fravolini, A., Sabatini, S., Tabarrini, O., Xin, T. Dibenzo[1,6] naphthyridones as modified quinolone antibacterials. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 899.
- 15 Boscá, F., Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M.C., Castell, J.V., Miranda, M.A. The triplet energy of thymine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6318-6319.
- 16 Cruz Morandé, S., Diaz de la Roda Lorente, P., Duart Clemente, J., Romero Muñoz, L.M., García Quetglas, E. Rotura bilateral del tendón de Aquiles secundario a levofloxacino. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* **2010**, 4, 238-240.
- 17 Fasani, E., Mella, M., Caccia, D., Tassi, S., Fagnoni, M., Albini, A. The photochemistry of lomefloxacin. An aromatic carbene as the key intermediate in photodecomposition. *Chem. Commun.* **1997**, 1329-1330.
- 18 Sauvaigo, S., Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Ravanat, J. L., Cadet, J. Analysis of fluoroquinolone-mediated photosensitization of 2'-deoxyguanosine, calf thymus and cellular DNA: determination of type-I, type-II and triplet-triplet energy transfer mechanism contribution. *Photochem.Photobiol.* **2001**, 73, 230.
- 19 Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, J. A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdés, F., Túnez Fiñana, I. TextoEspectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba)*
- 20 Albini, A., Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 238-250.
- 21 Park, H. R., Lee, H. C., Kim, T. H., Lee, J. K., Yang, K., Bark, K. M. Spectroscopic properties of fluoroquinolone antibiotics and nanosecond salvation dynamics in aerosol-OT reverse micelles. *Photochem.Photobiol.* **2000**, 71, 281-293.
- 22 Monti, S., Sortino, S., Fasani, E., Albini, A. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 2185-2196.
- 23 Du, L., Xu, Q., Yuan, Y. Fluorescence spectroscopy determination of FQ by charge-transfer reaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 33, 693-698.

- 24 Fasani, E., Profumo, A., Albini, A. Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem.Photobiol.* **1998**, 66, 666-674.
- 25 Rougee, M. R., Bensasson, V. Determination of the decay rate constant of singlet oxygen in the presence of biomolecules. *C. R. Acad. Sci. Ser. II.* **1986**, 302, 1223-1226.
- 26 Navaratnam, S., Claridge, J. Primary photophysical properties of ofloxacin. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 283-290.
- 27 Monti, S., Sortino, S. Laser Flash photolysis study of photoionization in fluoroquinolones. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 877-881.
- 28 Sortino, S., Condorelli, G. Complexes between fluoroquinolones and calf thymus DNA: binding mode and photochemical reactivity. *New. J. Chem.* **2002**, 26, 250-258.
- 29 Mella, M., Fassani, E., Albini, A. Photochemistry of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-7-piperazynil-4-quinolone-3-carboxylic (ciprofloxacin) in aqueous solution. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, 84, 2508-251.
- 30 Vermeersch, J. C., Ronfard-Haret, J. C., Bazin, M., Carillet, V. P., Morliere, R. Santus. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study. *Photochem.Photobiol.* **1991**, 54, 661-666.
- 31 Jiménez Cerezo, M. J., Silgado Arellano, R., Ferrari Piquero, J. M., Herreros de Tejada, Lopez Coterilla A. Fotosensibilidad asociada a medicamentos: una reacción adversa frecuente y poco conocida. *Revista de la OFIL.* **2006**, 16, 61-70.
- 32 Martinez, L. J., Li, G., Chignell, C. F. Photoreaction of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem.Photobiol.* **1997**, 65, 599-602.
- 33 Fasani, E., Negra, F. F. B., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5388-5395.
- 34 Araki, T., Yukinori, K., Ohta, I., Kitaoka, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 229.
- 35 Honeyman, J. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. *Revista peruana de Dermatología.* **2002**, Volumen 12, nº 2.
- 36 Pérez Prieto, J. Modernizing the chemistry education curriculum: The relevance of the sunlight in our life. *Educación Química.* **2014**, nº 17, p 12-19.
- 37 Boscá, F., Marin, M. L., Miranda, M. A. Photoreactivity of the nonsteroidal antiinflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects. *Photochem.Photobiol.* **2001**, 74, 637-655.

- 38 Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439-446.
- 39 Dockal, M., Carter, D. C., Ruker, F. Five recombinant fragments of human serum albumin-tools for the characterization of the warfarin binding site. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29303-29310.
- 40 Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T. G., Otagiri, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695-704.
- 41 Ewaskiewicz, J. I., Devlin, T. M., Ch'ih, J. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 1095-1100.
- 42 Drmanovic, Z., Voyatzi, S., Kouretas, D., Sahpazidou, D., Papageorgiou, A., Antonoglou, O. Albumin possesses intrinsic enolate activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors. *Anticancer. Res.* **1999**, 19, 4113-4124.
- 43 Braña, M.F., Cacho, M., Gradillas, A., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A. Intercalators as Anticancer Drugs. *Curr. Pharm.Des.* **2001**, 7, 1745-1780.
- 44 Wemmer, D.E., Dervan, P.B. Targeting the minor groove of DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 355-61.
- 45 Hecht, S.M. The chemistry of activated bleomycin. *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 383-391.
- 46 Hecht, S.M. DNA strand scission by activated bleomycin group antibiotics. *Fed. Proc.* **1986**, 45, 2784-2791.
- 47 Cohen, S.M., Lippard, S.J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **2001**, 67, 93-130.
- 48 Job, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. Chim.* **1928**, 9, 113-203.
- 49 Likussar, W., Boltz, D.F. Theory of continuous variation plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants. *Ann. Chim.* **1971**, 43, 1265-1272.
- 50 Cantor, C.R., Schimmel, P.R. The Behavior of Biological Macromolecules. *Bioph. Chem. Part III*. San Francisco. **1980**, 1135-1139.
- 51 Molina, A., Vaquero, J.J., García Navio, J.L., Alvarez-Builla, J., de Pascual-Teresa, B., Gago, F., Rodrigo, M.M. Novel DNA Intercalators Based on the Pyridazino[1',6':1,2]pyrido[4,3-b]indol-5-inium System. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3907-3915.
- 52 Molina, A., Vaquero, J.J., García-Navio, J.L., Alvarez-Builla, J., Pascual-Teresa, B., Gago, F., Rodrigo, M.M., Ballesteros, M. Synthesis and DNA binding

Capítulo II: Objetivos

II.1. Objetivos generales

Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las fluoroquinolonas (FQ) en disoluciones acuosas tanto en presencia como en ausencia de biomoléculas como el ADN o proteínas, aunque han sido objeto de un gran número de estudios, todavía no han sido completamente establecidas debido a la gran complejidad que presentan. Por ello tampoco se conocían los procesos implicados en sus reacciones de fotosensibilización. Así, el objetivo general del presente trabajo consiste en encontrar los mecanismos implicados en las reacciones fotoalérgicas y fotogenotóxicas que desencadenan las FQ.

Para ello primero se investigan las discrepancias encontradas en la literatura acerca de los intermedios involucrados en la fotoquímica de las FQ para posteriormente analizar los procesos fotoquímicos implicados en el daño producido a biomoléculas como proteínas o el ADN.

II.2. Objetivos concretos

Los objetivos concretos propuestos en la presente tesis, son los que se detallan a continuación:

- Determinar la naturaleza de la especie secundaria que se genera de los estados excitados triplete de las FQ. Para ello se analizará las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de NFX y alguno de sus derivados en presencia y ausencia PB.
- Determinar la naturaleza y reactividad de los intermedios generados en las fotodeshalogenaciones de 6,8-difluoroquinolonas. Se estudia la fotoquímica y fotofísica de LFX y se compara con la de su derivado N(4')-acetilado (ALFX).
- Establecer los principales procesos implicados en la fotogenotoxicidad de FQ. Se estudiará la fotodeshalogenación de (A)LFX en presencia de deoxiguanosina (dGuo) y ADN mediante diversas técnicas (emisión, estudio de fotólisis destello láser (FDL), radiólisis pulsada (RP), cromatografía líquida y espectrometría de masas)
- Establecer los principales procesos implicados en la fotoalergia de FQ. Se estudia en detalle la fotoquímica de (A)LFX en presencia de una proteína como la albúmina sérica humana (ASH) y de algunos de sus aminoácidos más reactivos utilizando las técnicas comentadas arriba.

Capítulo III: Excímeros triplete en disolución acuosa

III.1. Introducción

El comportamiento fotoquímico de las FQ hoy en día todavía no se comprende completamente debido a la complejidad de los procesos que muestran estas moléculas en disolución acuosa. Entre ellos destacar que se ha observado que presentan inusuales fotodeshalogenaciones [1,2], rehibridaciones en sus estados excitados [3,4] y reactividad con el tampón fosfato (PB) así como con otras sales inorgánicas [5-7].

Tal y como se ha comentado en el capítulo de la introducción, las FQ son diadas formadas por un sustituyente aceptor que contiene un anillo quinolínico con un ácido carboxílico y otro dador que usualmente está formado por un sustituyente piperazínico en el cual su N (4') le confiere un carácter básico. Como consecuencia de ello, se pueden encontrar cuatro formas distintas en disolución acuosa (forma neutra, forma zwitteriónica, forma aniónica, forma catiónica), las cuales presentan importantes diferencias en sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas [8,4]. Es significativo el hecho de que los estados excitados singlete de las formas neutra y aniónica (no tiene protonado en N (4')) sufran un proceso de desactivación no radiativa por transferencia electrónica intramolecular entre el par solitario del N (4') y el sistema quinolínico, lo cual produce una inhibición de la fluorescencia [4]. En contraposición, las otras formas de las FQ con el N (4') protonado (formas catiónica y zwitteriónica) si emiten. En este contexto, se ha observado que la presencia de aniones inorgánicos como fosfato, bicarbonato o sulfitos también inhiben la emisión de las formas zwitteriónicas de la FQ [8].

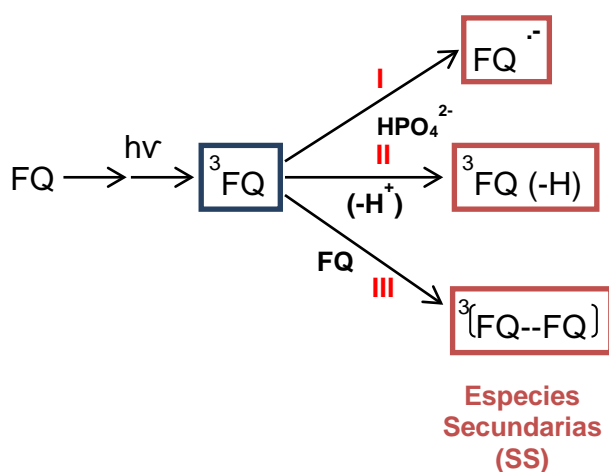


Figura III.1. Mecanismos propuestos para la generación de especies secundarias de las FQ en medio acuoso.

La participación de estas sales en la generación de otras especies secundarias (SS) provenientes de los estados excitados triplete de las FQ (^3FQ) es otro efecto sorprendente detectado en este tipo de fármacos (Figura III.1).

Estas especies intermedias SS fueron asignadas inicialmente a los radicales aniónicos de las FQ ($\text{FQ}^{\bullet-}$). Sin embargo posteriormente se observó que la naturaleza de estas especies intermedias era triplete y se sugirió que su generación debía proceder de la desprotonación de sus tripletes ($^3\text{FQ}(-\text{H})$) inducida por bases como HPO_4^{2-} (Figura III.1) [7]. A pesar de ello muchos aspectos experimentales no pueden ser comprendidos mediante el mecanismo catalizado por bases. Así, parece inconsistente que los valores de constantes de desactivación (k_q) de los ^3FQ por el PB sean diferentes mientras que los sus $\text{p}k_{a1}$ son prácticamente los mismos. De hecho, los valores de k_q de los estados excitados triplete de enoxacino (^3ENX), norfloxacinó (^3NFX), ofloxacinó (^3OFX) y rufloxacinó (^3RFX) son 9.9×10^8 , 8×10^7 , 3×10^7 y $<0.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que sus $\text{p}k_{a1}$ son 8.5, 8.5, 8.2 y 7.9 respectivamente [9-11]. Por lo tanto se pensó en estudiar la posibilidad de que las especies secundarias (SS) provinieran de la reacción entre los ^3FQ con sus estados fundamentales (vía III, Figura III.1).

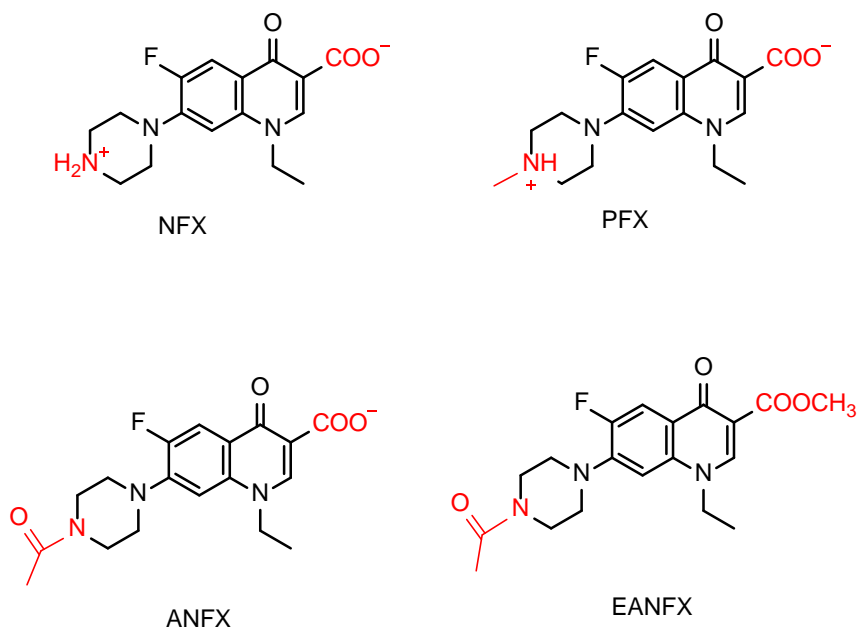


Figura III.2. Forma mayoritaria de norfloxacinó (NFX), pefloxacinó (PFX), la forma acetilada de norfloxacinó (ANFX) y su éster metílico (EANFX) en disoluciones acuosas neutras.

Para ello se hizo una revisión bibliográfica donde nos encontramos que la formación de los excímeros triplete a través de reacciones intermoleculares de autodesactivación de compuestos orgánicos es típicamente observada mediante

medidas de fosforescencia en disoluciones líquidas muy concentradas [10, 11]. Sin embargo existen unos pocos casos donde los excímeros triplete se han observado mediante la técnica de fotólisis de destello láser (FDL) [12, 13]. Basándonos en ello, realizamos un minucioso estudio de FDL para analizar las propiedades fotoquímicas de NFX y algunos de sus derivados en presencia y ausencia de PB con el propósito de poder determinar de manera inequívoca si las especies SS tenían naturaleza excímera (ver estructuras en Figura III.2). Los derivados de NFX elegidos para el estudio fueron compuestos donde la interacción entre el PB y NFX podía variar (derivados N-sustituídos PFX, ANFX y EANFX) y a su vez estudiar el efecto del grupo carboxílico mediante la formación de su éster (EANFX).

III.2. Resultados

III.2.1. Reacciones de autodesactivación de los estados excitados triplete de las fluoroquinolonas

El objetivo del presente capítulo, consistió en evaluar la generación de excímeros a través de reacciones entre los estados excitados triplete de las FQ con sus estados fundamentales (reacciones de autodesactivación). Para ello se realizaron estudios de fotólisis de destello láser (LFP) con norfloxacin (NFX) en disolución acuosa a pH 7.4 variando su concentración dentro del rango de $5-33 \times 10^{-5}$ M. La potencia del láser se mantuvo constante durante todos los experimentos (ca. 5 mJ/pulso).

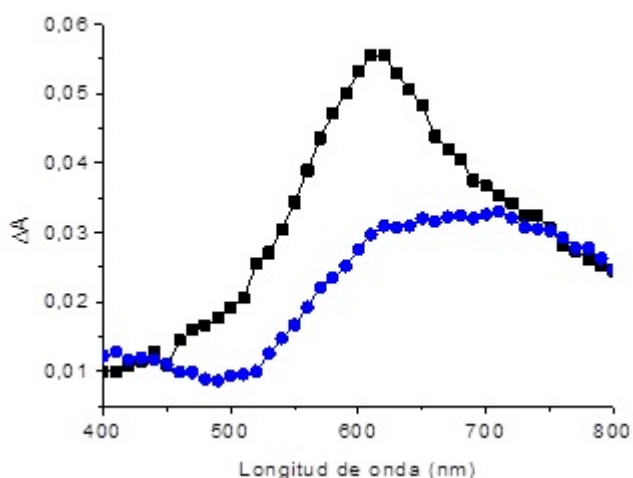


Figura III.3. Espectro de absorción de las especies intermedias obtenidas en una disolución acuosa de 0.02 mM NFX a pH 7.4 bajo N_2O a diferentes tiempos después de un pulso láser (355 nm); $1\mu s$ (corresponde a 3NFX , (■)) y $4\mu s$ (corresponde a SS_{NFX} , (●)).

De acuerdo con los resultados obtenidos a distintos tiempos, se observan dos especies intermedias (Figura III.3):

- i. Una especie con un máximo de absorción centrado a 610 nm, que de acuerdo con la literatura corresponde al triplete excitado de NFX (³NFX) [3, 14].
- ii. Una especie secundaria (SS_{NFX}) con un máximo a 710 nm, que muestra un espectro de absorción similar al descrito para la reacción entre ³NFX y el PB [6].

Tabla III.1. Propiedades fotofísicas de FQ en disolución acuosa a pH 7.4

Parámetros	NFX	PFX	ANFX	EANFX
³ FQ, λ _{máx} (nm)	610	610	590	580
k _{qFQ} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	0.7 x 10 ⁹	0.6 x 10 ⁹	0.1 x 10 ⁹	0.1 x 10 ⁹
k _{qPB} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b	0.9 x 10 ⁸	0.9 x 10 ⁸	0.3 x 10 ⁸	--
SS ^c , λ _{máx} (nm)	710	740	620	620
k _{qNAP} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^c	0.2 x 10 ¹⁰	0.2 x 10 ¹⁰	0.2 x 10 ¹⁰	--
k _{qBPC} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^d	<1 x 10 ⁷	<1 x 10 ⁷	<1 x 10 ⁷	--

^ak_{qFQ}; constantes de autodesactivación. ^bk_{qPB}; ³FQ-PB constantes de desactivación. Valores similares se han descrito en la literatura para NFX y PFX [15]. ^cSS; especies secundarias detectadas en reacciones de autodesactivación y en presencia de 20 mM de PB. ^dk_{NAP o BPC}; constantes para reacciones de transferencia de energía entre las especies secundarias y NAP o BCP en disoluciones acuosas de 200 mM de PB para NFX y PFX y 400 mM PB para ANFX.

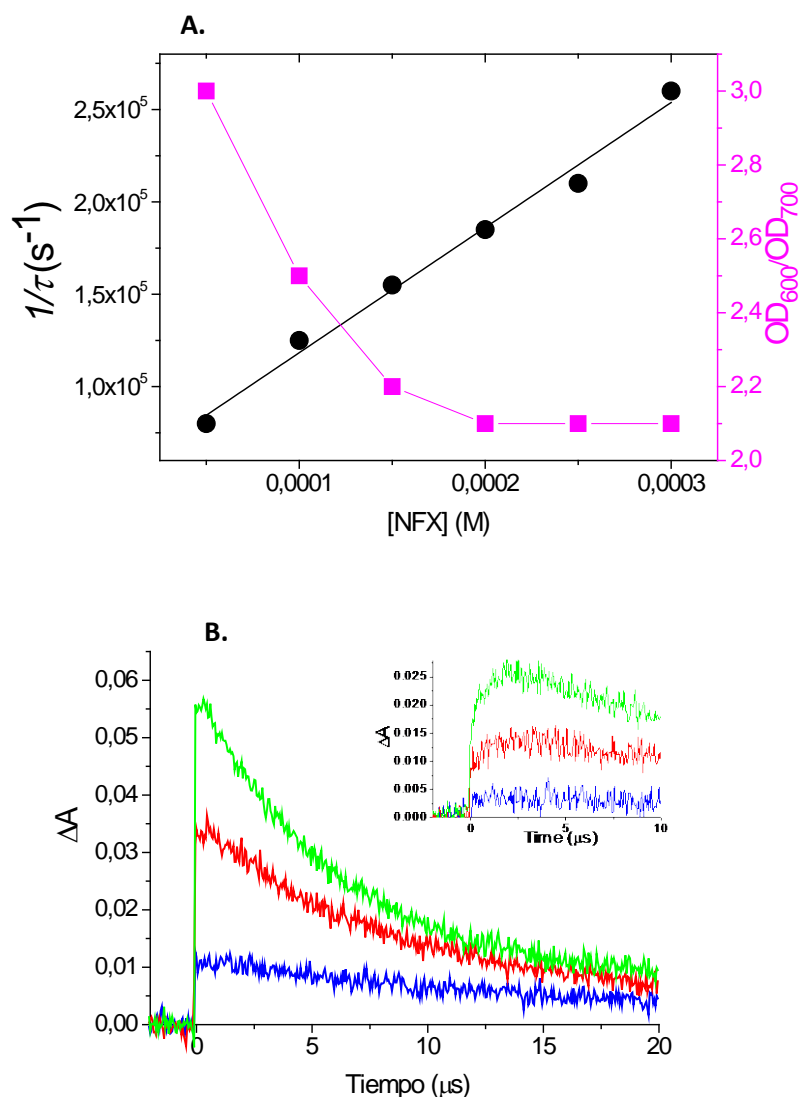


Figura III.4. A: Tiempos de vida recíprocos de ^3NFX (\bullet) y OD_{600}/OD_{700} (\blacksquare) frente a las concentraciones de NFX. **B:** Trazas a 600 nm y 700 nm (insertado) de soluciones acuosas a pH neutro de NFX a diferentes concentraciones: 5×10^{-5} M (azul), 1×10^{-4} M (rojo) y 2×10^{-4} M (verde) utilizando la técnica de FDL a 355 nm.

A medida que se aumentaba la concentración de NFX, los tiempos de vida de ^3NFX disminuían (Figura III.4.). Con las trazas obtenidas a 600 nm se determinó una constante de autodesactivación (k_{qFQ}) de ca. $0.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla III.1). Además, comparando estas con las obtenidas a 710 nm se pudo observar que a medida que se añadía más NFX, el aumento en la velocidad de desactivación de ^3NFX daba lugar a un incremento del SS generado. Así, aunque la señal a 600 nm también aumentaba porque se generaban más tripletes, la obtenida a 700 nm era proporcionalmente mayor (ver Figura III.4).

Sin embargo, con estos resultados se necesitaba descartar la posibilidad de que la generación de SS viniera total o parcialmente de una reacción de desactivación por aniquilación triplete-triplete (ATT, interacción entre dos estados excitados triplete). Para ello se llevó a cabo un experimento en el que se aumentaba la potencia del pulso del láser para aumentar la cantidad de ^3NFX sin necesidad de variar la concentración inicial de NFX. En este estudio se moduló la energía del láser entre 5-25 mJ/pulso manteniendo la concentración de NFX en 15×10^{-5} M. Las trazas a 600 nm no mostraron cambios significativos en los tiempos de vida de ^3NFX con lo que se pudo descartar una posible contribución de ATT en la generación de SS.

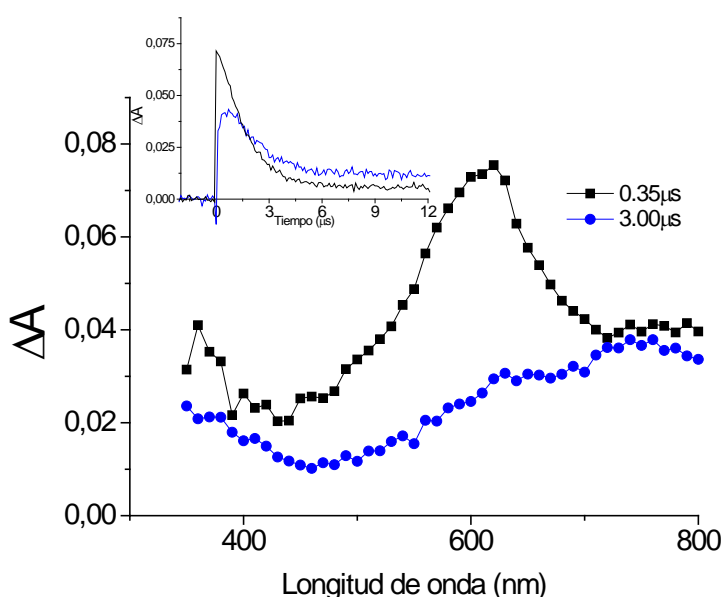


Figura III.5. Espectros de absorción obtenidos de una disolución acuosa de PFX (0.2 mM) a pH 7.4 y bajo N_2O a diferentes tiempos: 0.35 μs (asignable al espectro de ^3PFX , (■)) y 3 μs (espectro asignable a SS_{PFX} (●)) después de un pulso láser a 355 nm. Insertado: trazas a 600 y 740 nm (azul y negro respectivamente).

Cuando se llevaron a cabo experimentos similares con PFX se obtuvo una constante de autodesactivación de $0.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla III.1), la cual se obtuvo determinando los diferentes tiempos de ^3PFX a partir de las trazas a su $\lambda_{\text{máx}}$ (610 nm) [14]. En este caso, sus especies secundarias (SS_{PFX}) tenían su $\lambda_{\text{máx}}$ a 740 nm (Figura III.5).

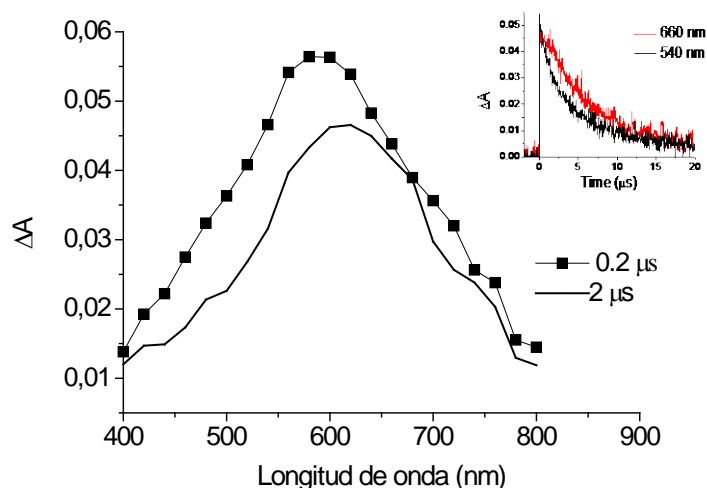


Figura III.6. Espectro de absorción de las especies intermedias obtenidas mediante LFP de 2.5 mM de EANFX en disoluciones acetonitrilo/agua (1:2) bajo N_2O a 0.2 μs (■) y 2 μs (-), asignables a $^3\text{EANFX}$ y SS_{EANFX} respectivamente, después de un pulso láser a 355 nm. Insertado: Señales de desactivación a 660 y 540 nm (rojo y negro respectivamente).

En los estudios de fotólisis de destello láser con la forma N-acetilada de NFX (ANFX) y su éster (EANFX) (Figura III.2) se utilizaron concentraciones de 0.1 a 2.5 mM de FQ pero en disoluciones acetonitrilo/agua en proporción 1:2 por problemas de solubilidad. En estos experimentos, al igual que ocurría con NFX y PFX, se detectaron dos especies intermedias para cada una. Las especies primarias tenían, como ya se había descrito en la literatura, para $^3\text{EANFX}$ un máximo ca. 580 nm y para $^3\text{ANFX}$ un máximo ca. 590 nm [3,4]. Sin embargo, las especies secundarias (SS) generadas desde $^3\text{ANFX}$ y $^3\text{EANFX}$ no se habían descrito, posiblemente porque presentaban unos espectros de absorción bastante similares a sus tripletes (ambos SS tenían su $\lambda_{\text{máx}}$ ca. 620 nm). Los espectros de absorción de las especies intermedias generadas de EANFX y sus trazas a 540 y 600 nm, se muestran en la Figura III.6.

La banda de absorción de $^3(\text{E})\text{ANFX}$ también presentaba el fenómeno de autodesactivación pero con valores más bajos que los compuestos no acetilados (Tabla III.1) aunque, como era de esperar, se desactivaban con oxígeno a las mismas velocidades de reacción (K_{qO_2} ca. $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [15].

El hecho de que con los compuestos acetilados también se detectaran SS era una clara evidencia de que la desprotonación del N (4') no debía intervenir en la formación de SS.

III.2.2. Reactividad del estado triplete de fluoroquinolonas (^3FQ) en presencia de tampón fosfato (PB)

Para evaluar los efectos del tampón fosfato (PB) sobre la reactividad de ^3FQ , se realizaron estudios de fotólisis de destello láser de disoluciones acuosas de NFX, ANFX y PFX con distintas cantidades de PB (1 a 20 mM).

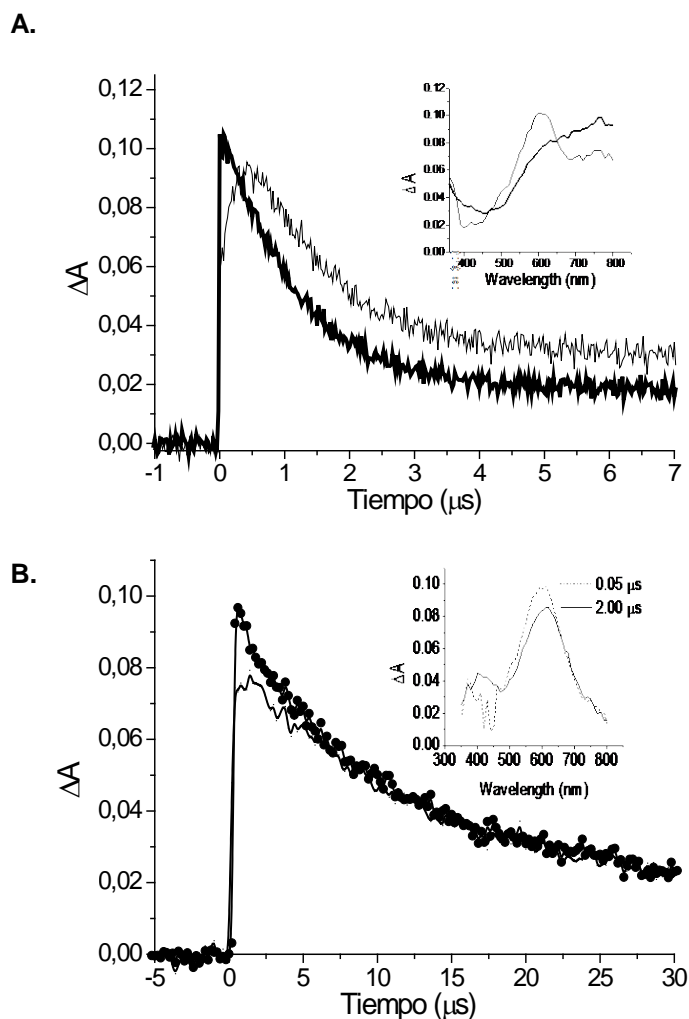


Figura III.7.A: Trazas a 610 y 700 nm (línea gruesa y fina, respectivamente) obtenidas de disoluciones acuosas (20 mM PB) con PFX (2×10^{-4} M) en medios anaeróbicos (N_2O), tras excitación láser a 355 nm. Insertado: Su espectro de absorción 0.05 (línea de puntos) y 0.45 (línea continua) μs después del pulso de luz. **B:** Trazas 600 (---) y 650 nm (línea fina) obtenidas de disoluciones acuosas (20 mM PB) con ANFX en medios anaeróbicos (N_2O). Insertado: Su espectro de absorción 0.05 y 2.00 μs después del pulso de luz.

Como ya se había descrito con anterioridad para NFX, a medida que se incrementaba la cantidad de PB en el medio, aumentaba la generación de su especie secundaria y se acortaban los tiempos de vida de su triplete. Este efecto también se observó con los experimentos realizados con ANFX y PFX (Figura III.7).

Las constantes de desactivación de sus estados excitados triplete por PB se determinaron haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer (los resultados se recogen en la Tabla III.1). Los espectros de absorción de las especies secundarias se encuentran centrados a 710, 620 y 740 nm para NFX, ANFX y PFX respectivamente. Estas bandas son similares a las detectadas para las reacciones de autodesactivación. Es importante resaltar que el tampón fosfato (PB) también favorece la generación SS (Tabla III.1) incluso en el caso de ANFX, el cual es incapaz de desprotonarse.

III.2.3. Procesos de transferencia de energía de las especies secundarias (SS) con el naproxeno (NAP) y el ácido bifenilcarboxílico (BPC)

Para poder conocer la naturaleza de las especies secundarias (SS) se llevaron a cabo experimentos de fotólisis de destello láser con PFX, NFX y ANFX en disoluciones acuosas con gran cantidad de PB para que las especies secundarias se formasen de manera cuantitativa. Se utilizaron disoluciones acuosas 200 mM PB para PFX y NFX, y 400 mM PB para ANFX. Se utilizó una mayor concentración de PB en el caso de ANFX debido a que la reactividad de $^3\text{ANFX}$ con el PB es mucho menor que en el caso de ^3PFX y ^3NFX (Tabla III.1). Bajo estas condiciones, naproxeno (NAP) y ácido bifenilcarboxílico (BPC) no compiten con el tampón fosfato para reaccionar con ^3FQ , lo cual permite evaluar la transferencia de energía de SS con NAP y BPC.

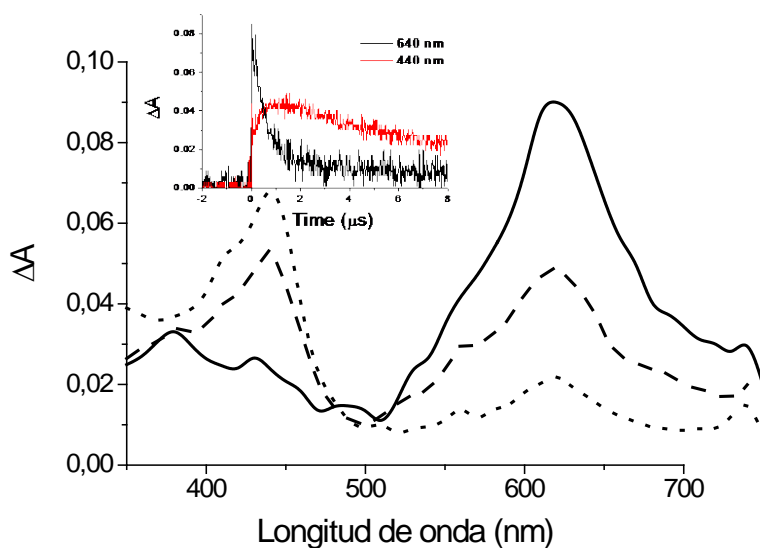


Figura III.8. Espectro de las especies transitorias obtenido con 0.04 mM ANFX en disoluciones acuosas en presencia de 400 mM PB (pH 7.4) y 0.6 mM de NAP bajo N_2O a 0.1, 0.6 y 1.1 μs después del pulso láser a 355 nm. Insertado: Trazas de decaimiento a 440 y 640 nm (rojo y negro respectivamente).

Como puede verse en la Figura III.8, la desactivación de la especie secundaria de ANFX (que es la primera especie que se detecta ya que 3ANFX ha reaccionado con PB), presenta una velocidad coincidente con la de generación del 3NAP .

Las constantes de transferencia de energía de las SS con NAP y BPC se determinaron también de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer (Tabla III.1).

Es interesante destacar el hecho de que las SS se desactivaban eficientemente con NAP pero no lo hacían con el BPC.

Por otra parte también se determinaron las constantes de reacción del oxígeno molecular con las SS y como era de esperar en procesos de transferencia de energía, los valores obtenidos eran controlados por difusión.

III.2.4. Efecto de la concentración de HPO_4^{2-} sobre las propiedades fotofísicas de las fluoroquinolonas

Para establecer el papel que desempeña la concentración de HPO_4^{2-} en la generación de SS, se procedió a registrar los espectros de absorción de las especies transitorias de NFX en 4 mM PB a distintos pHs (desde 3.9 hasta 9.3).

Tabla III.2. Propiedades fotofísicas de los intermedios de NFX a diferentes pHs en una disolución acuosa 4 mM PB bajo condiciones anaeróbicas.

pH	HPO ₄ ²⁻ (mM)	Zwitt ^a (%)	Φ(³ NFX ^b)	τ(³ NFX ^b) (μs)	Φ(SS _{NFX} ^c)	τ(SS _{NFX} ^c) (μs)	Φ(³ NFX)/Φ(SS _{NFX})
3.9	0.01	1.0	0.17	7.0	--	9.0	--
5.0	0.05	5.5	0.17	3.2	0.12	5.4	1.27
6.1	0.60	40.0	0.22	2.2	0.19	4.0	1.06
6.8	1.80	77.9	0.42	2.3	0.30	4.2	1.26
7.2	2.76	83.5	0.49	2.2	0.33	4.1	1.34
7.4	3.13	77.9	0.52	2.2	0.35	3.1	1.37
8.0	3.77	75.0	0.49	2.6	0.35	3.1	1.25
8.5	3.95	49.8	0.39	2.9	0.29	3.3	1.23
9.3	4.00	13.7	0.16	5.0	0.12	4.6	1.18

^a Forma zwitteriónica de NFX, ^b triplete de NFX y ^c especie secundaria de NFX

Así se detectaron los espectros de absorción de ³NFX y de su especie secundaria a cualquier pH con la excepción de a pH 3.9, donde solo se detectó ³NFX. Los rendimientos cuánticos (Φ) y tiempos de vida de ³NFX y SS_{NFX} se determinaron utilizando las trazas obtenidas a 600 y 720 nm (Tabla III.2). Los resultados muestran una variación del rendimiento cuántico de ³NFX y del de SS_{NFX} (Φ³_{NFX}, Φ_{SS(NFX)}) paralela a la concentración de la forma zwitteriónica de NFX pero no a la de aniones HPO₄²⁻.

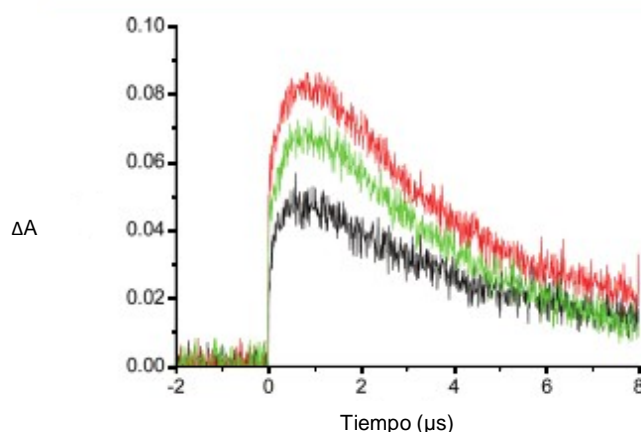


Figura III.9. Trazas a 720 nm de NFX en disolución acuosa 4mM PB a pH 6.1 (negro), 7.4 (rojo) y 8.5 (verde) bajo condiciones anaeróbicas (N₂O).

En la Figura III.9 se puede ver que los tiempos de vida de SS no cambian a valores de pH entre 6.1-8.5. También se observó que la adición de mayores cantidades de fosfatos (20 mM PB) prácticamente no variaba el tiempo de vida de la especie SS a los mismos pHs.

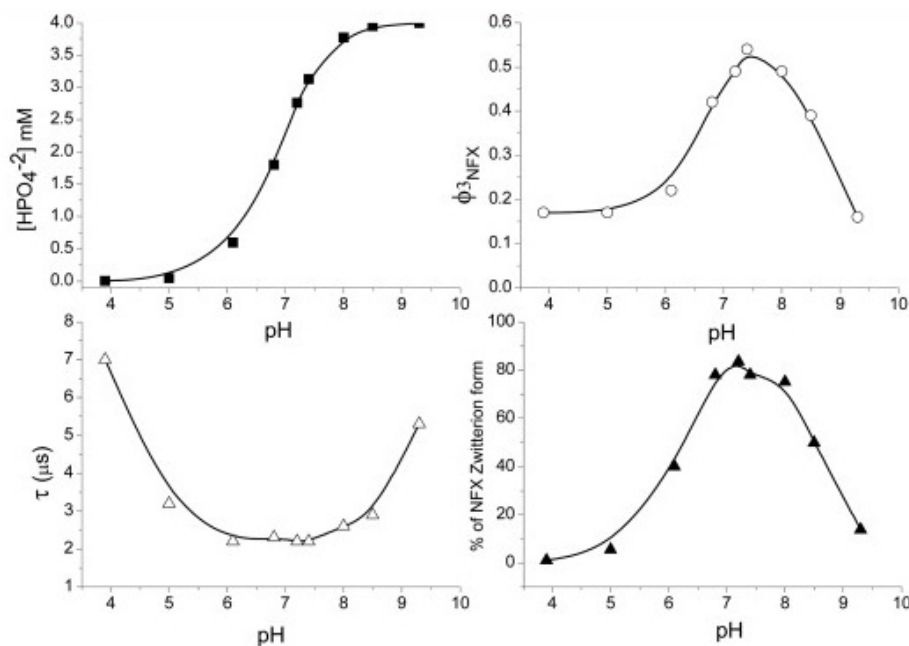


Figura III.10. Representación de los pHs vs concentración de HPO_4^{2-} (■), tiempos de vida de ^3NFX (Δ), $\Phi(^3\text{NFX})$ (\circ) y la concentración de la forma zwitteriónica de NFX (\blacktriangle) obtenidos a 600 nm bajo excitación de luz láser a 355 nm.

En la Figura III.10 se puede observar, además de los datos comentados en la Figura III.9, que los tiempos de vida de ^3NFX eran más cortos a mayores concentraciones de la forma zwitteriónica de NFX y estos no tenían ninguna relación con las concentraciones de HPO_4^{2-} . Así, aunque el PB ha sido asociado con la generación de SS, la participación directa del anión HPO_4^{2-} puede descartarse ya que su concentración no influye sobre la relación $\Phi(^3\text{NFX})/\Phi(\text{SS}_{\text{NFX}})$ ni en el tiempo de vida de ^3NFX (Tabla III.2).

III.2.5. Reacciones de transferencia electrónica del triplete de las fluoroquinolonas (^3FQ) con triptófano (Trp)

Con el propósito de confirmar que las especies radical aniónicas de las FQ no eran las SS detectadas se realizó la adición de Triptófano (Trp) a concentraciones entre 1-5 mM en disoluciones acuosas 4 mM PB de NFX, PFX y ANFX. Esta adición

produjo variaciones en los tiempos de vida de los tripletes de estas FQ y constantes de desactivación de las ^3FQ por triptófano similares entre ellas (k_q ca. $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lo cual estaba en concordancia con los valores descritos en la bibliografía para otras FQ como sarafloxacino (SAFX, $k_q = 1.38 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [16].

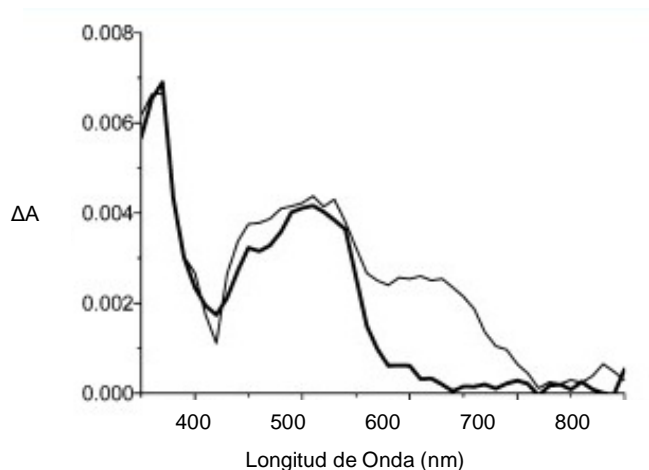
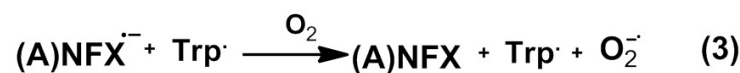
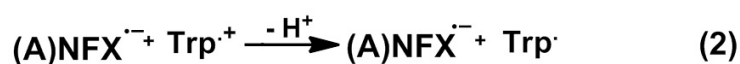
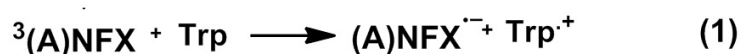


Figura III.11. Espectro de absorción de especies transitorias de una disolución acuosa 4 mM PB de ANFX (0.2 mM) y Trp (5 mM) obtenido 2 μs después del pulso láser bajo condiciones aeróbicas (línea gruesa) y anaeróbicas (línea fina).

El análisis de los espectros de absorción evidenció la generación de especies transitorias (después de que la señal de su ^3FQ hubiera desaparecido). Tres máximos de absorción ca. 370, 510 y 630 nm se observaron en medios anaeróbicos. Sin embargo en presencia de oxígeno solo se detectaban dos (370 y 510 nm). Los resultados obtenidos para ANFX se muestran en la Figura III.11.



Esquema III.1. Procesos de transferencia electrónica entre $^3(\text{A})\text{NFX}$ y Trp.

Las bandas centradas en 370 y 510 nm, pueden ser asignadas al radical del Trp de acuerdo con las reacciones 1 y 2 que se muestran en Esquema III.1 [15].

El máximo de absorción que aparece en 620 nm, correspondería al radical aniónico de las FQ ($\text{FQ}^{\cdot-}$) y se desactivaría por la presencia de oxígeno molecular (ecuación 3). Sin embargo, las bandas que corresponden con el radical Trp pueden

observarse tras 2 μ s después del pulso del láser debido a la conocida baja reactividad con el oxígeno molecular [17].

De esta forma, los espectros de absorción de los radicales aniones de PFX y NFX son diferentes a los de sus SS. En el caso de ANFX, aunque las bandas de absorción de las especies transitorias para ANFX⁻ y SS_{ANFX} tienen su máximo a la misma longitud de onda, el hecho de que la presencia del NAP no influyera en los tiempos de vida de(A)NFX⁻ indicaba que este intermedio, a diferencia de su SS_{ANFX}, no posee multiplicidad triplete.

III.2.6. Estudios de fotodegradación de norfloxacin (NFX) y su derivado acetilado (ANFX)

Con el fin de determinar los rendimientos cuánticos de fotodegradación de NFX y ANFX se realizaron irradiaciones de disoluciones acuosas de NFX y ANFX (6×10^{-5} M) a pH neutro que habían sido previamente burbujeadas con N₂. Las irradiaciones se realizaron en ausencia y presencia de PB (10 y 100mM PB) para evaluar la influencia del tampón fosfato (PB). La evolución de las fotodegradaciones se monitorizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (HPLC).

Tabla III.3. Efecto de PB sobre los rendimientos cuánticos de NFX y ANFX

PB (mM)	ANFX (NFX)			
	Φ_{FI}	Φ_{CIS}^a	Φ_{SS}^b	Φ_{deg}^c
0	0.13 (0.12)	0.40 (0.52)	>0.05 (>0.05)	0.065 (0.060)
10	0.13 (0.11)	0.40 (0.48)	0.24 (0.36)	0.025 (0.015)
100	0.12 (0.06)	0.38 (0.25)	0.35 (0.24)	0.007 (0.002)

^aRendimientos cuánticos de cruce intersistema (CIS) obtenidos mediante el método comparativo descrito para NFX y ANFX en agua [9]. ^bSS, rendimiento cuántico de especies secundarias obtenidos aplicando la ecuación $\Phi_{SS} = \Phi_{CIS} \times (1 - \tau_i / \tau_0)$, en donde τ_i es el tiempo de vida del intermedio con diferentes concentraciones de PB y τ_0 el tiempo de vida en ausencia de PB. (Asumimos que a 60 μ M, NFX y ANFX no son capaces de generar un $\Phi(SS_{ANFX}) < 0.05$).

^cRendimientos cuánticos de fotodegradación determinados mediante análisis por HPLC, tomando como estándar el NFX en agua ($\Phi_{deg} = 0.06$).

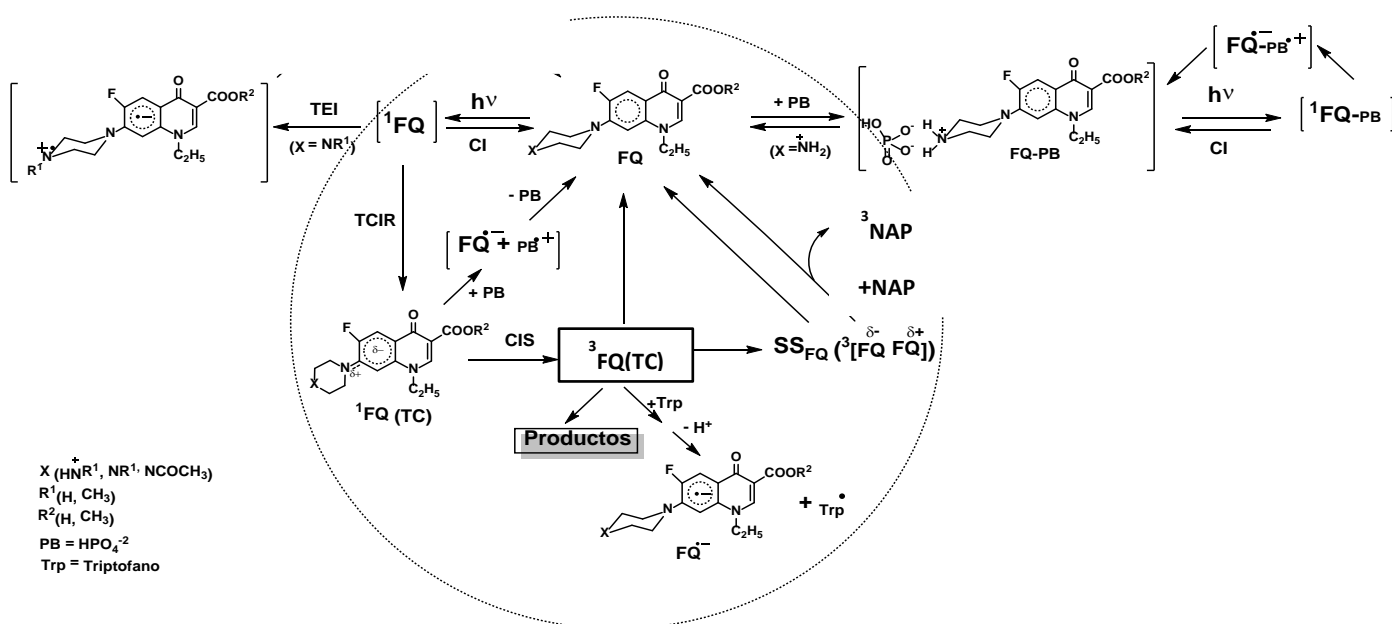
Se determinaron los rendimientos de fotodegradación (ϕ_{deg}) de NFX y ANFX observándose que disminuían cuando el PB se encontraba presente en el medio de reacción (Tabla III.3).

De los resultados obtenidos también es de destacar que los rendimientos cuánticos de degradación de NFX con 100 mM de PB fueron más de 20 veces menores que en ausencia de PB, mientras que para ANFX, la disminución fue menor de 10.

Para llegar a comprender lo que ocurre en estos fotoprocesos se procedió a determinar los rendimientos cuánticos de fluorescencia, de cruce intersistema y de la generación de especies intermedias (ϕ_{FI} , ϕ_{CIS} y ϕ_{SS} , respectivamente) en las mismas condiciones de reacción (Tabla III.3). La mayor disminución del ϕ_{deg} para NFX podría deberse tanto a la generación de SS_{NFX} como a la desactivación de su singlete ya que sus valores de ϕ_{FI} y ϕ_{CIS} variaban por la presencia de PB. Este hecho junto con la observación de que estos parámetros (ϕ_{FI} y ϕ_{CIS}) no variaran para ANFX indican que la disminución de $\phi_{deg(ANFX)}$ debe estar directamente correlacionada con el aumento de su $\phi_{SS(ANFX)}$ lo cual parece indicarnos que las SS deben tener una baja (o incluso inexistente) fotodegradación.

III.3. Discusión

En el Esquema III.2 se muestran los procesos foto físicos de las FQ en medio acuoso que nos permiten entender todos los resultados obtenidos:



Esquema III.2. Procesos foto físicos de las 6-fluoroquinolonas en medio acuoso.

La existencia de una asociación electrostática entre el anión fosfato (HPO_4^{2-}) y la forma protonada de las FQ, que posee dos átomos de hidrógeno en la posición N (4') del anillo piperazínico, se propuso para explicar la desactivación estática de la fluorescencia de las FQ en presencia de tampón fosfato [5]. Así la excitación de estos complejos es aniquilada debido a la rápida reacción de transferencia electrónica intermolecular entre el estado singlete de las FQ (^1FQ) y el HPO_4^{2-} .

La forma libre de ^1FQ sigue un proceso de transferencia de carga intramolecular por rehibridación (TCIR) [8,4].

Este cambio en la geometría del estado de emisión respecto al estado fundamental de las FQ explica el largo desplazamiento de Stokes en el espectro de emisión de las FQ en disolución acuosa neutra. Sin embargo, en condiciones básicas, el TCIR es suprimido por una reacción de transferencia electrónica intramolecular (TEI) entre el par solitario del anillo piperazínico y el anillo quinolínic de ^1FQ [4].

Por otro lado, la forma ^1FQ (TC) puede ser desactivada por el tampón fosfato mediante una desactivación dinámica de la fluorescencia por una rápida transferencia electrónica entre la ^1FQ (TC) y el PB [4].

El cruce intersistema desde ^1FQ (TC) produce ^3FQ (TC), especies transitorias con tiempos de vida del rango de microsegundos susceptibles de reaccionar con los compuestos que tienen alrededor (Tabla III.1). Así pudo detectarse la generación de especies secundarias (SS) a través de la reacción entre ^3FQ y sus estados fundamentales. Por otra parte las reacciones de transferencia electrónica entre ^3FQ y el triptófano (Trp) revelaron que el espectro de absorción transitorio de los radicales aniónicos de FQ ($\text{FQ}\bullet^-$) era diferente a los detectados para SS lo cual descartaba también la primera hipótesis en la que las SS fueron asignadas como $\text{FQ}\bullet^-$ (Figura III.1).

En éste contexto la diferencia en los espectros de absorción de las especies secundarias de NFX, PFX y ANFX podría deberse a la influencia del anillo piperazínico en la interacción de sus tripletes con sus estados fundamentales. Al no ocurrir esto con ^3NFX , ^3PFX y $^3\text{ANFX}$, sus espectros de absorción son muy similares, lo cual también ocurre en el caso de sus radicales aniones.

La detección de la especie SS_{ANFX} en presencia de PB (Figura III.7.A.) así como la baja influencia de las concentraciones de HPO_4^{2-} en la proporción entre $\phi(^3\text{NFX})/\phi(\text{SS}_{\text{NFX}})$ y en el tiempo de vida del ^3NFX son otros resultados que descartan la desprotonación de ^3FQ en la en la formación de SS. Una preasociación de los estados fundamentales de las FQ mediante la participación de interacciones aniones- π y puentes de hidrógeno entre el PB y la FQ podría justificar el efecto observado en PB. En éste contexto, como se ha comentado más arriba, la formación de complejos 1:1

entre la FQ y el PB, ha sido postulado para explicar la desactivación estática de fluorescencia de las FQ comentadas arriba [6].

El estudio de las transferencias de energía entre SS y el NAP u O₂ confirmó su multiplicidad ya que las constantes de velocidad de reacción eran controladas por difusión y además, la desactivación de cada SS era concomitante con la generación de ³NAP (Figura III.8).

El hecho de que la energía de los excímeros triplete fuera mucho menor que la de sus predecesores se confirmó realizando experimentos de transferencia de energía utilizando el BPC. Así, mientras los procesos de transferencia de energía que se producían entre ³FQ y BPC tenían constantes de reacción con valores ca. 10⁹ M⁻¹s⁻¹, las SS no parecían desactivarse por la presencia de BPC. Estos resultados, confirmaron que la energía triplete de SS debe estar por debajo de las 265 kJ/mol (energía triplete del BPC y de las FQ objeto de estudio), pero por encima de las 259 kJ/mol (energía triplete de NAP) [14].

Aunque es ampliamente conocida la generación de excímeros triplete a través de reacciones intramoleculares de autodesactivación mediante técnicas de fosforescencia [11-13], existen pocos casos en los que se hayan detectado excímeros triplete mediante la técnica de FDL [18, 19] y concretamente sólo se ha postulado la formación de un excímero en medio acuoso [19]. Así, el presente estudio es el primer claro ejemplo de detección de excímeros en medio acuoso. Este hallazgo está de acuerdo con la literatura ya que debe existir un momento dipolar permanente en los compuestos aromáticos para la formación de sus excímeros [11]. La formación de excímeros de FQ se basaría en una estabilización mediante fuerzas de Van der Waals tal y como se ha descrito en la bibliografía para otros compuestos orgánicos en disolución [13, 14, 20]. Las interacciones directas tipo acoplamiento- π pueden estar relacionadas con la generación de excímeros [21, 22]; de hecho, estas interacciones de acoplamiento- π han sido descritas en asociaciones entre FQ-FQ en su estado fundamental [17]. La aparente facilidad de estos compuestos para generar excímeros puede ser atribuida a interacciones electrostáticas entre la distribución anisotrópica de carga de una FQ en su estado triplete y el momento dipolar de su estado fundamental, lo cual aumenta las energías de asociación de los excímeros triplete [23].

Se ha sugerido la participación de excímeros triplete para justificar los resultados obtenidos en algunos procesos de fotodeshalogenación [24, 25]. Pero también hay precedentes de excímeros no reactivos en fotosustituciones de compuestos aromáticos [26]. Teniendo en cuenta ambas posibilidades y basándonos en la correlación entre las especies intermedias observadas para cada FQ, sus propiedades de emisión y sus fotodegradaciones podemos afirmar que los estados excitados

tripleto de las FQ son los intermedios responsables de la formación de fotoproductos y que la generación del excímero tripleto es principalmente un camino de desactivación.

III.4. Conclusiones

Este estudio muestra por primera vez la detección de un excímero tripleto en agua mediante la técnica de fotólisis de destello láser por la que además de obtenerse el espectro de absorción del excímero, se ha podido determinar la constante de reacción (autodesactivación $^3\text{FQ-FQ}$) que genera dicha especie.

Mediante el uso de esta técnica con ANFX y su éster metílico se han podido descartar la participación de procesos de protonación o desprotonación en la generación de los excímeros. Además, estos resultados han contribuido a entender los procesos fotofísicos de las FQ y el papel del tampón fosfato en ellos [22, 27].

Por otro lado, desde el punto de vista biológico, los resultados obtenidos parecen indicar que los excímeros tripleto de las FQ deben tener una mínima influencia en los efectos fototóxicos asociados con las FQ ya que tienen energías de tripleto menores que las de sus ^3FQ y no intervienen en la fotodegradación de las FQ por lo que generan intermedios reactivos.

III.5. Procedimiento experimental

III.5.1. Materiales

Ácido bifenilcarboxílico (BPC), naproxeno (NPX), norfloxacin (NFX), L-triptófano (Trp), NaHPO_4 monohidratado y NaH_2PO_4 heptahidratado fueron obtenidos de los laboratorios Sigma Chemical co. (St. Louis, MO); el compuesto pefloxacin (PFX) se extrajo de AZUBEN, producido por los laboratorios Ipsen Pharma (Barcelona, España).

El tampón fosfato (200 mM, pH 7.4) se preparó utilizando $\text{NaHPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ y NaH_2PO_4 con agua mili-Q; el pH de las disoluciones se midió utilizando un electrodo de vidrio y ajustándolo con una disolución de NaOH hasta obtener el valor de pH deseado.

Otros productos químicos empleados fueron: la forma acetilada de norfloxacin (ANFX) (ácido 7-(4-acetil-1-piperazinil)-1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico), su correspondiente éster metílico EANFX y el éster metílico de

pefloxacino (EPFX). Estos compuestos fueron preparados de acuerdo con la metodología descrita en la literatura [14].

III.5.2. Preparación de las muestras

Las muestras de las FQ fueron preparadas a diferentes concentraciones de PB, empleando como disolución madre una de 200 mM de PB a pH 7.4. Los ajustes de pH de las disoluciones, se realizaron añadiendo distintas cantidades de HCl o NaOH (12 M). Estas medidas, se llevaron a cabo utilizando un pHímetro Crison.

III.5.3. Experimentos de fotólisis de destello láser

Para registrar los espectros y las trazas de desactivación, se utilizó un sistema de fotólisis de destello láser formado por:

- 1) Una fuente de excitación consistente en un láser pulsado Nd-YAG de perfil gaussiano Spectron SL4004G-10, para excitar a 355 nm. La duración de cada pulso fue de ~ 10 ns, y la energía ca. 10 mJ/pulso.
- 2) Una fuente de emisión formada por una lámpara pulsada de Xenon (150 W) en una unidad Oriel 66151 y una fuente de alimentación Oriel 68806.
- 3) Un detector formado por un monocromador Oriel 77200 con un tubo fotomultiplicador Oriel 77348 en una unidad Oriel 70680 y una fuente de alimentación Oriel 70705.
- 4) Un osciloscopio Tektronix TDS 640A registraba las señales y las transfería a un ordenador personal para ser analizadas posteriormente.

Salvo algún caso particular, todas las disoluciones se prepararon en medio acuoso tamponado a pH 7.4, y la absorbancia de los compuestos era de ca. 0.3 a 355 nm. Cada una de las muestras, se purgó bajo N₂O para eliminar la señal del electrón solvatado. Los espectros y las señales de desactivación se registraron para varias disoluciones preparadas a distintos pH por adición de NaOH o HCl sobre disoluciones neutras tamponadas, cuando fuese necesario.

La determinación de las constantes de desactivación de los intermedios de las FQ (³FQ y SS) por el efecto de la presencia de tampón fosfato (PB), naproxeno (NPX), ácido 4-bifenilcarboxílico (BPC) y *L*-triptófano (Trp) se llevaron a cabo adicionando a cada FQ diferentes cantidades de desactivadores (PB desde 1 a 400 mM y NPX, BPC y Trp desde 0.1 a 5mM) comprobando además que no se producían variaciones en el

pH de las disoluciones. En estas condiciones, más del 99% de la luz era absorbida por la FQ.

Para determinar las constantes de desactivación (k_q) de las FQ, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer:

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k_q[Q]$$

en donde τ_0/τ son los tiempos de vida de cada una de las especies en ausencia/presencia de desactivador (Q).

El valor de los rendimientos cuánticos de cruce intersistema (ϕ_{CIS}) se estimó utilizando un método comparativo. Para ello se utilizó benzofenona (BP) en acetonitrilo y los valores de ϕ_{CIS} , se calcularon aplicando la siguiente ecuación:

$$\phi_{CIS}(FQ) = \phi_{CIS}(BP) \times \Delta A(^3FQ_{\lambda_{m\acute{a}x}}) \times \mathcal{E}(^3BP_{520nm}) / \Delta A(^3BP_{520nm}) \times \mathcal{E}(^3FQ_{\lambda_{m\acute{a}x}})$$

En donde $\Delta A(^3FQ_{\lambda_{m\acute{a}x}})$ hace referencia a cada uno de los tripletes de las FQ a una $\lambda_{m\acute{a}x}$ bajo atmósfera de N_2O , $\Delta A(^3BP_{520nm})$ se refiere a la absorbancia de 3BP a 520 nm. Como coeficiente de absorción molar triplete de BP y su rendimiento cuántico en acetonitrilo se tomaron los valores $\mathcal{E}(^3BP_{520nm}) = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\phi_{CIS}(BP) = 1$ respectivamente. Para el caso de NFX, el valor de \mathcal{E} de su triplete a 600 nm se tomó el valor $7900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16]. Para determinar el rendimiento cuántico de excímero (ϕ_{SS}) a diferentes pHs se utilizó la misma ecuación anterior y el valor $\mathcal{E}(SS_{NFX(\lambda_{m\acute{a}x})}) = 8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [7].

III.5.4. Medidas de fluorescencia

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron mediante la comparación de las áreas encerradas bajo las curvas de emisión empleando como patrón el sulfato de quinina ($\phi_F = 0.546$). Las variaciones de pH se ajustaron al valor de absorbancia 0.1 en el punto isobéptico que aparecía a 340 nm (longitud de onda de excitación).

III.5.5. Irradiaciones

Las irradiaciones se realizaron utilizando un fotoreactor multilámpara equipado con seis lámparas que emiten dentro del rango 310-390 nm (distribución gaussiana),

con un máximo en 350 nm. Las fotoreacciones se realizaron en condiciones anaeróbicas y fueron monitorizadas por HPLC empleando una columna C18 (25 x 0.4 cm y tamaño de partícula 5 μ m) y manteniendo un flujo constante de 0.7 mL/min de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético en proporciones 15/84.9/0.1 como fase móvil. La fotólisis de las disoluciones acuosas de (A)NFX a pH 7.4 se produjeron en presencia y ausencia de PB (10-100 mM).

Los rendimientos cuánticos se obtuvieron por comparación con el valor descrito en la literatura para la fotodegradación de NFX (ϕ_{deg} = 0.06) el cual se utilizó como actinómetro [15].

III.6. Referencias bibliográficas

1. Fasani, E.; Barberis Negra, F. F., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced C-F Bond Cleavage in Some Fluorinated 7-Amino-4-quinolone-3-carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5388–5395.
2. Freccero, M., Fasani, E., Mella, M., Manet, I., Monti, S., Albini, A. Modeling the Photochemistry of the Reference Phototoxic Drug Lomefloxacin by Steady-State and Time-Resolved Experiments, and DFT and Post-HF Calculations. *Chem-Eur. J.* **2008**, *14*, 653–663.
3. Cuquerella, M. C., Boscá, F., Miranda, M. A. Photonucleophilic Aromatic Substitution of 6-Fluoroquinolones in Basic Media: Triplet Quenching by Hydroxide Anion. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7256–7261.
4. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Boscá, F. Generation of Detectable Singlet Aryl Cations by Photodehalogenation of Fluoroquinolones. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, *110*, 2607–2612.
5. Monti, S., Sortino, S., Fasani, E., Albini, A. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: A study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 2185–2196.
6. Fasani, E., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Unexpected photoreactions of some 7-amino-6-fluoroquinolones in phosphate buffer. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2*, 391–397.
7. Lorenzo, F., Navaratnam, S., Allen, N. S. Formation of Secondary Triplet Species after Excitation of Fluoroquinolones in the Presence of Relatively Strong Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12238–12239.
8. Albini, A., Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 238–250.
9. Cuquerella, M. C., Boscá, F., Miranda, M. A., Belvedere, A., Catalfo, A., de Guidi, G. Photochemical Properties of Ofloxacin Involved in Oxidative DNA Damage: A Comparison with Rufloxacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 562–570.
10. Takacsnovak, K., Noszal, B., Hermeicz, I., Kereszturi, G., Podanyi, B., Szasz, G. Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 1023–1028.
11. Cai, J. J., Lim, E. C. Photophysical properties in the vapor of carbazole. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 3892–3896.
12. Cai, J.J., Lim, E. C. J. Intermolecular triplet excimers of aromatic molecules with

- permanent dipolar moments: carbazole, dibenzofurane and dibenzothiophene. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 2935–2937.
13. Wang, X., Tian, J., Kofron, W. G., Lim, E. C. *J. Phys. Chem. A*. Time-Resolved Emission Studies of Intermolecular Triplet Excimers in Fluid Solutions: Dibenzofuran and Dibenzothiophene Revisited. **1999**, *103*, 1560–1565.
 14. Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M. C., Castell, J. V., Boscá, F., Miranda, M. A. Triplet Excited Fluoroquinolones as Mediators for Thymine Cyclobutane Dimer Formation in DNA. *J. Phys. Chem. B*. **2007**, *111*, 7409–7414.
 15. Monti, S., Sortino, S., Fasani, E., Albini, A. Multifaceted Photoreactivity of 6-Fluoro-7-aminoquinolones from the Lowest Excited States in Aqueous Media: A Study by Nanosecond and Picosecond Spectroscopic Techniques. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2185–2196.
 16. Lorenzo, F., Navaratnam, S., Edge, R., Allen, N. S. Primary Photoprocesses in a Fluoroquinolone Antibiotic Sarafloxacin. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 886–894.
 17. Bazin, M., Boscá, F., Marín, M. L., Miranda, M. A., Patterson, L.K., Santus, R. A Laser Flash Photolysis and Pulse Radiolysis Study of Primary Photochemical Processes of Flumequine. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 451–457.
 18. Wang, X., Kofron, W. G., Kong, S., Rajesh, C. S., Modarelli, D.A., Lim, E. C. Transient Absorption Probe of Intermolecular Triplet Excimer of Naphthalene in Fluid Solutions: Identification of the Species Based on Comparison to the Intramolecular Triplet Excimers of Covalently-Linked Dimers. *J. Phys. Chem. A*. **2000**, *104*, 1461–1465
 19. Von Sonntag, J., Mvula, E., Hildenbrand, K., Von Sonntag, C. Photohydroxylation of 1,4-Benzoquinone in Aqueous Solution Revisited. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 440–451.
 20. East, A. L. L., Lim, E. C. Naphthalene dimer: Electronic states, excimers and triplet decay. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 8981–8994.
 21. Coropceanu, V., Cornil, J., da Silva Filho, D. A., Olivier, Y., Silbey, R., Brédas, J.L. Charge Transport in Organic Semiconductors. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 926–952.
 22. Pabst, M., Köhn, A. Excited States of [3.3](4,4')Biphenylophane: The Role of Charge-Transfer Excitations in Dimers With π - π Interaction. *J. Phys. Chem. A*. **2010**, *114*, 1639–1649.
 23. Palumbo, M., Gatto, B., Zagotto, G., Palù, G. In vitro activity of sparfloxacin in comparison with currently available antimicrobials against respiratory tracts pathogen. *Trends Microbiol.* **1993**, *1*, 232–235.

24. Encinas, S., Boscá, F., Miranda, M. A. Phototoxicity Associated with Diclofenac: A Photophysical, Photochemical, and Photobiological Study on the Drug and Its Photoproducts. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 640–645.
25. Freeman, P. K., Ramnath, N., Richardson, A. D. Photochemistry of polyhaloarenes. 8. The photodechlorination of pentachlorobenzene. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3643–3646.
26. Konstantinov, A., Kingsmill, C. A., Ferguson, G., Bunce, N. J. Successive Photosubstitution of Hexachlorobenzene with Cyanide Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5464–5468.
27. Benten, H., Guo, J., Ohkita, H., Ito, S., Yamamoto, M., Sakumoto, N., Hori, K., Tohda, Y., Tani, K. J. Intramolecular Singlet and Triplet Excimers of Triply Bridged [3.3.n](3,6,9)Carbazolophanes. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 10905–10914.

IV.1. Introducción

Como se comentó en la introducción general, las FQ, debido a su actividad antitumoral, están despertando gran interés durante los últimos años [1-3]. Estudios *in vitro* e *in vivo* han corroborado los efectos anticancerígenos de éstos compuestos reduciendo la mortalidad en pacientes con cáncer. Así, su mecanismo de acción se produce mediante la inhibición de las topoisomerasas (I y II) y de la ADN polimerasa lo que desencadena efectos genotóxicos en sistemas eucarióticos. Se ha observado que radiaciones UV incrementan estos efectos lo que confiere a estas moléculas propiedades fotoquimioterapéuticas [4].

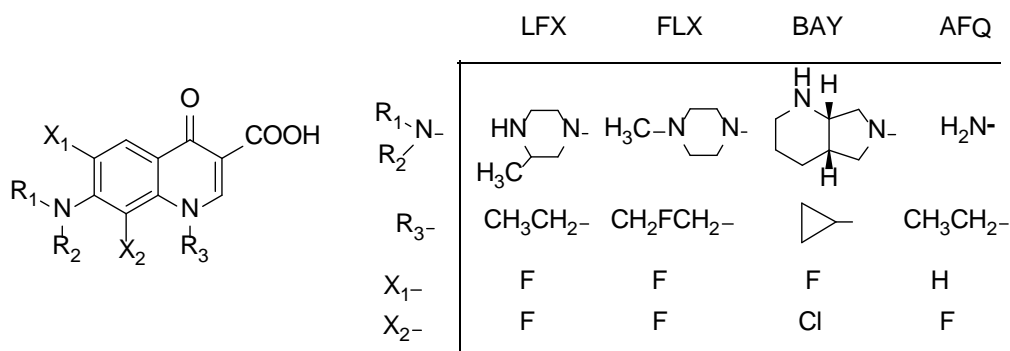
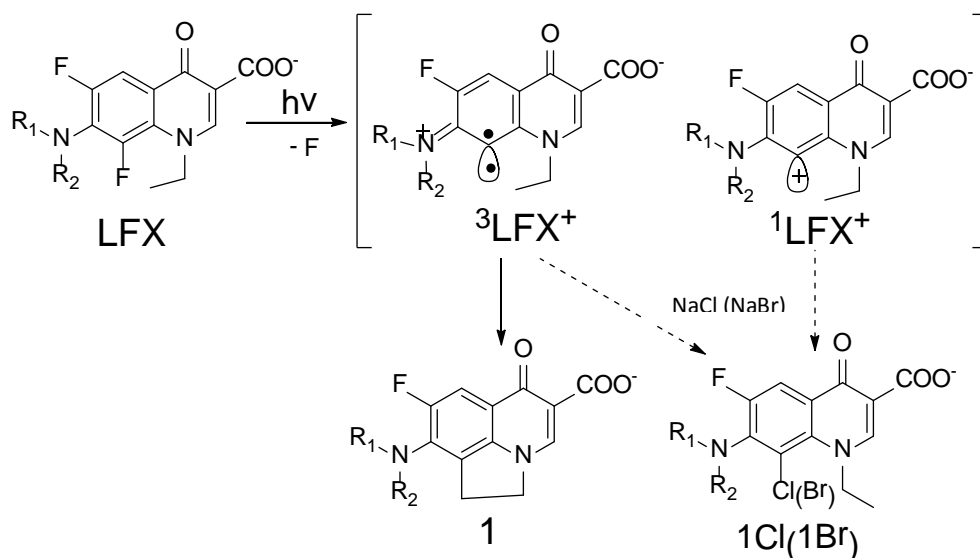


Figura IV.1. Estructura de las FQ fotogenotóxicas y el modelo AFQ.

Esta genotoxicidad fotoinducida ha sido detectada en FQ dihalogenadas como fleroxacino (FLX), 3118BAY y lomefloxacino (LFX), habiéndose este último compuesto propuesto como modelo para estudiar la acción fotomutagénica de fármacos (Figura IV.1) [5-10].

Las FQ dihalogenadas muestran una inusual fotodeshalogenación por heterólisis del enlace C8-halógeno [6,7]. La generación de un catión arilo parece ser el intermedio clave para conocer las propiedades de fotounión de las FQ a biomoléculas [8,9]. Sin embargo, en la literatura existen controversias en cuanto a la interpretación de la naturaleza de dicho intermedio [10-12]. De hecho, mientras unos estudios llevados a cabo con LFX han asignado al catión arilo detectado naturaleza de carbeno con carácter triplete (³LFX⁺) otros autores lo atribuyen a un carbocatión con carácter singlete (¹LFX⁺) [10-12].



Esquema IV.1. Fotodegradación de LFX en medio neutro acuoso con y sin haluros presentes.

La asignación del catión arilo como especie ³LFX⁺ se basó en la falta de reactividad entre el catión arilo y el agua como medio electrófilo así como en cálculos teóricos. En ellos se determinó que el carbeno triplete generado por la pérdida del flúor de una aminofluoroquinolona (AFQ) tenía un estado energético de menor energía que su carbocatión singlete [12]. Sin embargo, la elevada reactividad del intermedio generado en el proceso de deshalogenación de LFX con Br⁻ y Cl⁻, así como su inapreciable reactividad por el oxígeno molecular parecían indicar que la especie detectada era el ¹LFX⁺ [12]. En cuanto a la fotodegradación de LFX, se ha establecido que el fotoproducto 1 se genera por una reacción intramolecular del cromóforo de ³LFX⁺ con un enlace contiguo C-H que se encuentra en la posición β respecto del grupo N-etilo. Sin embargo, otro punto en discordia es la formación de los fotoproductos 1Cl y 1Br (Esquema IV.1.) [10-12].

Tomando como partida los resultados descritos en la bibliografía, y considerando que la acetilación del anillo piperacínico de norfloxacino, un cambio periférico del esqueleto heterocíclico de esta FQ produce importantes cambios en las propiedades fotofísicas de sus estados excitados singlete y triplete, es de suponer que la modificación de todo el sustituyente (el anillo piperacínico) de una FQ debería influir en el comportamiento fotofísico y/o fotoquímico de las 6,8-fluoroquinolonas dihalogenadas. Así, en los cálculos teóricos realizados la deshalogenación de AFQ no deberían ser extrapolados *a priori* con FQ como LFX, FLX o BAY. Si esto fuera cierto, sería razonable pensar que el intermedio detectado es el carbocatión singlete. Con el fin analizar esta hipótesis se decidió estudiar la fotoquímica y fotofísica de LFX y compararla con su derivado acetilado en N (4') (ALFX). Para realizar este estudio

utilizamos tanto técnicas resueltas en el tiempo (fluorescencia y fotólisis de destello laser (FDL)) como en fase estacionario (fluorescencias). Además se realizaron estudios de fotodegradación e identificación de fotoproductos. Todo ello se realizó tanto en medios acuosos neutros como a pHs básicos.

IV.2. Resultados

IV.2.1. Fluorescencias de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX)

Se analizarán las propiedades del estado excitado singlete de ambas FQ (LFX, ALFX) en medio acuoso tamponados con 1mM PB mediante medidas de fluorescencia.

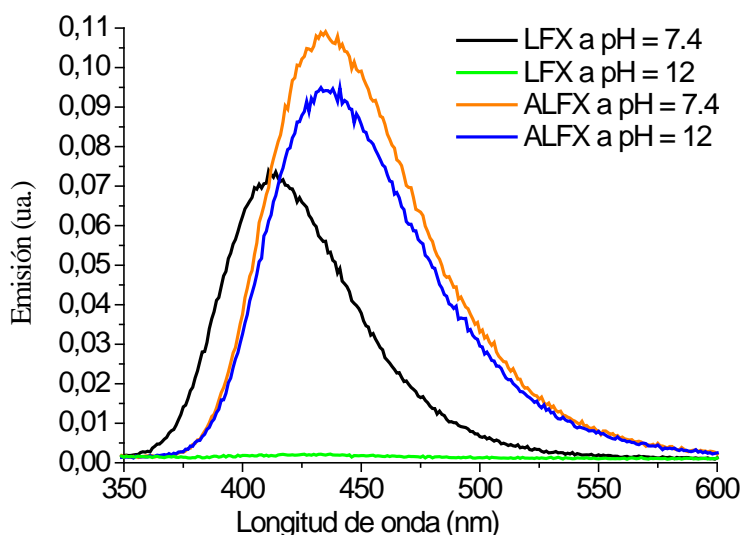


Figura IV.2. Espectro de emisión de LFX y ALFX en medio acuoso a pH 7.4 y pH 12.0 a una longitud de onda de excitación de 320 nm.

Al comparar un compuesto con otro se observó como el derivado acetilado (ALFX) tiene una emisión más desplazada hacia el rojo (Figura IV.2) de manera que el máximo de emisión de LFX se encuentra centrado ca. 420 nm mientras que el de ALFX está ca. 445 nm. También se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) los cuales eran ligeramente distintos (τ ca.1.2 ns para LFX y 1.7 ns para ALFX, respectivamente).

Además, variando el pH hasta 12.0 se observó que la fluorescencia apenas cambiaba para ALFX y prácticamente desaparecía para LFX. Con ello, a pH ca. 12.0 el estado singlete de LFX (1 LFX) debe tener una nueva ruta de reacción la cual, podría seguir un camino similar al descrito para NFX a pHs básicos [12]. Así, una reacción de

transferencia intramolecular entre el par del N (4') y el anillo quinolínico podría estar inhibiendo la fluorescencia de ^1LFX .

IV.2.2. Intermedios de fotodegradación de lomefoxacino (LFX) y su derivado acetilado (ALFX)

En los estudios de fotólisis de destello láser se prepararon muestras de 10^{-4} M LFX y ALFX en medios acuosos a pH 7.4 que fueron purgadas con N_2 , N_2O o O_2 con el propósito de observar intermedios de reacción de vida media corta (entre cientos de nanosegundos hasta milisegundos) y ver cuáles de ellos se afectaban por la presencia de N_2O y/o O_2 .

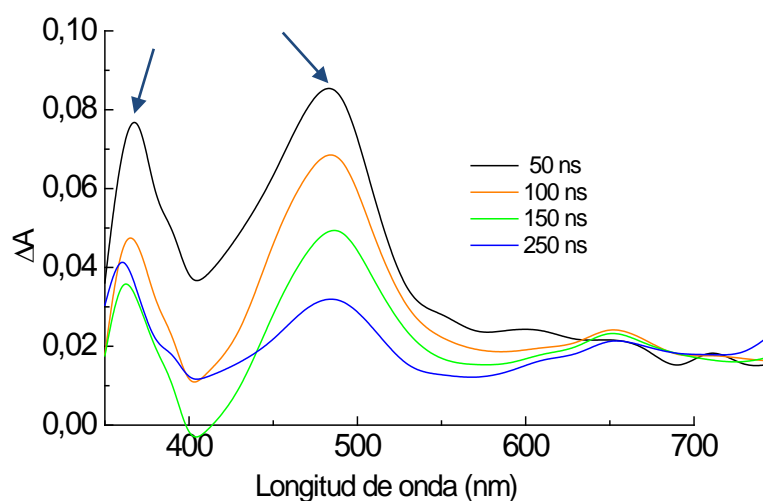


Figura IV.3. Espectros de absorción de las especies transitorias de LFX en disoluciones acuosas a pH 7.4 y condiciones anaeróbicas (N_2O) a distintos tiempos después de la excitación a 355 nm. Las flechas muestran los máximos a 370 y 490 nm respectivamente.

Los estudios mostraron la influencia de la N-acetilación del anillo piperazínico en las propiedades espectroscópicas y cinéticas de los intermedios detectados para estas FQ. De hecho, ambos compuestos burbujeados bajo N_2O y a pH 7.4 mostraron diferentes espectros de absorción. Se detectaron dos especies intermedias para cada FQ. En el caso de LFX (Figura IV.3), la primera absorbía con una $\lambda_{\text{máx}}$ ca. 370 nm y mostraba tener un tiempo de vida (τ) de ca. 30 ns. Esta especie fue inicialmente asignada al estado triplete ^3LFX [11], pero como todos los estados tripletes de las FQ (^3FQ) muestran especies de absorción con máximos a longitudes de onda mucho más altas ($\lambda_{\text{máx}}$ entre 500-600 nm) [13,14], el intermedio detectado probablemente pueda ser asignado al carbeno triplete $^3\text{LFX}^+$ ya que existe una similitud importante entre el

espectro de absorción de la especie que asignamos como $^3\text{LFX}^+$ y otras observadas para otros carbenos triplete [15,16].

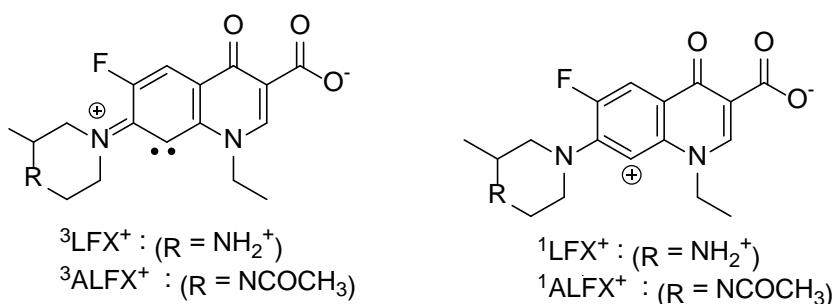
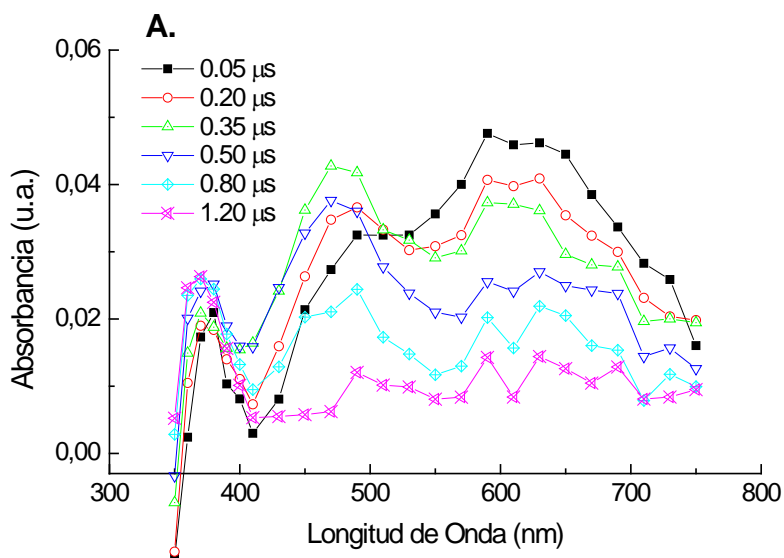


Figura IV.4. Estructura de los cationes arilo y carbeno de (A)LFX

La segunda de especie intermedia aparece a $\lambda_{\text{máx}}$ ca. 490 nm y posee un tiempo de vida más largo que la anterior (200 ns). Dicha especie se corresponde con el catión arilo. Sin embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, la naturaleza de éste intermedio no está claramente establecida, puesto que podría tratarse de $^1\text{LFX}^+$ o de $^3\text{LFX}^+$ [10-12], ya que unos autores proponen que ésta especie como carbeno con carácter triplete mientras que otros presuponen que debe ser un carbocatión arílico con carácter singlete estabilizado en disolución acuosa (Figura IV.4.).



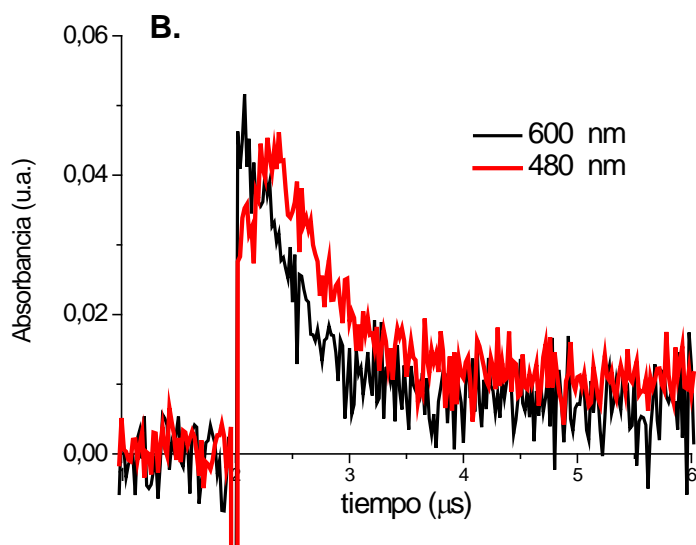


Figura IV.5. (A) Espectro de absorción de ALFX (10^{-4} M) en medio acuoso a pH 7.4 en atmósfera de N_2O a distintos tiempos después de un pulso de luz láser a 355 nm. **(B)** Trazas obtenidas a 480 y 600 nm en experimentos de fotólisis de destello láser (excitación 355 nm) de disoluciones acuosas de ALFX a pH 7.4.

En el caso de ALFX, los dos intermedios que se detectaron mostraban $\lambda_{m\acute{a}x}$ ca. 600 y 480 nm con unos tiempos de vida ca. 340 y 440 ns, respectivamente. Observando la Figura IV.5 se puede ver cómo la especie cuyo máximo aparece a 480 nm (A) se forma a la misma velocidad que desaparece la especie con máximo de absorción a 600 nm (B).

Para poder caracterizar ambas especies, se realizó un estudio similar al descrito para los intermedios de LFX [12]. Con ello se observó que ambas bandas no se desactivan por la presencia de O_2 en el medio, lo cual indica que las dos especies intermedias no pueden ser ni una especie excitada triplete ni un catión arilo con carácter carbeno, ya que si así fuera ambas presentarían reactividad y difusión controlada frente a O_2 [15-17]. También se realizaron estudios de reactividad de las especies intermedias detectadas con ALFX en presencia de diferentes aniones (Cl^- , Br^- , I^- y OH^-) ya que ello nos permitiría determinar si alguna de las especies transitorias correspondía a un carbocatión arílico.

Tabla IV.1. Reactividad de los intermedios de reacción asignados como $^1\text{LFX}^+$ ($\lambda_{\text{máx}}$ ca. 480 nm) y $^1\text{ALFX}^+$ ($\lambda_{\text{máx}}$ ca. 600 nm) en presencia de diferentes reactivos.

Reactivo	$K_{\text{LFX}}^a (10^9)$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_{\text{ALFX}} (10^9)$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
O_2	<0,001	<0,001
Cl^-	0,4	0,05
Br^-	4	0,5
I^-	7	0,7
OH^-	---	0,1

^aValores similares a los descritos en la literatura [12]

Estos experimentos con diferentes aniones (Cl^- , Br^- , I^- , OH^-) se realizaron no solo con ALFX sino también con LFX con el propósito de poder comparar así la reactividad de sus intermedios en unas condiciones de reacción similares (ver resultados en Tabla IV.1).

Tras realizar estos experimentos de fotólisis de destello láser con ALFX (Figura IV.6.) se vio que su primer intermedio ($\lambda_{\text{máx}}$ ca. 600 nm) era reactivo a los diferentes aniones mientras que el segundo intermedio ($\lambda_{\text{máx}}$ ca. 480 nm) no alteraba su tiempo de vida pero era generado en menor cantidad a medida que se iban adicionando mayores cantidades de los aniones (ver ejemplo con anión cloruro en Figura IV.6). Como puede verse en la Tabla IV.1, los valores de las constantes de ALFX son diez veces menores que las constantes correspondientes a LFX las cuales son similares a las que ya estaban descritas en la literatura [10-12]. Con ello, el primer intermedio detectado en disoluciones acuosas con ALFX podría asignarse como el carbocatión $^1\text{ALFX}^+$. El hecho de que este sea 10 veces menos reactivo que $^1\text{LFX}^+$ corroboraría la importancia de la acetilación del anillo piperazínico en la reactividad de este tipo de catión arílico.

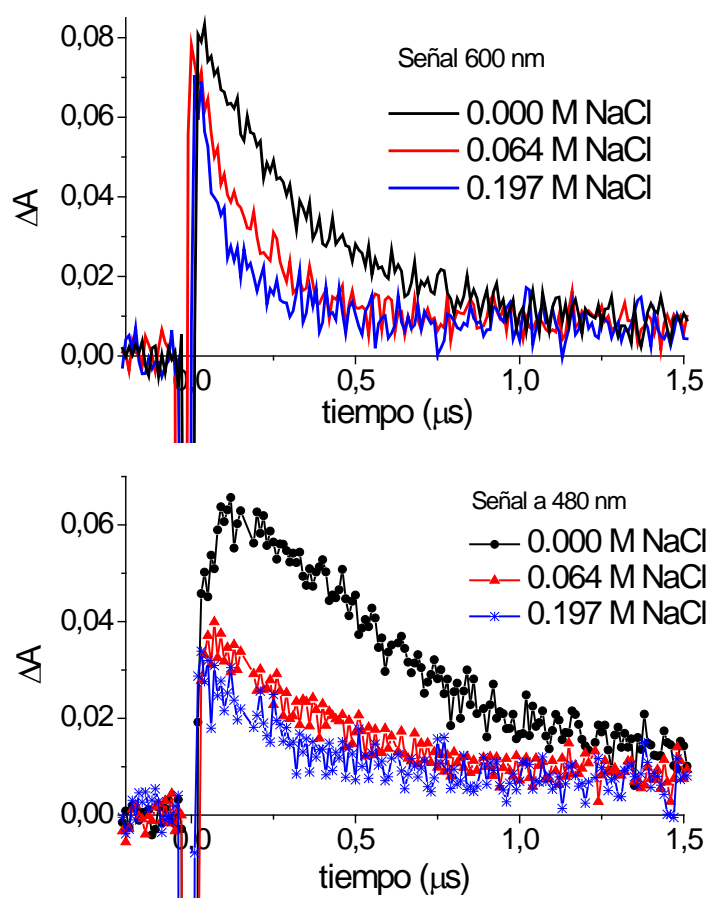


Figura IV.6. Cinética de ALFX en disolución acuosa en ausencia/ presencia de NaCl a 600 y 480 nm.

Cuando los experimentos de fotólisis de destello láser para (A) LFX se realizaron en disoluciones acuosas 1mM PB a pH 12.0, los resultados que se obtuvieron con LFX fueron negativos, es decir no se detectaron especies intermedias. Sin embargo, en el caso de ALFX, el catión arilo $^1\text{ALFX}^+$ sí fue detectado. Además, con las medidas de fotólisis de destello láser en condiciones básicas también se pudo observar cómo el anión hidroxilo desactivaba la especie $^1\text{ALFX}^+$ así como determinar su constante (k_q $0.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El aumento de la cantidad de aniones OH^- , como ya se observó con los haluros, también producía una generación más rápida y menor del segundo intermedio.

IV.2.3. Fotodegradación de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX)

Los resultados fotofísicos fueron complementados con estudios de fotodegradación de las FQ. Con el estudio de los fotoproductos de LFX y ALFX se pretendía poder confirmar los intermedios implicados en la fotólisis de cada FQ

Tabla IV.2. Rendimientos cuánticos de fluorescencia y fotodegradación de LFX y ALFX en disoluciones acuosas a pHs 7.4 y 12.

	LFX		ALFX	
	ϕ_F	ϕ_D	ϕ_F	ϕ_D
pH 7,4	0,08 ^a	0,55 ^a	0,11	0,6
pH 12	<0,002	0,25	0,095	0,4

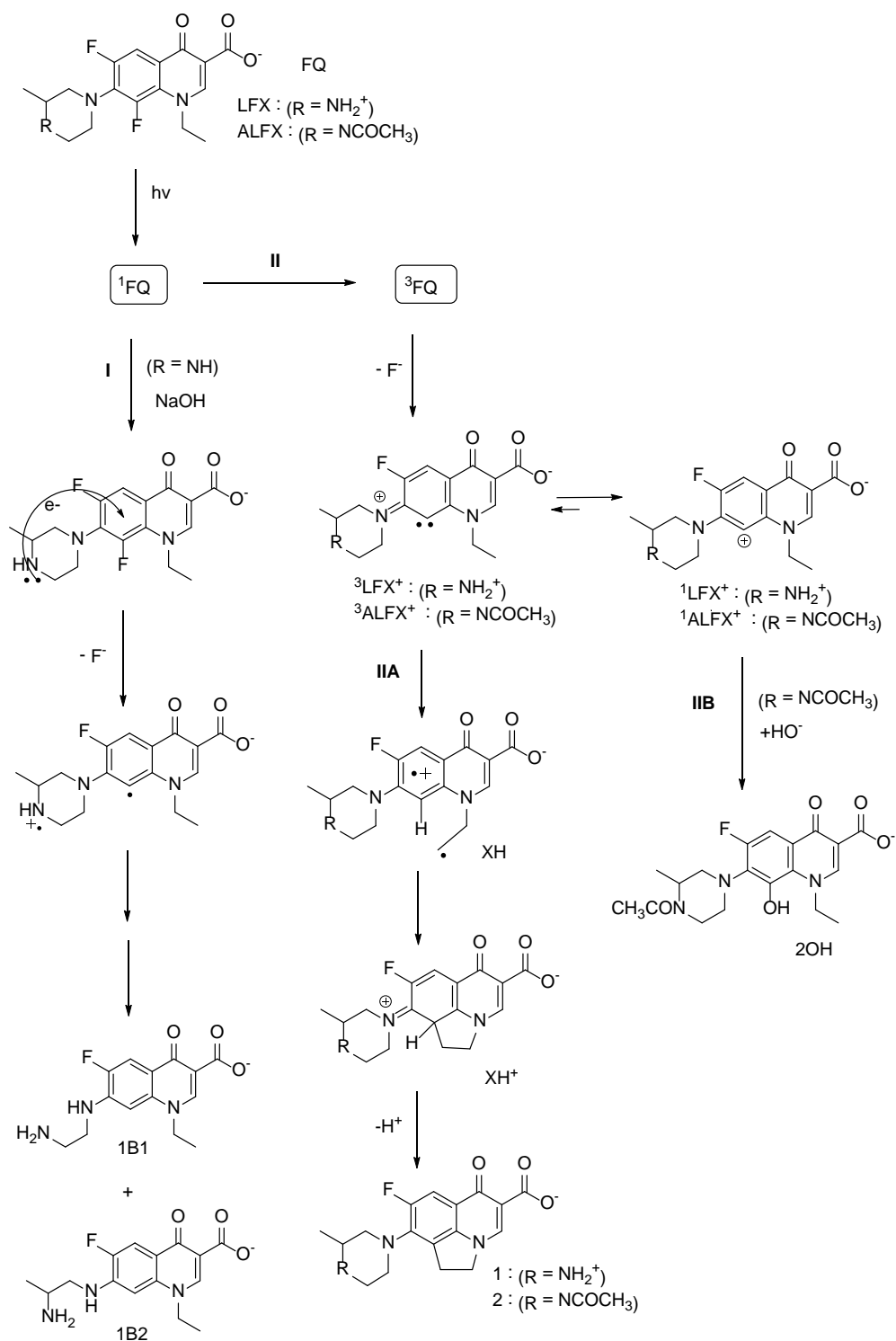
^aValores descritos en la literatura [12].

Para ello se llevaron a cabo irradiaciones en medio acuoso bajo atmósfera inerte de N₂ a pHs 7.4 y 12.0 en un fotoreactor multilámpara utilizando luz UVA a $\lambda_{m\acute{a}x}$ ca. 350 nm. Los estudios cinéticos mostraron rendimientos de fotodegradación (ϕ_{deg}) muy similares para LFX y ALFX a pH 7.4 (Tabla IV.2). Sin embargo, en condiciones básicas, los valores de ϕ_{deg} mostraron importantes diferencias.

En cuanto al análisis de los fotoproductos de degradación, a pH 7.4 se detectó la formación mayoritaria de **1** [18] para LFX y de **2** para ALFX (compuestos mostrados en esquema IV.2). Sin embargo a pH 12 los fotoproductos detectados para LFX fueron **1B1** y **1B2** [19] mientras que en la fotólisis de ALFX detectamos los fotoproductos **2** y **2OH** (la estructura de estos compuestos fue inequívocamente asignada mediante RMN de protón y carbono así como por masa exacta. Todos los detalles se encuentran en la parte experimental).

Para poder racionalizar mejor todos los resultados obtenidos también se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) de ambas FQ a pH 7.4 y 12. Los resultados solo mostraron un gran descenso en la fluorescencia de LFX a pH 12, la cual nos indicaría que la fotodegradación de LFX debe seguir un mecanismo totalmente diferente al descrito a pH neutro.

IV.2.4. Mecanismos de fotodegradación de lomefloxacino (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX)



Esquema IV.2. Mecanismos de fotodegradación para (A)LFX en disolución acuosa.

En el Esquema IV.2 se muestran los mecanismos de fotodegradación que justifican todos los resultados obtenidos para (A)LFX. La vía I explica la fotodegradación de LFX en medio básico. Así una reacción de transferencia electrónica intramolecular entre el par de electrones del N (4') del anillo piperazínico y el anillo quinolínico y su posterior deshalogenación da lugar a un radical bencílico a partir del cual se generan los fotoproductos **1B1** y **1B2**. Esta nueva vía de reacción también justifica el descenso de fluorescencia de LFX en medio básico (Figura IV.2 y Tabla IV.2). Por otra parte, estos resultados además descartan claramente la participación del estado triplete de LFX y la del catión arilo propuesto en estudios previos [19].

En el caso de ALFX, como la vía I no puede ocurrir, sus propiedades fotofísicas prácticamente no se alteran y en cuanto a las fotoquímicas, estas varían por la presencia de los aniones hidroxilo. Así ALFX sigue la vía II, la cual es común para ambas fluoroquinolonas en medio neutro (concretamente la vía IIA). Sin embargo, la presencia de aniones hidroxilo en disoluciones donde se genera el carbocatión ${}^1\text{ALFX}^+$ produce una reacción entre ellos (ataque nucleofílico del anión sobre ${}^1\text{ALFX}^+$) dando lugar a la formación del fotoproducto **2OH** (vía IIB). Esta reacción se detecta en los experimentos de FDL donde la especie ${}^1\text{ALFX}^+$, caracterizada como tal (detalles en la Sección IV.2.2), se desactiva por los aniones hidroxilo. Además muestra su máximo de absorción a 600 nm, muy lejos del observado para LFX (${}^1\text{ALFX}^+$), lo cual claramente indica que una pequeña modificación periférica como la acetilación el N (4') del anillo piperazínico modifica, no solo el espectro de absorción de su carbocatión singlete (Figuras IV.3 y IV.5), sino también su reactividad (Tabla IV.1).

Por otra parte, la estructura de la especie transitoria detectada a $\lambda_{\text{máx}}$ ca. 480 nm podría corresponder a su diradical XH, pero no a su catión XH^+ ya este intermedio reaccionaría con OH^- y éste hecho no fue observado (Esquema IV.2, vía IIA).

IV.3. Discusión y Conclusiones

En función de todos los resultados obtenidos, y tal como se ha demostrado en el presente capítulo, existe una clara contribución de los carbocationes ${}^1\text{LFX}^+$ y ${}^1\text{ALFX}^+$ en las fotodeshalogenaciones de (A) LFX a pHs neutros. Además, teniendo en cuenta los diferentes caminos de fotodegradación mostrados en el esquema IV.2, la fotoquímica de otras quinolonas 6,8-dihalogenadas como fleroxacino [20] y BAY y3118 [12] así como las propiedades alquilantes descritas para éste tipo de fluoroquinolonas puede ser ahora entendida mediante la participación de los cationes arilo singlete.

Por otra parte, los resultados muestran la importancia de sustituyentes periféricos N-alquílicos sobre las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de las quinolonas 6,8-dihalogenadas. Así, variando los sustituyentes de las FQ es posible modular no solo sus propiedades farmacológicas si no también la reactividad de los cationes arilo involucrados, lo cual podría ser utilizado para diseñar una nueva familia de fármacos con propiedades fotoquimioterapéuticas.

IV.4. Procedimiento experimental

IV.4.1. Materiales y preparación de disoluciones

Lomefloxacino (LFX), ácido trifluoroacético (TFA), cloroformo deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD), metanol y acetonitrilo (grado de pureza HPLC), anhídrido acético y otros productos químicos, son de origen comercial (Sigma-Aldrich).

Todas las disoluciones a distintos valores de pH fueron preparadas adicionando pequeñas cantidades de disoluciones de NaOH (desde 0.1 a 0.0001M) hasta obtener el valor de pH deseado (medido mediante un electrodo de vidrio).

IV.4.2. Equipamiento

Los espectros ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro UV/VIS con una apertura de ventana de 5nm. Los análisis de HPLC se realizaron en un equipo Varian System formado por con una bomba 9012Q y un detector de red de diodos (DAD) (Varian 9065). El rango de longitudes de onda del detector fue de 200 a 360 nm; normalmente, los cromatogramas se obtuvieron a 320 nm como longitud de onda de detección. Las muestras se inyectaron en una columna analítica Waters Spherisorb® S5 OD32 (20 x 250 mm) con una velocidad de flujo de 1mL/min con una disolución acetonitrilo/agua ácida a pH=3.

Para registrar los espectros y las trazas de desactivación, se utilizó un sistema de fotólisis de destello láser cuyas especificaciones se muestran en el apartado III.5.3de la presente tesis.

Los espectros $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ se registraron en un equipo de 500 y 600 MHz, utilizando CDCl_3 como disolvente, tomando la señal correspondiente al disolvente como referencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en un fluorímetro Photon Technology International (PTI) LPS-220B. Los tiempos de vida fueron registrados en un espectrofotómetro TimeMaster TM-2/2003 utilizando una lámpara de hidrógeno/nitrógeno (anchura de pulso 1.8 ns).

Las irradiaciones se llevaron a cabo utilizando un fotoreactor multilámpara MLU12 equipado con seis lámparas que emiten dentro de un rango de longitudes de onda entre 310-390 nm, con un máximo en 350 nm.

Para llevar a cabo el análisis de masa exacta de los fotoproductos se utilizó un equipo UPLC-Masas que constaba de un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) equipado con un autosampler a 4 °C. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm), manteniendo la temperatura de la columna en 40 °C. Para el análisis se empleó un gradiente, utilizando como fase móvil una mezcla creciente de metanol/agua que contenía un 0.01% de ácido fórmico en la fase acuosa. El volumen de inyección fue de 2 mL.

El espectrofotómetro Waters ACQUITY™ XevoQToF (Waters Corp.) se conectó al sistema UPLC a través de una interfase (ESI). La fuente ESI, operó en modo ionización positivo con un voltaje de 3.0 kV. La temperatura se mantuvo entre los 100 °C y 400 °C. Todos los datos se recogieron usando un software Masslynx™ (Waters Corp.).

IV.4.3. Medidas de absorción y emisión

La concentración de las muestras se fijó ajustando la absorbancia de las disoluciones al valor arbitrario de 0.3 a la longitud de onda de excitación de 320 nm. Con ello se pudieron determinar los rendimientos cuánticos de fluorescencia y los tiempos de vida de fluorescencia. El rendimiento cuántico de fluorescencia del bisulfato de quinina en 1N, H₂SO₄ ($\phi_F = 0.546$), se usó como estándar.

IV.4.4. Experimentos de fotólisis de destello láser

Muestras de LFX y ALFX fueron preparadas en disolución acuosa, ajustando la absorbancia a 0.3 a 355 nm y, salvo otras indicaciones, se burbujearon bajo atmósfera de N₂O.

Los experimentos con iones haluro se llevaron a cabo manteniendo constante en todo momento el valor de pH a 7.4 y la fuerza iónica controlando las cantidades de 0.1 M NaClO₄. Las concentraciones de haluros se mantuvieron dentro del rango de

10^{-4} a 2×10^{-1} M. Los estudios en medios básicos, también se llevaron a cabo manteniendo también constante la fuerza iónica.

La determinación de las constantes de desactivación por el efecto de los iones haluro e hidróxido, se determinaron mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación IV.3.4).

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k [Q]$$

Ecuación IV.1. Ecuación de Stern-Volmer

IV.4.5. Síntesis de ácido 7-(4-acetil-3-metil-1-piperazinil)-1-etil-6,8-difluoro-2,3-dihidro-4-oxo-quinolin-3-carboxílico (ALFX)

Una disolución de ácido 1-etil-6,8-difluoro-7-(3-metil-1-piperazinil) 2,3-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico (LFX) (150 mg, 0.47 mmol) en anhídrido acético (25 mL) se puso a reflujo durante 5h. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró en el rotavapor la disolución resultante. El residuo se disolvió en agua básica hasta alcanzar un pH final de 7.4 y se extrajo en CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). El resto de agua de la fase orgánica se eliminó con MgSO_4 y posteriormente se evaporó el disolvente en un rotavapor. La mezcla resultante fue purificada mediante columna de sílica gel usando cloroformo/metanol como eluyente en proporción (98:2).

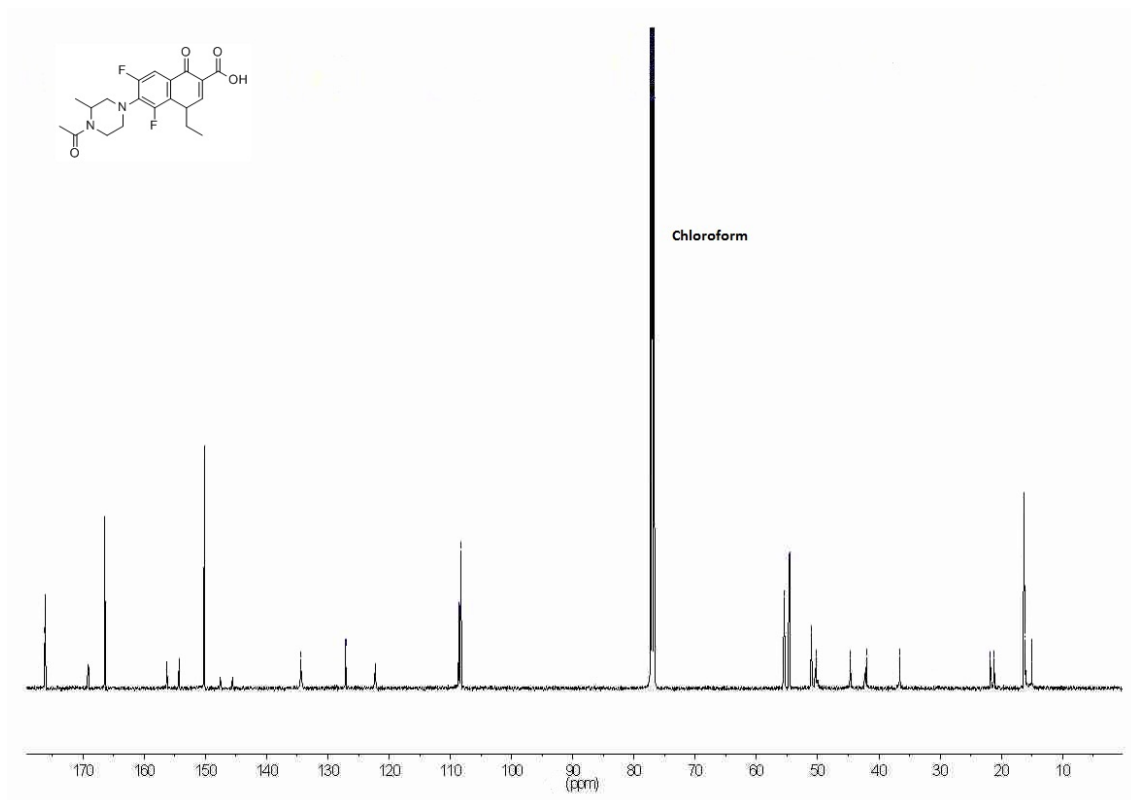
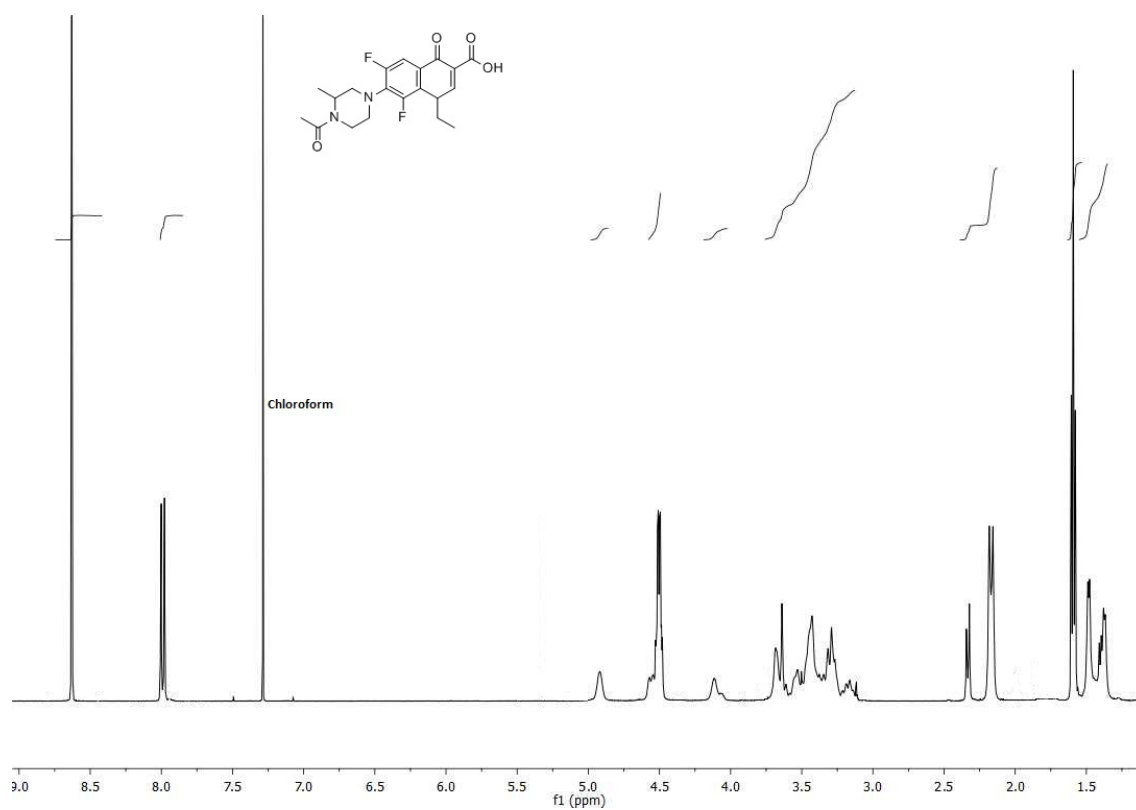


Figura IV.7. Espectros RMN (^1H , ^{13}C) de ALFX.

Las señales de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (^1H RMN, ^{13}C RMN) y las masas obtenidas en el equipo UPLC-masas, fueron las mostradas en la Figura IV.7 y se detallan a continuación:

- ^1H RMN [500 MHz, CDCl_3] δ 1.45 (dd, 3H, $J=7$ Hz), 1.58 (m, 3H), 2.15, 2.30 (dos d, 3H, $J=14.7$ Hz), 3.50 (m, 6H), 4.09, 4.88 (dos m, 1H), 4.50 (m, 2H) 7.96 (d, 1H, $J=14.7$ Hz), 8.60 (s, 1H), 14.59 (s, -OH).
- ^{13}C RMN δ 15.09, 16.13, 16.33, 21.20, 21.79, 36.66, 42.03, 44.68, 51.01, 54.55, 54.68, 55.54, 108.27, 108.64, 122.0, 127.06, 134.37, 147.2 (CF, $J=271.25$ Hz), 150.15, 155.9 (CF, $J=271.25$ Hz), 166.41, 168.2, 176.23.
- Masa exacta: m/z, encontrada 394.1568, calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4$ (MH^+) 394.1578.

IV.4.6. Estudios cinéticos y caracterización de fotoproductos

Se realizó la irradiación de disoluciones acuosas de (A)LFX (60 μM) a pH 7.4 y 12. La fuerza iónica se mantuvo constante durante todo el experimento controlando las cantidades de NaClO_4 (0.1 M).

Los rendimientos cuánticos, se obtuvieron por comparación con el valor del rendimiento cuántico de LFX obtenido por su fotodegradación en agua a pH 7.4 ($\phi = 0.6$). Los fotoproductos correspondientes, fueron identificados mediante la técnica de UPLC-Masas y el análisis cromatográfico.

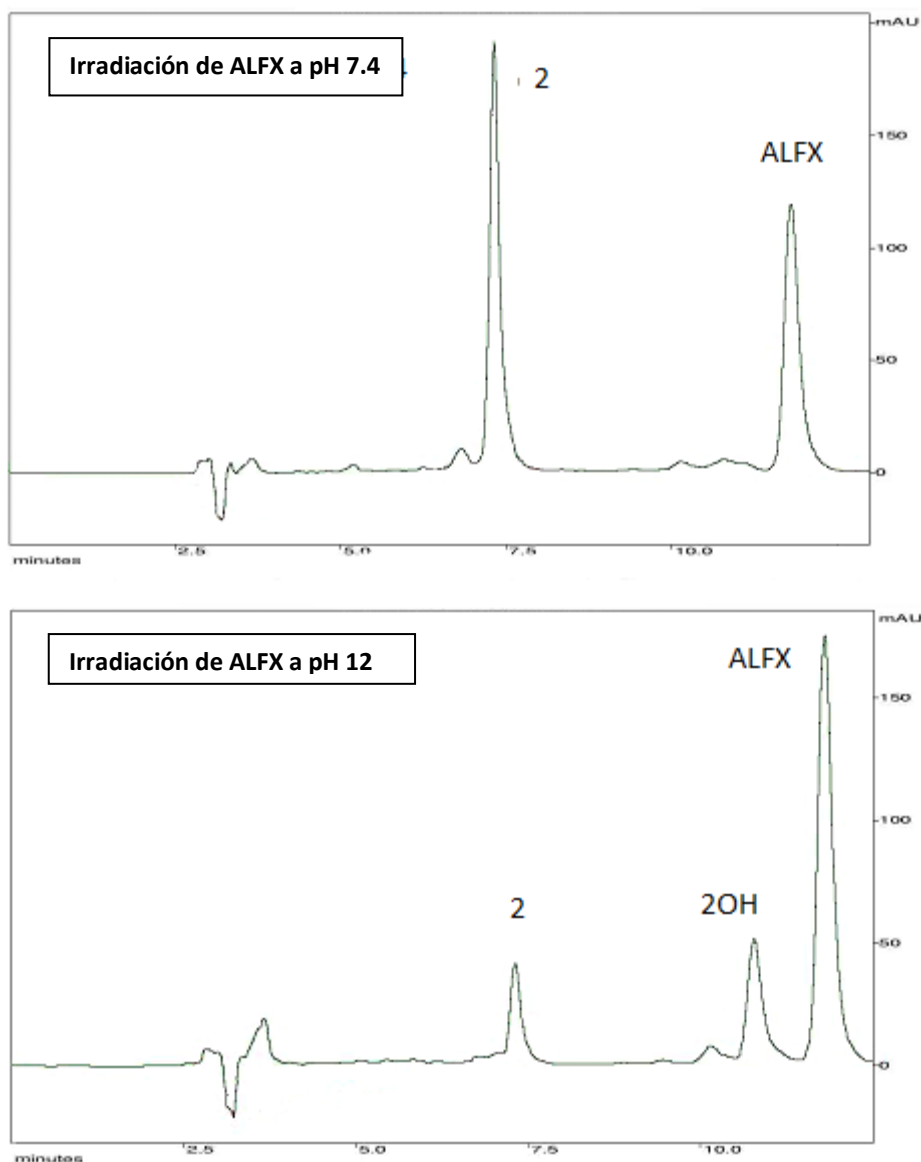


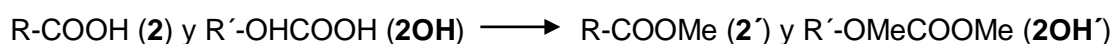
Figura IV.8. Cromatogramas de irradiaciones a pH 7.4 y 12 de ALFX.

Las fotorreacciones se realizan bajo condiciones anaeróbicas y fueron seguidas mediante HPLC, monitorizando los cromatogramas a una longitud de onda de 320 nm. Se utilizó una columna Spherisorb® S5 OD32 (20 x 250 mm), manteniendo un flujo constante de 0.7 mL/min y utilizando acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético como eluyente, en proporción 20/79/0.1 y 35/65/0.1 para LFX y ALFX respectivamente.

Así, se pudo identificar el fotoproducto **1** como el mayoritario para la fotólisis de LFX a pH 7.4, lo cual está de acuerdo con lo descrito en la literatura [18]. Cuando la irradiación se llevó a cabo a pH 12, se generaron los fotoproductos **1B1** y **1B2** que también concuerdan con los antecedentes bibliográficos [19].

Cuando ALFX se irradió a pH 7.4 se detectó el fotoproducto **2**, que tenía una masa exacta (m/z) de 374.1530, calculada para $C_{19}H_{21}FN_3O_4$ (MH^+) 374.1516. Cuando el pH era de 12.0, los fotoproductos mayoritarios fueron el **2** y el **2OH** con unas masas exactas m/z 392.1619 y calculadas para $C_{19}H_{23}FN_3O_5$ (MH^+) de 392.1622. Figura IV.8 se muestran los cromatogramas obtenidos para las fotodegradaciones de ALFX.

Estos compuestos fueron caracterizados mediante RMN después del tratamiento químico con trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂), tal y como se muestra a continuación:



Los fotoproductos de ALFX se obtuvieron a partir de irradiaciones de dos muestras de ALFX (500mg, 1.347 mmol) en 100 mL de disolución acuosa 1mMPB (ambas bajo atmósfera de N₂), una a pH 7.4 y otra a pH 12.0. Posteriormente a las irradiaciones, la muestra básica se neutralizó con NaOH para después ambas mezclas ser extraídas en CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Las fases orgánicas resultantes, se secaron con MgSO₄ y fueron concentradas con un rotavapor. El sólido resultante, se trató con 60 µL de trimetilsilil diazometano (TMSCHN₂ 2.0 M de solución en dietil éter) y 15 µL de ácido tetrafluorobórico (BFA, 0.129 mmol) en diclorometano (10 mL) como disolvente. Cada mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación constante, primero a reflujo de 40 °C durante 2h y a continuación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se neutralizó con NaOH la disolución resultante, y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Las fases orgánicas se secaron con MgSO₄ y se concentraron en rotavapor hasta sequedad. Las mezclas, fueron purificadas por columna de sílica gel (flash), utilizando diclorometano/metanol como fase móvil. Para el caso de la irradiación de ALFX a pH 7.4 se empleó la fase móvil en proporción (98:2) y en el caso de la irradiación a pH 12.0, en proporción (99:1).

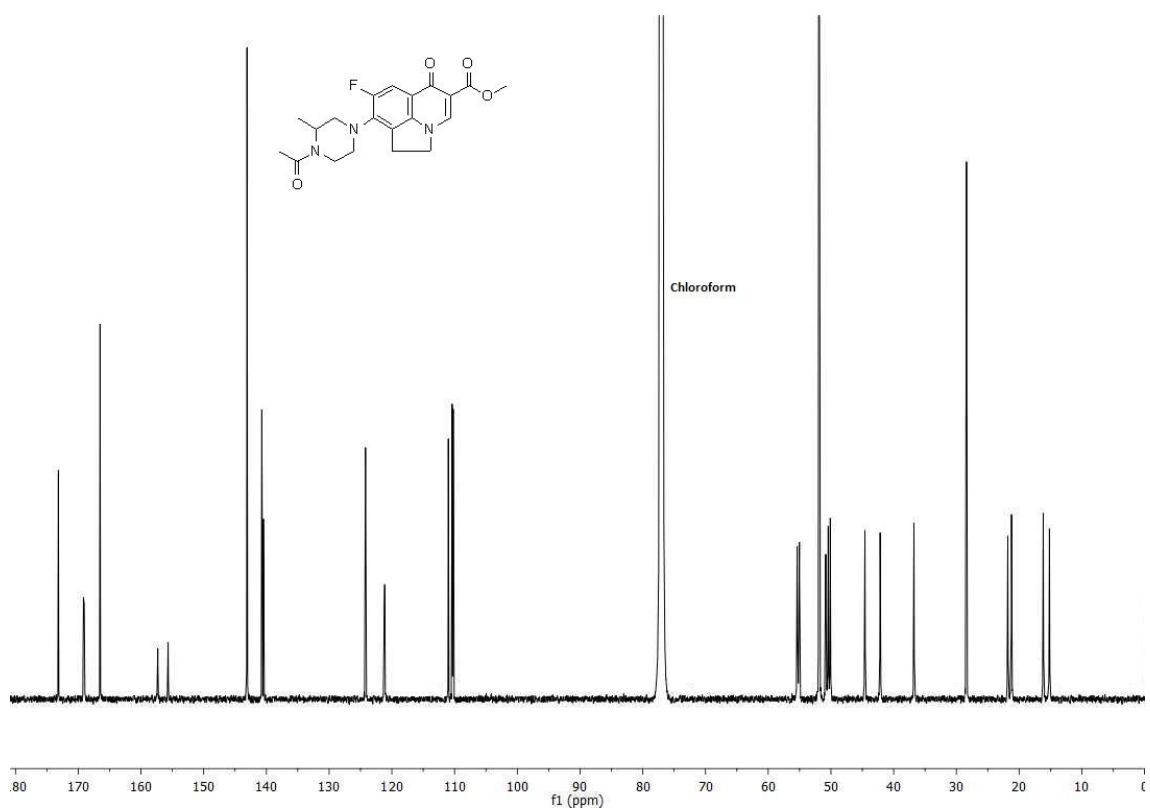
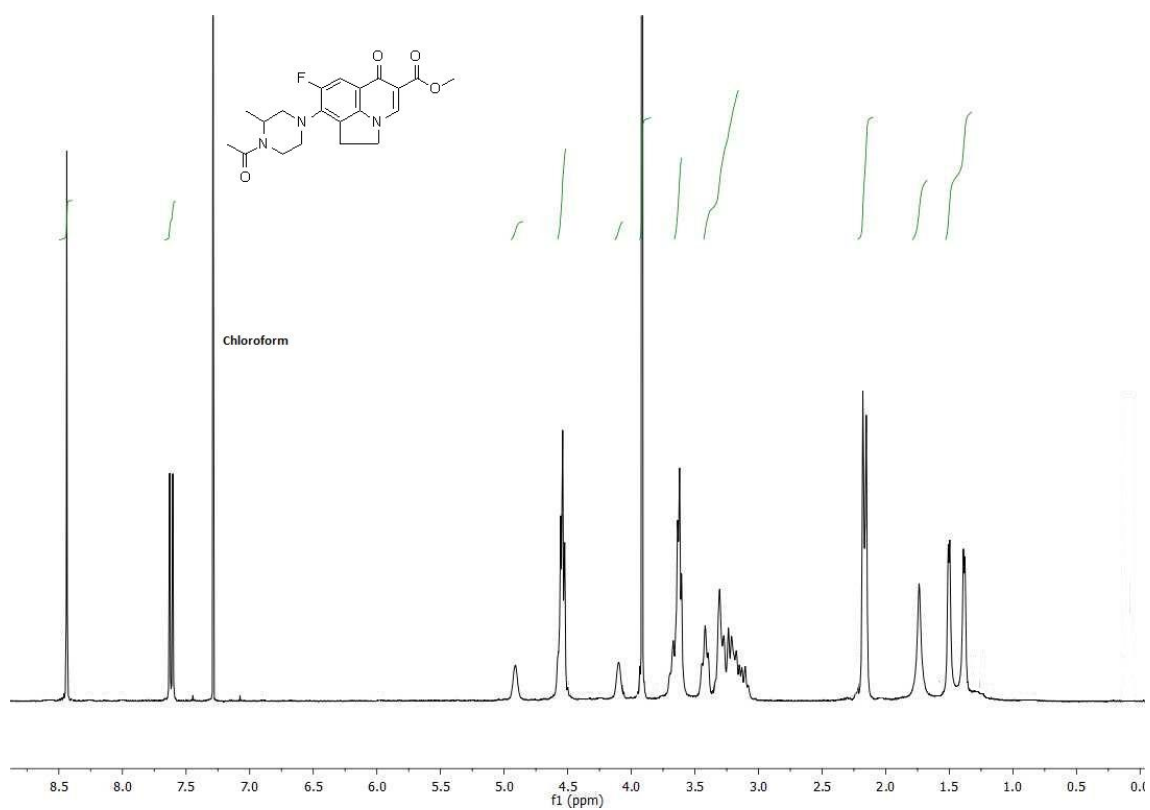


Figura IV.9. Espectros RMN (^1H , ^{13}C) del fotoproducto (2) de ALFX

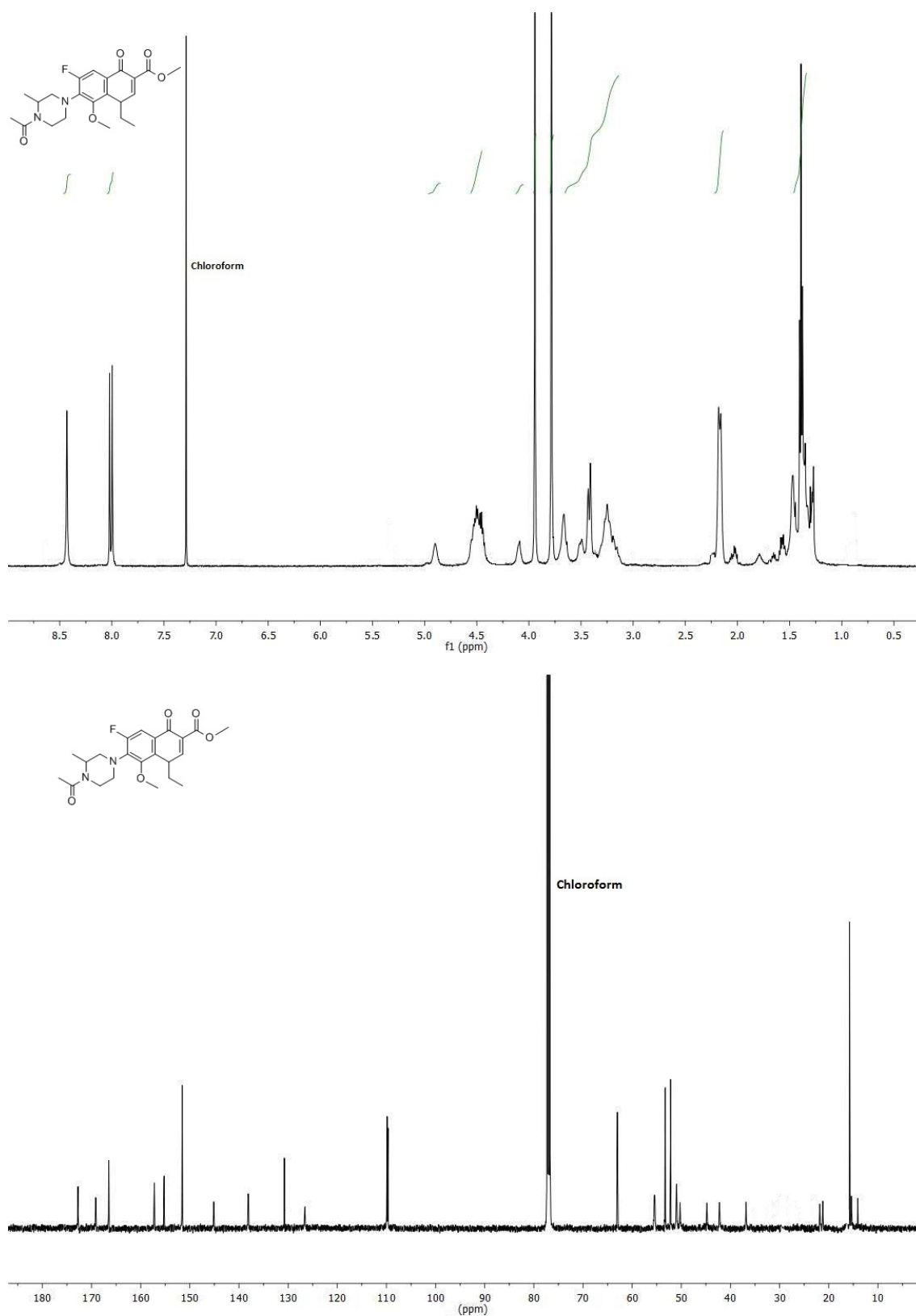


Figura IV.10. Espectros RMN (^1H , ^{13}C) del fotoproducto (2OH) de ALFX.

Los datos espectroscópicos de los fotoproductos, se muestran a continuación:

- i) Fotoproducto **2** (Figura IV.9): Metil 8-fluoro-1,2-dihidro-9-(4-acetil-3-metil-1-piperacínil)6-oxo-6H-pirrólo-[3,2,1-ij] quinilino-5 carboxilato:
- ^1H RMN [500 MHz, CDCl_3] δ 1.39, 1.50 (dos d, 3H, $J= 6.75$ Hz), 2.17 (d, 3H, $J= 13.5$ Hz), 3.42 (m, 6H), 3.64 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 4.12, 4.85 (dos m, 1H) 4.54 (m, 2H), 7.62 (d, 1H, $J= 17,85$ Hz), 8.44 (s, 1H).
 - ^{13}C RMN δ 15.16, 16.15, 21.21, 21.81, 28.39, 36.90, 42.14, 45.08, 50.10, 50.43, 51.84, 51.96, 55.03, 55.38, 110.22, 110.99, 121.16, 124.22, 140.39, 140.48, 143.09, 152.18 (CF, $J= 258.50$ Hz), 166.25, 169.55, 174.43.
 - Masa exacta: m/z encontrada 404.1412, calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{O}_5$ (MH^+) 404.1416.
- ii) Fotoproducto **2OH** (Figura IV.10): Metil 8-fluoro-1,2-dihidro-9-(4-acetil-3-metil-1-piperacínil) 6-oxo-6H-pirrólo-[3,2,1-ij] quinolino-5-carboxilato:
- ^1H RMN [500 MHz, CDCl_3] δ 1.28, 1.44 (dos m, 3H), 1.32 (m, 3H), 2.17 (d, 3H, $J= 12$ Hz), 3.45 (m, 6H), 3.76 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.15, 4.88 (dos m, 1H), 4.51 (m, 2H), 7.99 (d, 1H, $J= 17,24$ Hz), 8.61 (s, 1H).
 - ^{13}C RMN δ 14.10, 15.38, 15.78, 21.21, 22.67, 36.84, 42.23, 44.79, 50.25, 50.98, 52.18, 53.29, 55.40, 63.00, 109.67, 109.91, 126.59, 130.01, 138.15, 145.13, 151.55, 156.25 (CF, $J= 283.75$ Hz) 166.48, 169.15, 172.75.
 - Masa exacta: m/z encontrada 420.1912, calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_5$ (MH^+) 420.1935.

IV.5. Referencias bibliográficas

1. Cullen, M., Baijal, S. Prevention of febrile neutropenia: use of prophylactic antibiotics. *Br. J. Cancer.* **2009**, *101*, S11-S14
2. Kim, K., Pollard, J. M., Norris, A. J., McDonald, J. T., Sun, Y. L., Micewicz, E., Pettijohn, K., Damoiseaux, *et al.* High throughput screening identifies two classes of antibiotics as radioprotectors: Tetracyclines and fluoroquinolones. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7238-7245.
3. Al-Trawneh, S. A., Zahra, J. A., Kamal, M. R., El-Abadelah, M. M., Zani, F., Incerti, M., Cavazzoni, A., *et al.* Synthesis and biological evaluation of tetracyclic fluoroquinolones as antibacterial and anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5873-5884.
4. Perrone, C. E., Takahashi, K. C., Williams, G. M. Inhibition of human topoisomerase II α by fluoroquinolones and ultraviolet A irradiation. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 16-22.
5. Lhiaubet-Vallet, V., Boscá, F., Miranda, M.A. Photosensitized DNA damage: the case of fluoroquinolones. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 861-868.
6. Martinez, L. J., Li, G., Chignell, C. F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 599-602.
7. Fasani, E., Manet, I., Capobianco, M. L., Monti, S., Pretali, L., Albini, A. Fluoroquinolones as potential photochemotherapeutic agents. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3621-3623.
8. Monti, S., Sortino, S., Fasani, E., Albini, A. Multifaceted reactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopy. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2185-2196.
9. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Boscá, F. Flash photolysis studies of the carbenes and their reaction kinetics. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 6441-6443.
10. Freccero, M., Fasani, E., Mella, M., Manet, I., Monti, S., Albini, A. Modeling the photochemistry of the referent phototoxic drug lomefloxacin by steady-state, and time resolved experiments and DFT and Post-HF calculations. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 653-663.
11. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Bosca, F. Role of excited state intramolecular charge transfer in the photophysical properties of norfloxacin and its derivatives. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, *110*, 2607-2612.

12. Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M. C., Castell, J. V., Bosca, F., Miranda, M. A. Triplet excited fluoroquinolones as mediators for thymine cyclobutane dimer formation in DNA. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 7409-7414.
13. Albini, A., Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 238-250.
14. Grabner, G., Richard, C., Kohler, G. Formation and reactivity of 4-oxocyclohexa-2, 5-dienylidene in the photolysis of 4-chlorophenol in aqueous solution in ambient temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11470-11480.
15. Othmen, K., Boule, P., Szczepanik, B., Rotkiewicz, K., Grabner, G. Photochemistry of 4-chloroaniline in solution. Formation and kinetic properties of a new carbene 4-iminocyclohexa-2, 5-dienilidene. *J. Phys. Chem. A.* **2000**, *104*, 9525-9534
16. Ortica, F., Pohlars, G., Scaiano, J. C., Cameron, J. F., Zampini, A. Laser flash photolysis of 2-diazo-1, 3-diphenyl-1, 3-propanedione: an unusual long live triplet as a reaction intermediate. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1357-1360.
17. Fasani, E., Barberis Negra, F. F., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced CF bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5388-5395.
18. Fasani, E., Mella, M., Albini, A. Photochemistry of phototoxic drug lomefloxacin: paths observed in the presence of amines and NaOH and from the methyl ester. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 5075-5082.
19. Fasani, E., Monti, S., Manet, I., Tilocca, F., Pretali, L., Mella, M., Albini, A. Inter and intramolecular photochemical reactions of fleroxacin. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1875-187.

Capítulo V: Fotoreactividad de Fluoroquinolonas con ADN y dGuo

V.1. Introducción

Tal y como se ha comentado en capítulos previos, las FQ han sido utilizadas durante los últimos años como agentes antibacterianos dada su capacidad para inhibir la Topoisomerasa II, enzima que participa en la replicación y reparación del ADN bacteriano [1].

Durante los últimos años, las FQ han atraído mucho la atención debido a su actividad antitumoral [2-6]. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el uso de FQ reduce la mortalidad de pacientes que padecen cáncer [7]. Este hecho se asoció con propiedades inhibitorias de estos fármacos al ADN polimerasa y las topoisomerasas I y II también en mamíferos.

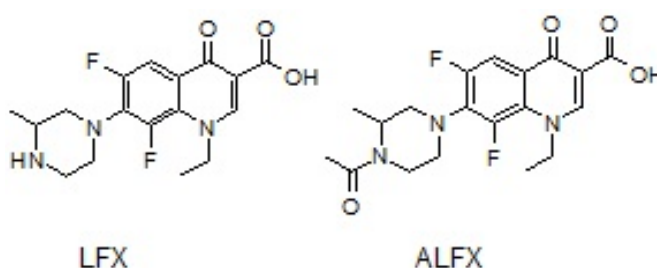


Figura V.1. Estructura de LFX y su derivado acetilado ALFX.

El hecho de que se haya observado que los efectos genotóxicos (capacidad de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos) producidos por las FQ en sistemas eucarióticos sean potenciados bajo la presencia de luz (irradiación UV) [8], confiere a dichos fármacos propiedades fotomutagénicas. Esta genotoxicidad fotoinducida se detecta en mayor medida en las fluoroquinolonas 6,8-dihalogenadas como el fleroxacino (FLX), rivaroxaván (BAY-y3118) y lomefloxacino (LFX) siendo éste último el compuesto propuesto como el agente fotomutagénico de referencia (Figura V.1) [9-16].

Todo ello ha potenciado que durante los últimos años se hallan realizado una gran cantidad de estudios sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las FQ analizando en profundidad el efecto de un átomo de halógeno en la posición 8 del anillo quinolínico [12-17]. Así, todas las fluoroquinolonas 6,8-dihalogenadas estudiadas mostraron una inusual fotodeshalogenación por heterólisis del enlace C₈-halógeno del estado excitado triplete de la FQ (³FQ) y la generación de un catión arilo con propiedades alquilantes [17-21]. El daño inducido al ADN por la fotodeshalogenación de estas moléculas se ha asociado con la reactividad del propio intermedio catión arilo [17]. De hecho se ha observado mediante fotólisis destello láser (FDL) que la vida de este catión se reduce por la presencia del nucleótido guanosín monofosfato (dGMP) y

que de esta interacción se obtienen fotoproductos formados por uniones covalentes entre la FQ deshalogenada y el nucleótido (FQ(-F)dGMP) [21]. Sin embargo, estudios concernientes a asociaciones entre FQ y ADN han sugerido que moléculas como LFX, cuando se encuentra acomplejado con ADN, sufre su proceso de fotodeshalogenación mediante un proceso de transferencia electrónica entre su estado excitado singlete (^1LFX) y el ADN. Así, experimentalmente se observaba que la banda de emisión de LFX disminuía en presencia de cantidades crecientes de ADN pero el rendimiento cuántico de fotodeshalogenación (Φ_{deg}) no variaba. De este modo, dos posibles rutas de fotodeshalogenación de FQ como LFX podrían generar uniones covalentes entre el fármaco y el ADN; desde forma asociada $^1\text{LFX}\dots\text{ADN}$ o desde el catión arilo generado desde la forma libre de ^3LFX [18, 22].

Por todo ello, en el presente capítulo se pretende evaluar, mediante técnicas como las de emisión, fotólisis de destello láser (FDL), radiólisis pulsada (RP), cromatografía líquida y espectrometría de masas, los principales procesos implicados en la fotodeshalogenación de FQ como LFX en presencia de biomoléculas como la deoxiguanosina (dGuo) y ADN. Para determinar el daño que se genere al ADN se determinará la fragmentación de las cadenas simples del ADN pBR322. Una separación mediante cromatografía de exclusión molecular del ADN de muestras de esta biomolécula en disolución, con y sin LFX así como después de realizar en ellas radiaciones fotosensibilizantes, y el posterior análisis espectroscópico de emisión y absorción del ADN aislado nos permitirá detectar, mediante la variación de dichos espectros, la formación de uniones fotoinducidas de LFX con ADN. Además, se realizarán los mismos experimentos con la forma acetilada de lomefloxacino (ALFX, Figura V.1) con el propósito de que sus cambios de comportamiento fotofísico y fotoquímico respecto de LFX puedan ayudarnos a entender los procesos involucrados en las interacciones entre las FQ dihalogenadas y el ADN (Figura V.1) [18, 23-25].

V.2. Resultados

V.2.1. Estudios de emisión

La asociación del fármaco (A)LFX con el ADN puede ser investigada mediante experimentos de desactivación de la fluorescencia.

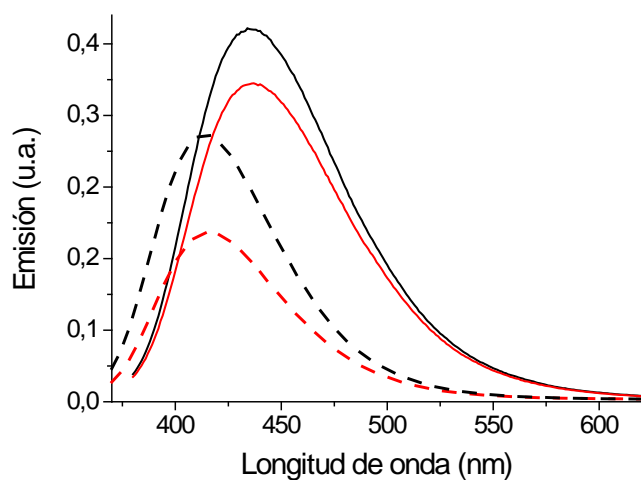


Figura V.2. Espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$) de 10^{-4} M LFX (líneas discontinuas) o ALFX (líneas continuas) en 10^{-3} M de disolución acuosa en PB, en ausencia (negro) y en presencia de $3,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ de ADN (rojo).

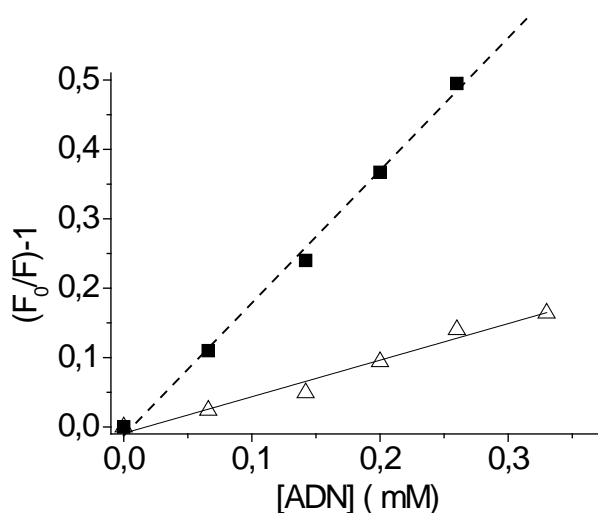


Figura V.3. Gráfica de Stern Volmer correspondiente a la desactivación de la fluorescencia de 10^{-4} M ALFX (línea discontinua) y LFX (línea continua) y disoluciones acuosas de PB en presencia de ADN.

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas tamponadas en PB de cada FQ y se registraron las emisiones de cada muestra en función de cantidades crecientes de ADN. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en las Figuras V.2 y V.3.

Tabla V.1. Tiempos de vida de fluorescencia (τ_F), y rendimientos cuánticos de fluorescencia y fotodegradación (ϕ_F y ϕ_{deg} , respectivamente) para LFX y ALFX en diferentes condiciones.

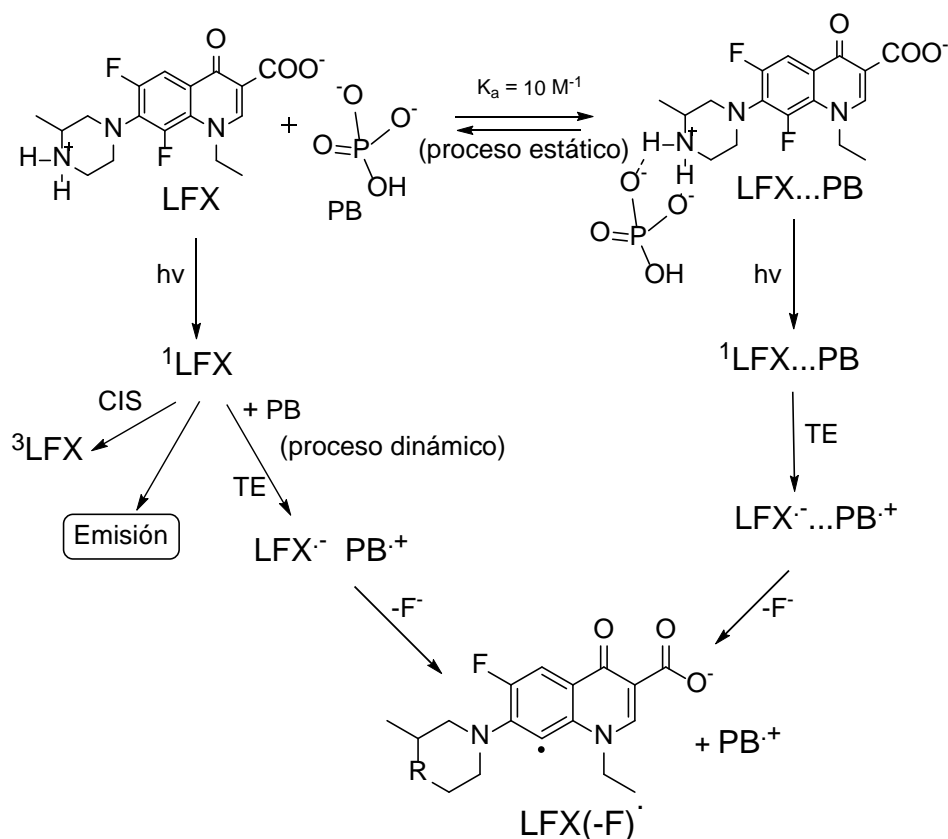
	LFX			ALFX		
	τ	ϕ_F	ϕ_{deg}	τ	ϕ_F	ϕ_{deg}
H ₂ O	1.2	0.080	0.55	1.7	0.110	0.60
1 mM PB	1.1	0.070	0.53	1.7	0.110	0.60
100 mM PB	0.9	0.045	0.50	1.6	0.095	0.58
300 mM PB	0.8	0.033	0.49	1.5	0.088	0.57
0.1 mM ADN (1 mM PB)	1.1	0.052	0.53 ^a	1.7	0.105	---
1 mM ADN (1 mM PB)	1.1	0.034	0.53 ^a	1.7	0.074	0.59

^aReferencia [22]

Estos efectos podían deberse a efectos dinámicos y/o estáticos. Por ello, para evaluar la posible existencia de una desactivación dinámica de fluorescencia de las FQ, se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia de ambas FQ en ausencia y presencia de ADN. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla V.1.

El hecho de que los tiempos de vida de LFX y ALFX no cambiaran en presencia de ADN descartaba la existencia de una desactivación dinámica de fluorescencia lo cual está acuerdo con los efectos descritos para algunas FQ en la bibliografía incluyendo LFX [22]. De esta manera toda la desactivación debe ser estática y entonces, las constantes de asociación (K_a) entre el ADN y las FQ pueden ser calculadas empleando la ecuación de Stern-Volmer, en donde K_{SV} se correspondería con la K_a asumiendo que la FQ acomplejada con ADN (FQ...ADN) no emite (detalles en la sección de experimental).

La K_a se estimó ca. $1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para LFX...ADN, lo cual coincidía plenamente con la descrita en la bibliografía [22]. Sin embargo, en el caso de ALFX...ADN, su K_a era ca. de cuatro veces menor ($0.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Con ello podemos decir que la acetilación en N(4') del anillo piperazínico disminuye la afinidad de las FQ por el ADN, lo cual parece una clara evidencia de que la asociación entre la FQ y el ADN se debe al menos parcialmente a una interacción entre la forma catiónica del anillo piperazínico y los fosfatos aniónicos del ADN. Este hecho pudo entenderse mejor después de analizar el efecto que provoca el tampón fosfato en las propiedades de emisión de (A)LFX.



Esquema V.1. Mecanismos de desactivación de la fluorescencia por efecto del tampón fosfato en LFX.

Las medidas de fluorescencia de estos fármacos en presencia de cantidades crecientes de tampón fosfato (desde 1 a 300 mM PB) mostraron disminuciones en los rendimientos cuánticos de fluorescencia de LFX. Sin embargo, en el caso de ALFX, como ocurría con ADN, no se observaban cambios (Tabla V.1). La desactivación de la fluorescencia de LFX por la presencia de PB puede atribuirse a un proceso estático (K_a ca. 10 M^{-1} (17)), ya que la disminución de sus tiempos de vida por PB solo justificaban una desactivación del 15% (desactivación dinámica) (Esquema V.1).

Un proceso de transferencia electrónica desde el estado excitado singlete de LFX con una molécula de PB con el que se encuentra asociado ($^1\text{LFX}\dots\text{PB}$) justificaba el hecho de que éste complejo no emitiese. La misma reacción, pero intermolecular entre ^1LFX y el PB, justificaría el 15 % de los procesos dinámicos. En el caso de ALFX, como el anillo piperazínico se encuentra acetilado, no puede producirse la asociación $\text{ALFX}\dots\text{PB}$, por lo que la caída en la emisión sólo puede ser debida a un proceso de desactivación dinámica. De hecho, la presencia de 100 mM PB produce una disminución de fluorescencia del 10% que puede ser atribuido a la variación en el

tiempo de vida de ALFX (proceso dinámico). El proceso de desactivación dinámica de fluorescencia observado con (A) LFX tiende a ser ineficiente debido a que los tiempos de vida de sus respectivos estados excitados singlete son muy cortos (Tabla V.1).

V.2.2. Experimentos de fotólisis de destello laser (FDL)

V.2.2.1. Reactividad del aril catión de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX) con dGuo.

Estudios de fotólisis de destello láser realizados con muestras de LFX y ALFX en disolución acuosa tamponada a pH 7.4 bajo atmósfera de N₂O evidenciaron la formación de dos especies intermedias de tiempo de vida muy corta [8].

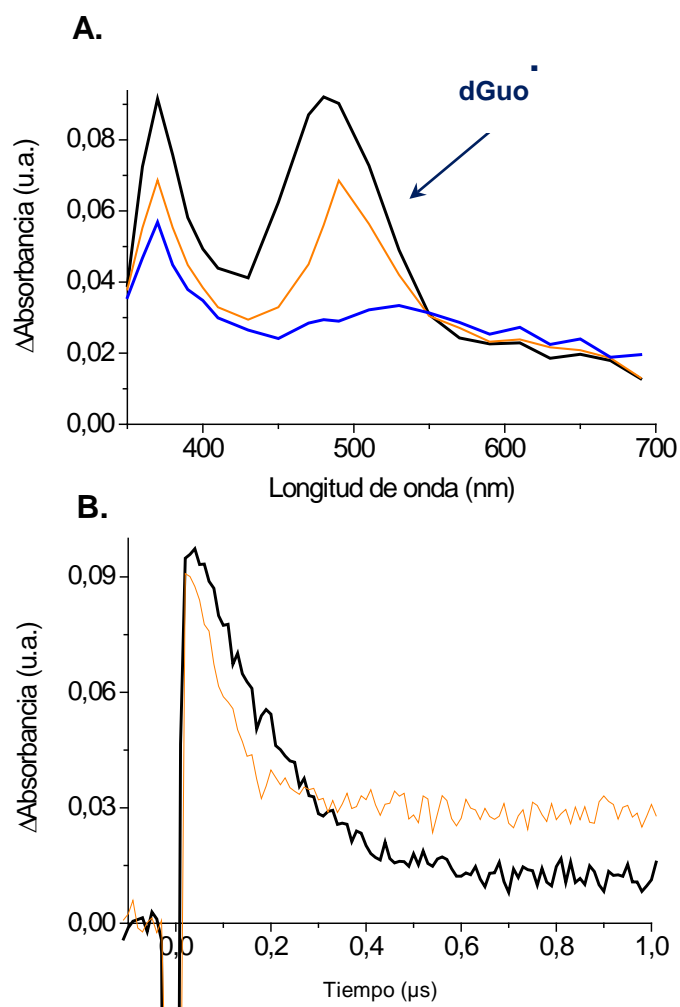


Figura V.4. (A) Espectro de absorción de 10^{-4} M de LFX en disolución acuosa 1mM NaHCO₃ en presencia de 10^{-2} M de dGuo, 10 ns después de la excitación láser a 355 nm (negro), 0.10 μs (naranja) y 0.3 μs

(azul). **(B)** Trazas de desactivación de LFX en presencia/ausencia de dGuo (naranja/negro respectivamente) monitorizadas a 490nm.

En el caso de LFX, se generaba un carbeno con carácter triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 370$ nm y τ ca. 30 ns) y un catión arilo ($\lambda_{\text{máx}} = 490$ nm y τ ca. 200 ns), mientras que en el caso de ALFX se generaba un catión arilo ($\lambda_{\text{máx}} = 600$ nm y τ ca. 340 ns) seguido de un biradical catiónico proveniente de un aril carbeno triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 480$ nm y τ ca. 440 ns) [18].

Sin embargo, el análisis de los espectros de absorción transitorios de las mismas muestras en presencia de dGuo reveló que los cationes arilo detectados eran altamente reactivos en presencia de dGuo. Las constantes de desactivación (k_q) que se determinaron fueron de ca. $0.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el caso de LFX y ca. $0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para ALFX. Además, también se detectó la formación de otro intermedio que aparecía con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 540 nm. Esta nueva especie transitoria, basándonos en la literatura [26], podía ser asignada como el radical del dGuo (Figura V.4-A).

La identificación del radical dGuo se confirmó cuando al realizar los mismos experimentos bajo condiciones aeróbicas se observó que su espectro de absorción transitoria no cambiaba ni en su forma ni en su tiempo de vida, lo cual era de esperar teniendo en cuenta la baja reactividad descrita del radical dGuo con el oxígeno molecular [27]. Todo ello nos permite afirmar que la reacción de transferencia electrónica entre los cationes arilo de (A)LFX y dGuo se produce eficientemente.

Por otra parte, la menor reactividad de los cationes arilo ALFX con esta biomolécula va en concordancia con la baja reactividad descrita de este catión con el proveniente de LFX [17,18].

Se ha descrito en la literatura que la constante de reacción del aril catión de LFX con el nucleótido guanosina monofostato (k_q ca. $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es algo más alta que la que nosotros hemos determinado para dGuo. Este incremento de reactividad podríamos atribuirlo a algún tipo de preasociación entre el fosfato del nucleótido y la FQ teniendo en cuenta que la preasociación PB....FQ ya ha sido sugerida en otros estudios [24] y que los resultados obtenidos en este trabajo con PB también parecen indicar su existencia.

V.2.2.2. Fotoreactividad de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX) con ADN

Tras excitar una muestras de (A)LFX 10^{-4} M en disoluciones acuosas (NaHCO_3 10^{-4} M, pH 7.4) bajo atmósfera de N_2O se observaron las mismas especies transitorias tanto en presencia como en ausencia de ADN (hasta 1.5×10^{-3} M). Además, los tiempos de vida de los cationes arilo generados de ambas FQ permanecieron inalterados por lo que las K_q deben de ser menores de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, la generación de estos intermedios disminuía a medida que se adicionaban cantidades crecientes de ADN.

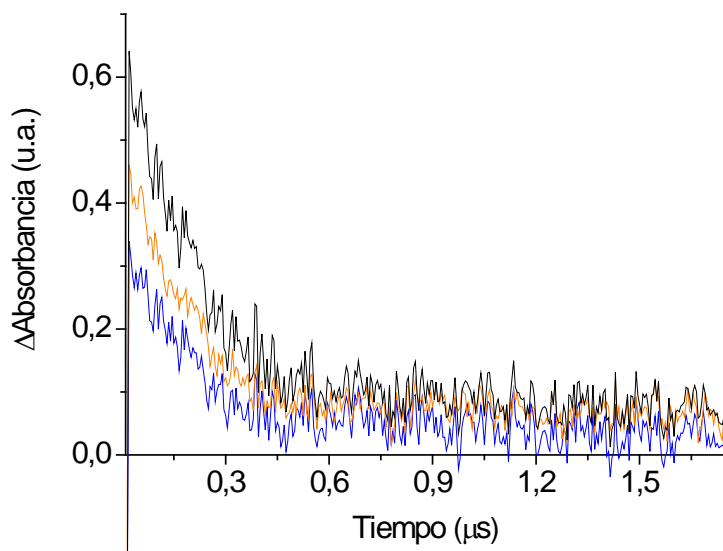
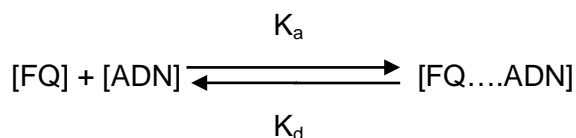


Figura V.5. Trazas de desactivación de LFX 10^{-4} M en disolución acuosa 1 mM NaHCO_3 en ausencia (negro) y en presencia de ADN (1×10^{-4} M (naranja) y 10×10^{-4} M (azul)) a 490 nm tras la excitación láser a 355 nm.

Esta disminución resultó ser más acusada en el caso de LFX que en el de ALFX. En la Figura V.5 se muestra el efecto que se observaba sobre el catión arilo de LFX.

La absorción del catión arilo a su $\lambda_{\text{máx}}$ disminuye apreciablemente por la presencia de cantidades crecientes de ADN. Observando el equilibrio $\text{FQ} \dots \text{ADN}$,



en donde, de acuerdo con la definición de constante de equilibrio:

$$K_a = \frac{[FQ \cdots ADN]}{([ADN] \times [FQ])}$$

Utilizando el valor de K_a obtenido previamente mediante la desactivación de fluorescencia, y teniendo en cuenta las concentraciones iniciales de ambas FQ y de ADN utilizadas en los experimentos de FDL, se puede determinar que el aumento de la cantidad de fármaco acomplejado coincidía con la disminución de la generación de sus cationes arilo. En el caso del catión arilo de ALFX, el efecto detectado era menor por tener una más baja constante de asociación al ADN.

V.2.3. Experimentos de reducción de lomefloxacino (LFX) y de su derivado acetilado (ALFX) mediante la técnica de radiólisis pulsada

La reacción entre el electrón solvatado (e^-_{ac}) y (A)LFX fue estudiada utilizando disoluciones acuosas saturadas de ambas FQ que contenían un 1% de tert-butanol. Bajo éstas condiciones, los radicales hidroxilo ($OH\cdot$) son capturados por el tert-butanol formándose radicales libres muy poco reactivos. En ausencia de las FQ, la absorción de e^-_{ac} desaparecía con una constante de velocidad del orden de $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que en presencia de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de FQ esta constante aumentaba hasta ca. $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bajo estas condiciones, se monitorizó la el efecto de la adición de las FQ con la velocidad de desaparición de la absorción de e^-_{aq} la cual se determinaba con las trazas obtenidas a 720 nm. Los resultados mostraban un aumento lineal de la velocidad de desaparición con las concentraciones de FQ. El electrón solvatado reaccionaba muy eficientemente con el estado fundamental de las FQ. Estas reacciones bimoleculares resultaron ser controladas por difusión dando lugar a constantes de reacción de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para los tres compuestos.

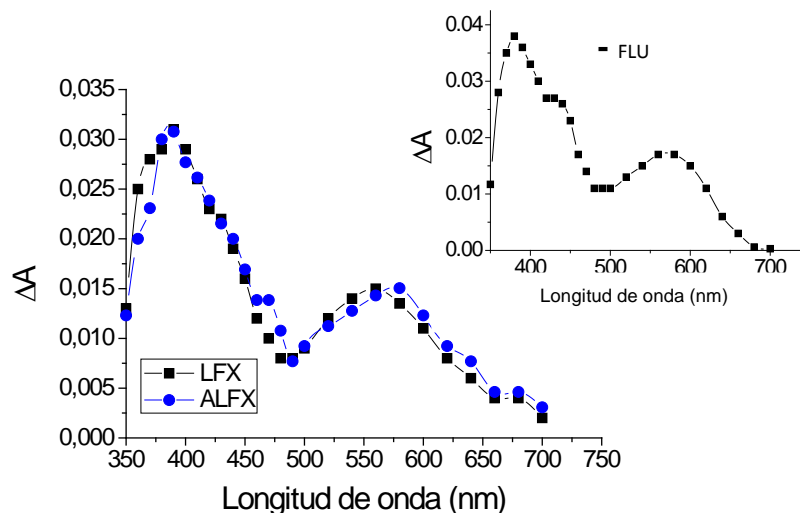


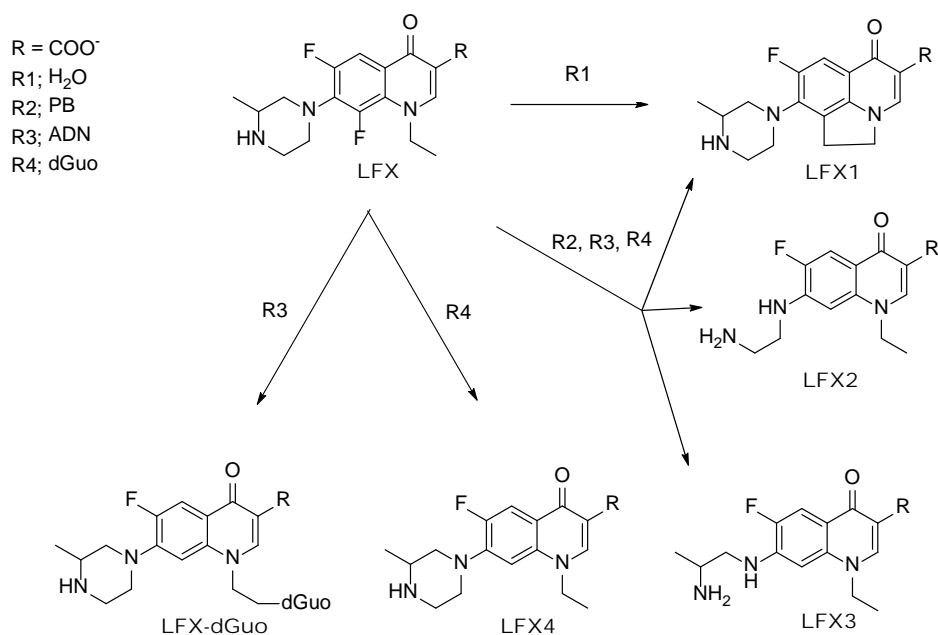
Figura V.6. Espectro de absorción transitorio observado mediante radiólisis pulsada de ALFX y LFX (ambas en 5×10^{-5} M) en una solución acuosa (10 mM PB y 1% en tert-butanol) a los 5 μ s después de la radiación. Insertado: Espectro de absorción transitoria de FLU 5×10^{-5} M a los 5 μ s después la radiación en las mismas condiciones.

Tras registrar los espectros de absorción transitoria obtenidos con LFX, su forma acetilada ALFX y FLU (Figura V.6) se observó cómo aparecían dos bandas centradas ca. 560 nm y ca. 390 nm en los tres casos. Estas especies transitorias mostraron constantes de desactivación del orden de 5.81, 4.5 y $11.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ para FLU, LFX y ALFX respectivamente, utilizando concentraciones de 5×10^{-5} M de FQ.

Con estos resultados, los intermedios detectados se asignaron al radical anión de cada FQ (FQ \cdot^-). El espectro de absorción transitorio obtenido para la FLU (Figura V.6) era similar al descrito en la literatura para FLU [28] y a los obtenidos utilizando (A)LFX. A su vez, estos eran también similares a los descritos para los radicales aniónicos de NFX y CPX [29].

V.2.4. Estudios cinéticos y análisis de los productos de la fotodegradación de lomefloxacin (LFX)

Para complementar las propiedades fotofísicas de estos compuestos, se procedió a analizar los productos de fotodegradación de LFX con el propósito de comprender mejor el comportamiento de intermedios detectados en la fotólisis de LFX en presencia de biomoléculas tales como dGuo o ADN y así poder establecer los posibles mecanismos involucrados en la generación de uniones covalentes entre LFX y las biomoléculas.



Esquema V.2. Fotoproductos de LFX obtenidos tras la irradiación de una muestra en disolución acuosa en presencia y ausencia de PB, dGuo y ADN.

Así, se llevaron a cabo irradiaciones con disoluciones acuosas de LFX (pH 7.4) utilizando un fotoreactor multilámpara ($\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$), tanto en presencia como en ausencia de PB y ADN con la finalidad de poder establecer la influencia de la propuesta reacción de transferencia electrónica entre el estado singlete de la FQ (^1FQ) y el ADN en la formación de fotoproductos [22,30].

Analizando las fotodegradaciones de LFX en PB mediante las técnicas de HPLC y UPLC-Masas/Masas se observó que la distribución de sus fotoproductos dependía de las concentraciones de PB en el medio (Esquema V.2). Sin embargo, la presencia de PB no alteró significativamente ϕ_{deg} de LFX, lo cual no podía correlacionarse con el importante descenso del ϕ_{FI} inducido por este tampón (ver Tabla V.1).

Cuando se llevaban a cabo las irradiaciones de LFX en ausencia de tampón fosfato, se obtenía LFX1 [31], mientras que cuando la concentración de PB estaba por encima de 300 mM solo se obtenían trazas de LFX1 y los fotoproductos mayoritarios eran LFX2 y LFX3 [32]. La detección de estos fotoproductos en presencia de tampón fosfato está de acuerdo con la literatura [32] y con el cálculo de sus masas exactas:

- LFX1: Masa exacta (m/z) 332.1408. Calculada para $C_{17}H_{19}FN_3O_3$ (MH^+) 332.1410.
- LFX2: Masa exacta (m/z) 294.1264. Calculada para $C_{14}H_{17}FN_3O_3$ (MH^+) 294.1254.
- LFX3: Masa exacta (m/z) 308.1419. Calculada para $C_{15}H_{19}FN_3O_3$ (MH^+) 308.1410.

Cuando las irradiaciones de LFX (1 mM PB, pH 7.4) se llevaron a cabo en presencia de 5×10^{-4} M de ADN, los análisis de los crudos de reacción confirmaron la formación de LFX1, LFX2 y LFX3 junto con el fotoproducto LFX4 (m/z) de 334.1566, calculada para $C_{17}H_{21}FN_3O_3$ (MH^+) 334.1567 [31]. Sin embargo, cuando las fotodegradaciones de LFX se realizaron en presencia de dGuo (10 mM), además de formarse LFX1, LFX2, LFX3 y LFX4 (Esquema V.2), se detectaron tres nuevos compuestos que absorbían a 350 nm (indicativo de que solo contiene el anillo de la fluoroquinolona) y que mostraban unas masas exactas de (m/z) = 599.2384, 599.2380, 599.2386.

Basándonos en estos resultados, las moléculas detectadas se asignaron inequívocamente a los aductos LFX-dGuo, con una masa MH^+ calculada para $C_{27}H_{32}FN_8O_7$ de 599.2378 (ver estructura en Esquema V.2). En contraposición, no se detectaron uniones covalentes entre el ADN y LFX cuando el crudo de sus irradiaciones fue analizado mediante fluorescencia y espectrometría UV-Visible después de aplicarles un proceso de separación del ADN mediante sephadex. El ADN recuperado no mostró ningún cambio en su espectro de absorción y no se observó fluorescencia a unas λ de excitación de 320, 330 y 350 nm.

También es de destacar que cuando se analizó la influencia de ADN y PB en los valores de los rendimientos de fotodegradación de LFX y ALFX no se observaron cambios significativos (Tabla V.1).

V.2.5. Daño al ADN

Las propiedades fotosensibilizantes del ADN, fueron estudiadas en el caso de (A)LFX y CPX, éste último usado como modelo de FQ monohalogenada.

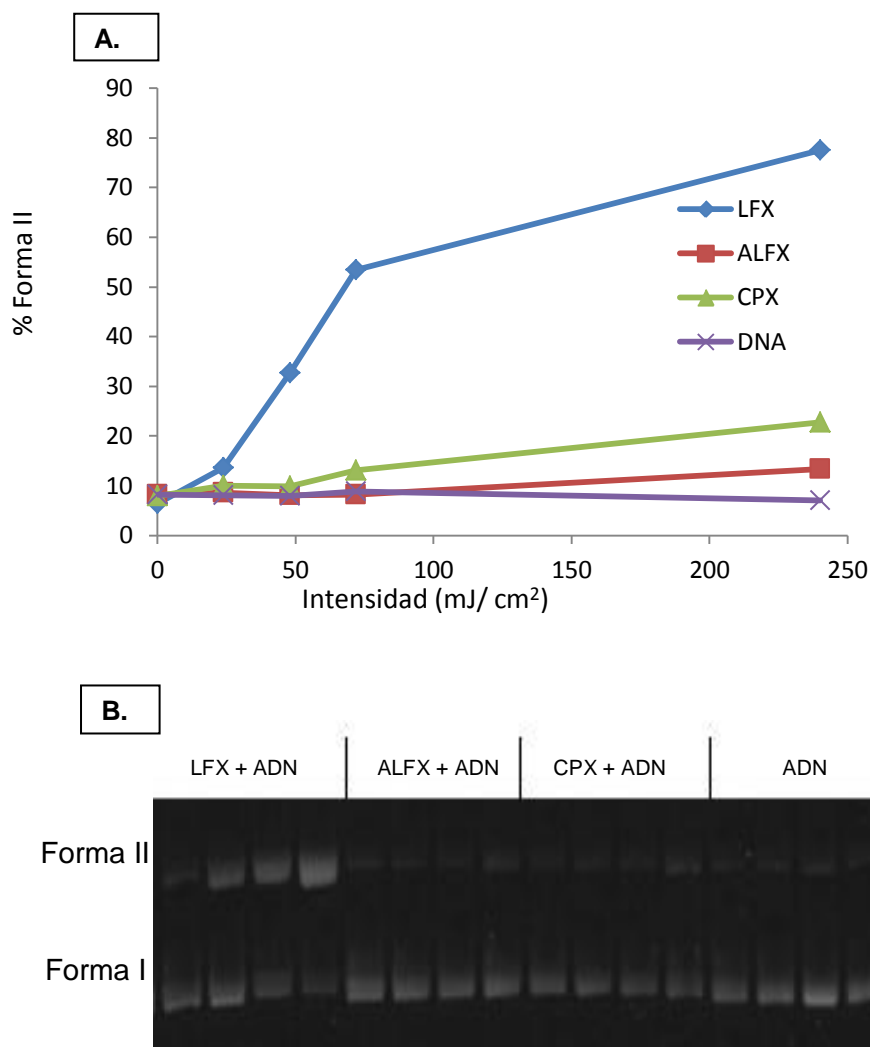


Figura V.7.A) Porcentajes de la forma II de ADN para distintas mezclas ADN-FQ. **B)** Gel de agarosa que muestra las formas I y II del ADN obtenidas para mezclas que contienen al plásmido pBR322 (20 μ M) y FQ (20 μ M) después de la exposición a fuentes de luz de intensidades 24, 48, 72, 240 mJ/cm^2 .

Los experimentos se llevaron a cabo empleando ADN (pBR322), biomolécula ampliamente utilizada como herramienta para detectar diferentes tipos de daño. La conversión de la forma superenrollada (llamada forma I) en la forma circular (llamada forma II), muestran la fragmentación del ADN de cadena simple (SSB).

Buscando la producción de SSB se llevaron a cabo la irradiaciones UV-A del ADN pBR322 (20 μ M) en presencia de FQ (100 μ M). Tal y como se muestra en la Figura V.7 sólo en el caso de LFX se producía una significativa formación de la forma II. Así, tras 240 mJ/cm^2 de luz se detecta una fragmentación del 70% del ADN en presencia de LFX mientras que para ALFX y el CFX, solo se observan cambios del 5 y

el 15% respectivamente. En el caso de CPX, su bajo efecto podría atribuirse a que su rendimiento de fotodegradación es menor del 0.01 [22], ya que su constante de asociación con ADN, determinada en la presente tesis (K_a $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), es similar a la de LFX.

En el caso de ALFX, aunque este compuesto presenta un rendimiento de fotodegradación similar a LFX (Tabla V.1), debía presentar un daño al ADN aún menor que CPX porque tiene una constante de asociación al DNA entre 4 y 5 veces menor que las determinadas para LFX y CPX.

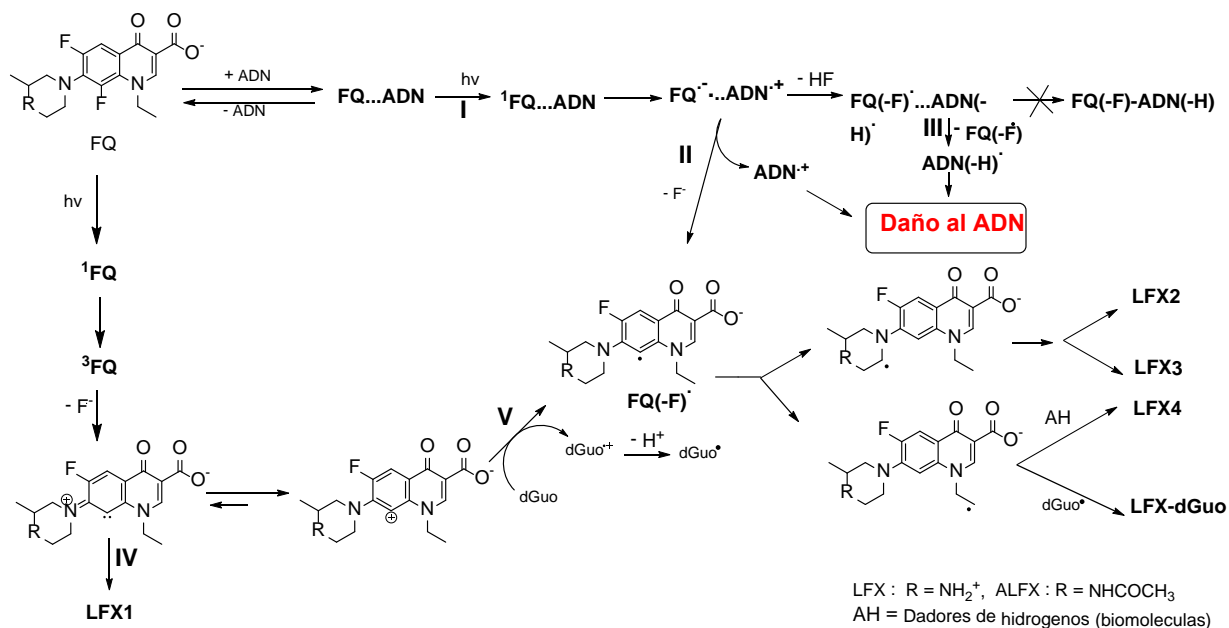
V.3. Discusión

Las irradiaciones de LFX, de su forma N-acetilada ALFX y de CPX en presencia de ADN (pBR322) mostraron que LFX es capaz de generar daño de una forma más eficiente que el compuesto dihalogenado ALFX o el monohalogenado CPX (Figura V.7). Para comprender los resultados, es necesario considerar los mecanismos previos propuestos para generar daño:

- a) Las propiedades alquilantes de los cationes arilo de las FQ generados por fotodeshalogenación (^3FQ) [21].
- b) El daño oxidativo generado por una vía radicalaria producida desde la intramolecular reacción del complejo $^1\text{FQ} \dots \text{DNA}$ [22].
- c) El daño oxidativo generado a partir de la generación de oxígeno singlete [16, 33].
- d) Los dímeros de timina generados por reacciones de transferencia electrónica [23, 33].

Los mecanismos *c* y *d* están presentes en muchas FQ mientras que los mecanismos *a* y *b* han sido atribuidos principalmente a FQ dihalogenadas. En éste contexto, la fotodeshalogenación de FQ, proceso mucho más eficiente en las 6, 8-dihalogenadas, ha sido mostrada como el camino más importante implicado en el daño fotoinducido al ADN [16, 34]. Así, este efecto ha sido correlacionado con la fotoestabilidad de las FQ mono y dihalogenadas [16], lo cual explicaría el bajo daño observado en el caso de CPX. Sin embargo, las diferencias obtenidas entre LFX y ALFX no son fáciles de comprender utilizando el anterior razonamiento ya que el valor

del rendimiento cuántico de fotodeshalogenación de ALFX es muy similar al descrito para LFX (Tabla V.1) y el comportamiento fotoquímico de LFX y ALFX en medio acuoso neutro es bastante similar [17]. Por ello, fue necesario evaluar a fondo todos los procesos involucrados en la fotólisis de (A)LFX en la presencia de ADN.



Esquema V.3. Caminos de fotodegradación de (A)LFX

En el Esquema V.3 se muestran los distintos procesos fotofísicos involucrados en la fotoquímica de (A)LFX en presencia de ADN y de uno de sus nucleósidos, la dGuo.

La determinación de los tiempos de vida de fluorescencia de (A)LFX, los cuales no sufrieron cambios en presencia de ADN, evidencian que las disminuciones en la emisión se producen mediante una desactivación estática. A partir de estas medidas de fluorescencia pudieron calcularse las constantes de asociación (K_a) para los complejos LFX...ADN (ca. $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) y ALFX...ADN (ca. $0.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) respectivamente.

Una transferencia electrónica entre el anillo quinolínico y el ADN (Esquema V.3, vía I), reacción sugerida en otro estudio [22], explicaría estos resultados. Este proceso sería similar al observado entre el ¹LFX y el tampón fosfato (PB) (Esquema V.1). La influencia del carácter catiónico del anillo piperazínico sobre la afinidad de éstos

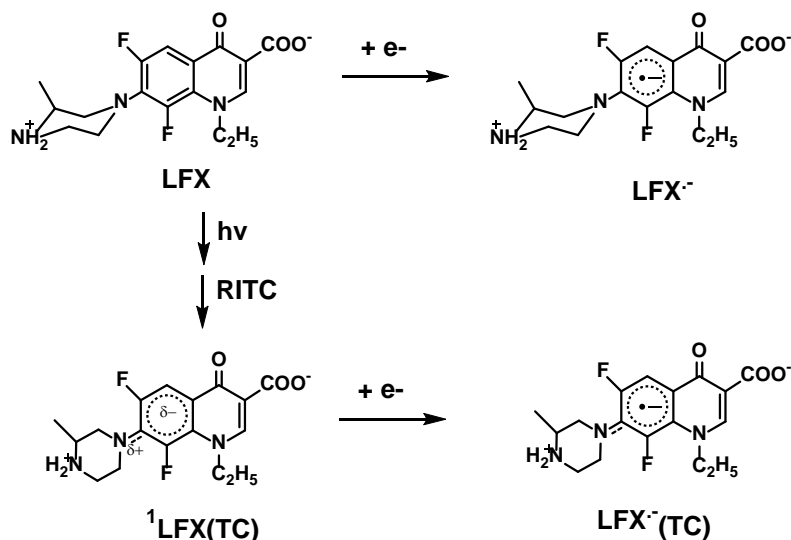
fármacos por el ADN es evidente no solo por las importantes diferencias entre las medidas de fluorescencia de LFX o su derivado acetilado ALFX, sino también por la diferente eficiencia en la detección de sus intermedios carbocationicos mediante la técnica de FDL (Figura V.5). Así, la mayor afinidad que presenta LFX por el ADN, en comparación con la que presenta ALFX, es una muestra inequívoca de que debe existir una asociación entre el catión piperazínico de LFX y los restos fosfato de la cadena de ADN.

Las medidas de fluorescencia y los espectros UV-Visible de disoluciones acuosas de ADN obtenidas tras la irradiación de LFX con ADN (5×10^{-4} M) (donde el 40% de LFX esta acomplejado con ADN) y su subsiguiente purificación con sephadex, no mostraron ninguna evidencia de que el anillo quinolínico atacase al ADN, lo cual parece descartar a la formación de enlaces covalentes entre (A)LFX y las biomoléculas como el camino principal para producir daño al ADN. Así, aunque se produce una transferencia electrónica entre ^1FQ y el ADN que genera sus correspondientes radical anión de FQ y radical catión de un nucleósido, sin embargo, la separación de cargas que se produce en el ADN por el salto de las cargas positivas a través de su cadena alejándose del anión radical de la droga [35] previene la formación de uniones covalentes (Ver vías II y III en el Esquema V.3). Esta hipótesis, además de explicar los resultados descritos, ayuda a entender los resultados obtenidos en las irradiaciones de LFX en presencia de dGuo, donde sí se detectaban aductos LFX-dGuo. Así, la formación de estas uniones covalentes ocurriría cuando el nucleósido no formara parte de la estructura del ADN (vía V) con lo que el radical deshalogenado de LFX(LFX(-F \cdot)) si se uniría al radical dGuo. Los productos LFX2 y LFX3, formados durante las irradiaciones en presencia tanto de dGuo como de ADN, deben proceder del intermedio radicalario LFX(-F), el cual también debe generarse en la fotólisis de LFX en presencia de PB (Esquemas V.2 y V.3) lo que explicaría su la formación de LFX2 y LFX3 también en presencia de esta sal.

La formación del producto LFX1, como se describe en la literatura [18], procede de una reacción intramolecular del carbeno generado por la deshalogenación del estado excitado triplete de LFX (vía IV).

Los resultados obtenidos estudiando la reactividad de los cationes arilo de (A)LFX con dGuo mediante la técnica de fotólisis de destello láser revelaron unas constantes de desactivación (K_q) del mismo orden de magnitud para ambos intermedios (ca. $0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para LFX y $0,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para ALFX). Sin embargo, el radical (A)LFX(-F \cdot) generado mediante una reacción de transferencia electrónica entre los cationes arilo y el dGuo no pudo ser detectado (aunque este hecho no es de extrañar ya que es conocido que este tipo de radicales tienen una gran reactividad lo

que hace que no puedan ser detectados en escala de tiempo de nanosegundos) [36].



Esquema V.4. Generación de radical aniones de LFX desde su estado fundamental y su estado excitado singlete.

La reacción intramolecular entre ¹LFX y el ADN debe generar sus radicales iónicos correspondientes (vía I) pero ninguno de estos intermedios pudo ser detectado mediante fotólisis de destello láser. Sin embargo, contrariamente a lo inicialmente esperado, mediante la técnica de radiólisis pulsada si pudo detectarse el intermedio LFX^{•-}. Este hecho puede ser atribuido a la generación de dos isómeros conformacionales diferentes de LFX^{•-} (Esquema V.4). El primero de ellos, detectado mediante radiólisis pulsada, procede de la adición de un electrón al estado fundamental de LFX y debería de ser más estable que el obtenido por reacción de la transferencia electrónica de un electrón de ADN a ¹LFX. En éste último caso, antes de la reacción entre el ADN y ¹LFX, la molécula excitada sufre una rehibridación acompañada de una reacción intramolecular de transferencia de carga (RITC) del par de electrones de N (1) del anillo piperazínico [30], lo cual hace más rico en electrones su anillo quinolínico, con lo que la adición de otro electrón aumentará su proceso de deshalogenación y por lo tanto este radical anión tendrá unos los tiempos de vida mucho más cortos que el generado desde su estado fundamental.

Esto también podría explicar por qué el radical anión de LFX generado por radiólisis pulsada presenta un espectro de absorción similar al de ALFX y FLU, que no tienen anillo piperazínico en su estructura (Esquema V.4). Por otro lado, el radical catiónico de ADN no fue detectado debido a la deslocalización de los radicales

catiónicos en las cadenas de ADN como se ha comentado más arriba [35].

También se ha analizado la posibilidad de que los estados excitados triplete de (A)LFX acomplejados al ADN sufran una deshalogenación y posteriormente acepten un electrón del ADN o al revés, primero acepten el electrón y luego pierdan el flúor. Sin embargo, el hecho de que el aumento de droga acomplejada, detectada por fluorescencia, sea coincidente con un descenso en la generación del correspondiente catión arilo excluye ambos caminos (ver Figuras V.2 y V.5).

Todos los resultados obtenidos con (A)LFX están a favor de que vías II y III son los principales caminos para producir daño al ADN (Esquema V.3).

Mediante reacciones entre los radicales o/y los radicales catiónicos del ADN se podrían explicar las dimerizaciones del ADN [19] y la reactividad de estos intermedios con el oxígeno molecular justificaría la generación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina como el más importante daño oxidativo al ADN [16]. Así, la eficiente pérdida de flúor de (A)LFX...ADN (ver Tabla 1), la cual ocurriría a través de una reacción de transferencia electrónica entre el estado excitado singlete de (A)LFX y el ADN, es el proceso clave en la generación del daño al ADN por FQ dihalogenadas. En el caso de las FQ monohalogenadas, tienen una ineficiente deshalogenación [22] y por ello estas drogas necesitan más tiempo de irradiación para detectar daño en el ADN (mostrado por CPX en la Figura V.6 y que también se ha descrito en la literatura para otras FQ [16]). De esta manera, nuestros resultados confirman que el daño oxidativo al ADN se produce principalmente por procesos tipo I (vía radical) en las FQ dihalogenadas mientras que para las FQ monohalogenadas este daño será producido por procesos tipo II (vía oxígeno singlete) [16]. El hecho de que la mayoría del daño fotoinducido por LFX al ADN se produzca a dosis de luz por debajo de 72 mJ/cm² puede asociarse con la alta fotolabilidad de la droga.

De hecho, bajo estas condiciones, LFX ya se habrá fotodeshalogenado y los SSB formados a más largas dosis de luz serían fotoinducidos por procesos tipo II por sus fotoproductos monohalogenados.

Las diferencias entre las constantes de asociación entre ADN...LFX y ADN...ALFX es la razón principal para comprender la elevada capacidad de LFX para producir daño en el ADN ya que el porcentaje de LFX...DNA es el 16% mientras que el de ALFX estaría sobre el 4%.

V.4. Conclusiones

El estudio llevado a cabo ha puesto de manifiesto que el camino de fotodeshalogenación de FQ dihalogenadas como LFX y ALFX que produce el daño al ADN, se produce a través de una reacción de transferencia electrónica intermolecular entre el estado singlete de (A)LFX y ADN del complejo (A)LFX--ADN, generándose los correspondientes radical iones. Por lo tanto, como ALFX tiene una constante de asociación ca. 4 unidades menos que la obtenida para LFX, la fotólisis de su derivado acetilado genera un menor daño al ADN. Se observó que la fotodeshalogenación de (A)LFX en presencia de dGuo conducía a la formación de un aducto covalente, pero su mecanismo de reacción era diferente al que ocurre entre ellos cuando la FQ está asociada al ADN, por lo que no se generaban los mismos intermedios ni se produce dicha asociación covalente en el ADN.

El presente estudio puede servir de base para el desarrollo de nuevos bloqueadores de la topoisomerasa de ADN en mamíferos como agentes fotoquimioterapéuticos ya que cambiando los sustituyentes de las FQ, es posible modular no solo sus propiedades farmacológicas, sino también su afinidad por las biomoléculas y sus propiedades fotosensibilizantes.

V.5. Procedimiento experimental

V.5.1. Materiales

ADN "Calf Thymus", ciprofloxacino (CFX), 2'-deoxiguanosina (dGuo), flumequina (FLU), y lomefloxacino (LFX) y otros productos químicos son de origen comercial (Sigma-Aldrich). El producto prB322 ha sido suministrado por Roche y las columnas de sephadex G-25 por GE Healthcare. Los tampones de fosfato de sodio (PB) y bicarbonato de sodio han sido preparados utilizando productos de grado reactivo en agua mili-Q. El pH de las disoluciones se ha medido utilizando un electrodo de vidrio ajustándolo con NaOH hasta pH 7.4. Los demás productos químicos utilizados, eran de grado reactivo.

Las muestras de FQ han sido preparadas a distintas concentraciones de PB empezando por una disolución madre 300 mM de PB ajustada a pH 7.4. El ácido 7-(4-acetil-metil-1-piperazinil)-1-etil-6,8-difluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico (ALFX) se ha preparado de igual forma que la descrita [18], con LFX (300 mg, 0.9

mmol) en acetonitrilo (Ac_2O) (50 mL) manteniéndolo a reflujo durante 7h. Posteriormente la disolución se enfrió a temperatura ambiente y concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en agua, neutralizó hasta pH 7.4 y se extrajo con diclorometano (CH_2Cl_2) concentrando finalmente hasta sequedad.

V.5.2. Medidas de absorción y emisión

Los espectros ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 50). Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en un fluorímetro (PTI LPS-220B). Las medidas de tiempos de vida se midieron utilizando un espectrómetro de tiempo resuelto (TimeMaster fluorescence lifetime spectrometer TM-2/2003). Se utilizó una lámpara de hidrógeno/nitrógeno (anchura de pulso 1.8 ns) como fuente de excitación. Las señales cinéticas se registraron utilizando funciones de desactivación monoexponenciales. Las medidas se realizaron en ausencia de oxígeno y a temperatura ambiente (25 °C) en cubetas de 1cm de paso. Las longitudes de onda de excitación utilizadas para registrar los tiempos de vida de fluorescencia fueron de 320 nm.

El rendimiento cuántico de fluorescencia del bisulfato de quinina en 1N, H_2SO_4 ($\phi_F = 0.546$), se usó como estándar.

Los experimentos de desactivación de fluorescencia de FQ por ADN tras la excitación a 355 nm, 348 nm y 320 nm se llevaron a cabo utilizando 10^{-4} M de FQ tamponadas en disoluciones acuosas (10^{-3} M en PB, a pH 7.4). Las concentraciones de ADN se determinaron espectrofotométricamente teniendo en cuenta el coeficiente de absorción molar $\epsilon_{258\text{nm}} = 6700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [22, 37]. Se utilizó la ecuación 1 para determinar la naturaleza de las interacciones fármaco-ADN [38-42]:

$$\boxed{F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]} \quad (1)$$

en donde F_0 y F eran las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivador respectivamente, $[Q]$ era la concentración del desactivador (ADN desde 10^{-5} hasta 1.5×10^{-3} M) y K_{sv} la constante de desactivación de Stern-Volmer.

V.5.3. Experimentos de fotólisis de destello láser

Para registrar los espectros y las trazas de desactivación, se utilizó un sistema de fotólisis de destello láser cuyas especificaciones se muestran en el apartado III.5.2. de la presente tesis.

Se prepararon disoluciones acuosas de 10^{-4} M de (A)LFX en 10^{-3} M de NaHCO_3 bajo condiciones anaeróbicas burbujeando en N_2O . Se registraron los espectros de absorción transitorios a diferentes tiempos tras el pulso de la luz láser para cada muestra en ausencia y presencia de ADN, prestando especial atención a los cambios de rendimiento cuántico de cruce intersistema y a la generación de nuevos intermedios. Las concentraciones de ADN se mantuvieron en el rango de 10^{-4} y 10^{-2} M.

Los experimentos de desactivación se realizaron manteniendo constante el pH en 7.4 durante todo el experimento.

Las constantes de los cationes arilo desactivados por biomoléculas se determinaron utilizando la ecuación de Stern-Volmer (mostrada en capítulos anteriores):

$$\boxed{1/\tau = 1/\tau_0 + K [Q]} \quad (2)$$

V.5.4. Experimentos de Radiólisis Pulsada

Los experimentos de radiólisis pulsada se realizaron utilizando un acelerador lineal de electrones (RadiationDynamics Ltd. (UK) 3GHz) a 12 MeV. Utilizamos un pulso de duración entre 0.22 a 2 μs y una corriente de 30 mA. El acelerador operaba a 10 pulsos por segundo [43].

El sistema de detección consistió en una lámpara de arco de Xenón y una unidad pulsada utilizando un monocromador Kratos y lentes ópticas de cuarzo. Las medidas de absorción a diferentes longitudes de onda seleccionadas con el monocromador, anchos de banda de 10 nm, se observaron como una función del tiempo antes y después del impulso de radiación, usando la detección fotoeléctrica. La salida del fotomultiplicador (EMI 9558Q) se muestra en una Tektronix TDS 380 de digitalización osciloscopio. El procesamiento de datos se realizó en un PC usando el software Dan desarrollado en casa. La celda de muestra, construido a partir de cuarzo Spectrosil, tenía una longitud de trayectoria óptica de 25 mm [43]. Se prepararon disoluciones acuosas de varias FQ (LFX, ALFX y FLU) en concentraciones 1 a 5×10^{-5} M, en presencia de 10 mM de tampón fosfato (PB) y en presencia de 0.1 M en t-

butanol a pH 7.4.

V.5.5. Análisis de la fotólisis en estado estacionario y de los fotoproductos

Para llevar a cabo la fotólisis, se prepararon disoluciones de LFX (10^{-4} M) a pH 7.4 en ausencia y presencia de 1 mM de PB, 2'-deoxiguanosina (dGuo, 10^{-2} M) y ADN (5×10^{-4} M).

La fotólisis de (A)LFX se estudió a diferentes concentraciones de PB (1 hasta 300 mM).

Las irradiaciones se realizaron en un reactor fotoquímico Rayonet equipado con ocho luces negras de fósforo que emitían en un rango de longitudes de onda de rango de 310-390 nm, con un máximo en 350 nm [44].

Los rendimientos cuánticos se obtuvieron por comparación con el valor reportado en la bibliografía para LFX que era de 0.6 en agua a pH 7.4 [17].

A todas las muestras de (A)LFX se les eliminó el aire y se mantuvieron en oscuridad durante las 24h previas al análisis para poder detectar tan solo los fotoproductos estables.

Los crudos de reacción se analizaron por HPLC utilizando una columna *Spherisorb* (ODS-2, 10 mm de empaquetamiento) y una bomba *I-6250*. Los cromatogramas se monitorizaron manteniendo fija una longitud de onda de 325 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético en proporciones 20/79.9/0.1 y 35/64.9/0.1 para LFX y ALFX, respectivamente. Los fotoproductos correspondientes se identificaron mediante UPLC-HRMS. Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se utilizó un equipo UPLC-Masas que constaba de un sistema *ACQUITY UPLC* (Waters Corp.) equipado con un autosampler a 4°C. Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna *ACQUITY UPLC BEH C18* (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m), manteniendo la temperatura de la columna en 40°C. Para el análisis se utilizó un sistema de gradiente, utilizando como fase móvil una mezcla de metanol/agua conteniendo un 0.01% de ácido fórmico. El espectrofotómetro *Waters ACQUITY™ XevoQToF* (Waters Corp.) se conectó al sistema UPLC a través de una interfase (ESI). La fuente ESI, operó en modo ionización positivo con un voltaje de 3.0 kV. La temperatura se mantuvo entre los 100°C y 400°C. Todos los datos se recogieron usando un software *Masslynx™* (Waters Corp.).

V.5.6. Análisis de la fotodegradación de lomefloxacin (LFX) en presencia de ADN

Para llevar a cabo las medidas de espectrofotometría UV-VIS y fluorescencia se utilizó un radio molar 1/1 de fármaco/ADN.

Para ello, LFX fue añadida sobre ADN (5×10^{-4} M) y se mantuvo en la oscuridad durante 30 minutos. Las muestras fueron irradiadas durante varios periodos de tiempo y después se mantuvieron en la oscuridad durante 30 minutos más.

El fármaco se separó del ADN utilizando columnas sephadex G-25 equilibradas previamente con una mezcla 2/8 de etanol/agua en 10 mM PB. Las muestras control incluyeron mezclas fármaco-ADN (que se mantuvieron en la oscuridad), ADN irradiado y no irradiado, y ADN con fármaco irradiado. La muestra que contenía únicamente ADN, fue analizada mediante espectrofotometría UV-VIS y mediante fluorescencia utilizando distintas longitudes de onda (320, 330 y 350 nm).

V.5.7. Análisis del daño fotoinducido al ADN

Todas las disoluciones de ADN y de los distintos fármacos se prepararon en 1 mM PB. A continuación, las mezclas que contenían pBR322 (20 μ M) y LFX, ALFX o CPX (100 μ M) se irradiaron utilizando un reactor fotoquímico *LuzChem* equipado con seis bombillas negras de fósforo que emitían en el rango 310-390 nm con un máximo en 350 nm [44]. Para la detección de los SSB se añadió inmediatamente después de la irradiación un tampón formado por un 0.25% azul de bromofenol y un 40% sacarosa en agua MilliQ.

Las muestras se cargaron con un 0.8% de gel de agarosa en bromuro de etidio. Tras la electroforesis, se determinó la abundancia relativa de las formas I (superenrollada) y II (relajada) del ADN mediante densitometría (Figura V.7).

V.6. Referencias bibliográficas

1. Domagala, J. M., Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., Solomon, M. New structure-activity-relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* **1986** *29*, 394-404.
2. Kang, D. H., Kim, J. S., Jung, M. J., Lee, E. S., Jahng, Y., Kwon, Y., Na, Y. New insight for fluoroquinophenoxazine derivatives as possibly new potent topoisomerase I inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1520-1524.
3. Azema, J., Guidetti, B., Dewelle, J., Le Calve, B., Mijatovic, T., Korolyov, A., Vaysse, J., Malet-Martino, M., Martino, R., Kiss, R. 7-((4-Substituted)piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin: Synthesis and in vitro biological evaluation as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5396-5407.
4. Cullen, M., Baijal, S. Prevention of febrile neutropenia: use of prophylactic antibiotics. *Br. J. Cancer.* **2009**, *101*, S11-S14.
5. Kim, K., Pollard, J. M., Norris, A. J., McDonald, J. T., Sun, Y. L., Micewicz, E., Pettijohn, K., Damoiseaux, R., Iwamoto, K. S., Sayre, J. W., Price, B. D., Gatti, R. A., McBride, W. H. High-throughput screening identifies two classes of antibiotics as radioprotectors: tetracyclines and fluoroquinolones. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7238-7245.
6. Al-Trawneh, S. A., Zahra, J. A., Kamal, M. R., El-Abadelah, M. M., Zani, F., Incerti, M., Cavazzoni, A., Alfieri, R. R., Petronini, P. G., Vicini, P. Synthesis and biological evaluation of tetracyclic fluoroquinolones as antibacterial and anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5873-5884.
7. Paul, M., Gafter-Gvili, A., Fraser, A., Leibovici, L. The anti-cancer effects of quinolone antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2007**, *26*, 825-831.
8. Perrone, C. E., Takahashi, K. C., Williams, G. M. Inhibition of human topoisomerase II alpha by fluoroquinolones and ultraviolet a irradiation. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 16-22.
9. Lhiaubet-Vallet, V., Boscá, F., Miranda, M. A. Photosensitized DNA damage: the case of fluoroquinolones. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 861-868.
10. Marrot, L., Belaidi, J. P., Jones, C., Perez, P., Riou, L., Sarasin, A., Meunier, J. R. Molecular responses to photogenotoxic stress induced by the antibiotic lomefloxacin in human skin cells: From DNA damage to apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121*, 596-606.
11. Meunier, J. R., Sarasin, A.; Marrot, L. Photogenotoxicity of mammalian cells: A review of the different assays for in vitro testing. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*,

- 437-447.
12. Martinez, L. J., Li, G., Chignell, C. F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 599-602.
 13. Chignell, C. F., Haseman, J. K., Sik, R. H., Tennant, R. W., Trempus, C. S. Photocarcinogenesis in the Tg.AC mouse: lomefloxacin and 8-methoxypsoralen. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 77-80.
 14. Fasani, E., Profumo, A., Albin, A. Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 666-674.
 15. Jeffrey, A. M., Shao, L., Brendler-Schwaab, S. Y., Schluter, G., Williams, G. M. Photochemical mutagenicity of phototoxic and photochemically carcinogenic fluoroquinolones in comparison with the photostable moxifloxacin. *Arch. Toxicol.* **2000**, *74*, 555-559.
 16. Spratt, T. E., Schultz, S. S., Levy, D. E., Chen, D., Schluter, G., Williams, G. M. Different mechanisms for the photoinduced production of oxidative DNA damage by fluoroquinolones differing in photostability. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 809-815.
 17. Albin, A., Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 238-250.
 18. Soldevila, S., Boscá, F. Photoreactivity of fluoroquinolones: nature of aryl cations generated in water. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3940-3943.
 19. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Boscá, F. Generation of detectable singlet aryl cations by photodehalogenation of fluoroquinolones. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 6441-6443.
 20. Freccero, M., Fasani, E., Mella, M., Manet, I., Monti, S., Albin, A. Modeling the photochemistry of the reference phototoxic drug lomefloxacin by steady-state and time-resolved experiments, and DFT and post-HF calculations. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 653-663.
 21. Fasani, E., Manet, I., Capobianco, M. L., Monti, S., Pretali, L., Albin, A. Fluoroquinolones as potential photochemotherapeutic agents: covalent addition to guanosine monophosphate. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3621-3623.
 22. Sortino, S., Condorelli, G. Complexes between fluoroquinolones and calf thymus DNA: binding mode and photochemical reactivity. *New J. Chem.* **2002**, *26*, 250-258.
 23. Boscá, F., Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M. C., Castell, J. V., Miranda, M. A. The

- triplet energy of thymine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318-6319.
24. Cuquerella, M. C., Andreu, I., Soldevila, S., Boscá, F. Triplet Excimers of Fluoroquinolones in Aqueous Media. *J. Phys. Chem. A.* **2012**, *116*, 5030-5038.
25. Cuquerella, M. C., Boscá, F., Miranda, M. A. Photonucleophilic aromatic substitution of 6-fluoroquinolones in basic media: Triplet quenching by hydroxide anion. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7256-7261.
26. Son, G. S., Yeo, J. A., Kim, M. S., Kim, S. K., Holmen, A., Akerman, B., Norden, B. Binding mode of norfloxacin to calf thymus DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6451-6457.
27. Ahmad, B., Parveen, S., Khan, R. H. Effect of albumin conformation on the binding of ciprofloxacin to human serum albumin: A novel approach directly assigning binding site. *Biomacromolecules.* **2006**, *7*, 1350-1356.
28. Chi, Z. X., Liu, R. T., Zhang, H. Noncovalent Interaction of Oxytetracycline with the Enzyme Trypsin. *Biomacromolecules.* **2010**, *11*, 2454-2459.
29. Alarcon, E., Edwards, A. M., Aspee, A., Moran, F. E., Borsarelli, C. D., Lissi, E. A., Gonzalez-Nilo, D., Poblete, H., Scaiano, J. C. Photophysics and photochemistry of dyes bound to human serum albumin are determined by the dye localization. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *9*, 93-102.
30. Catalfo, A., Calandra, M. L., Renis, M., Serrentino, M. E., De Guidi, G. Rufloxacin-induced photosensitization in yeast. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 181-189.
31. Alarcon, E., Maria Edwards, A., Aspee, A., Borsarelli, C. D., Lissi, E. A. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 933-943.
32. Lorenzo, F., Navaratnam, S., Edge, R., Allen, N. S. Primary Photoprocesses in a Fluoroquinolone Antibiotic Sarafloxacin. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 886-894.
33. Cuquerella, M. C., Boscá, F., Miranda, M. A., Belvedere, A., Catalfo, A., de Guidi, G. Photochemical properties of ofloxacin involved in oxidative DNA damage: A comparison with rufloxacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 562-570.
34. Candeias, L. P., Steenken, S. Ionization of purine nucleosides and nucleotides and their components by 193-nm laser photolysis in aqueous solution. Model studies for oxidative damage of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 699-704.
35. Steenken, S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503-520.
36. Bazin, M., Boscá, F., Marín, M. L., Miranda, M. A., Patterson, L. K., Santus, R. A laser flash photolysis and pulse radiolysis study of primary photochemical processes of flumequine. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 451-457.

37. Zhang, P., Song, X., Li, H., Yao, S., Wang, W. Transient species of several fluoroquinolones and their reactions with amino acids. *J. Photochem. Photobiol. A.* **2010**, 2, 15, 191-195.
38. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Boscá, F. Role of excited state intramolecular charge transfer in the photophysical properties of norfloxacin and its derivatives. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, 110, 2607-261.
39. Fasani, E., Negra, F. F. B., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5388-5395.
40. Fasani, E., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2, 391-397.
41. Sauvaigo, S., Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Ravanat, J. L., Cadet. Analysis of fluoroquinolone-mediated photosensitization of 2'-deoxyguanosine, calf thymus and cellular DNA: Determination of Type-I, Type-II and triplet-triplet energy transfer mechanism contribution. *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 230-237.
42. Martinez, L., Chignell, C. F. Photocleavage of DNA by the fluoroquinolone antibacterials. *Photochem. Photobiol. B.* **1998**, 45, 51-59.
43. Liu, C. S., Hernandez, R., Schuster, G. B. Mechanism for radical cation transport in duplex DNA oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2877-2884.
44. Scaiano, J. C., Stewart, L. C. Phenyl radical kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3609-3614.

Capítulo VI: Propiedades fotoalérgicas de las fluoroquinolonas

VI.1. Introducción

Como ya se ha comentado en capítulos previos, las FQ 6,8-dihalogenadas desarrollan su actividad farmacológica inhibiendo la replicación y reparación del ADN bacteriano [1], presentan actividad antitumoral [2-6], y experimentos *in vitro* e *in vivo* han confirmado sus efectos anticancerígenos [7]. Los efectos genotóxicos que presentan aumentan tras irradiación UV y confiere a las FQ la propiedad de agentes fotoquimioterapéuticos [8-16]. Por ello, durante los últimos años, se han llevado a cabo un gran número de estudios relativos a las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de FQ dihalogenadas como fleroxacino (FLX), BAY y3118, LFX y ALFX[12,17-21].

Recientemente se ha descrito la fotogeneración de un catión arilo con propiedades alquilantes, el cual se forma mediante una inusual heterólisis del enlace C₈-halógeno de las FQ dihalogenadas [17-21]. Este intermedio ha sido propuesto como el principal desencadenante de sus efectos secundarios [20, 22-27]. Así, se sugirió la formación de enlaces covalentes entre la FQ deshalogenada y el ADN o las proteínas como el proceso clave en los mecanismos de fotoalergia y fotogenotoxicidad inducidos por dichos fármacos [17-21]. No obstante, para las FQ monohalogenadas, que no generan este tipo de intermedio, también han sido descritas propiedades fotohapténicas [28-30]. Se han detectado uniones covalentes entre las FQ monohalogenadas y la albúmina sérica bovina (ASB) tras sus irradiaciones UV [29]. En este contexto se ha analizado la reactividad de los estados excitados triplete de algunas de las FQ monohalogenadas con tirosina (Tyr) y triptófano (Trp)[31, 32]. Sin embargo, no hay investigaciones relacionadas con la fotoquímica de las FQ dihalogenadas en presencia de proteínas o aminoácidos.

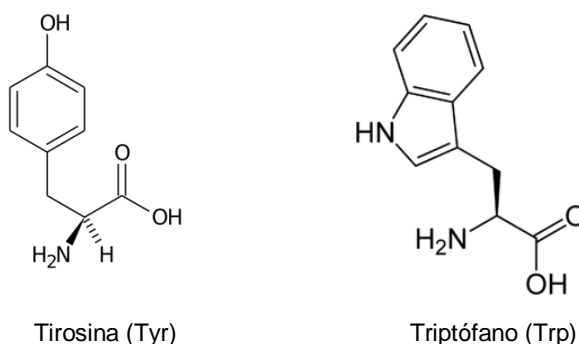


Figura VI.1. Estructuras de Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp)

Por ello, en el presente capítulo se procede a analizar la fotoreactividad de LFX como modelo de FQ dihalogenadas tanto en presencia de una proteína, se utilizará la

albúmina sérica humana (ASH), como en presencia de algunos de sus aminoácidos más reactivos (Tyr, Trp) (Figura VI.1).

Mediante este estudio se pretende determinar el camino principal implicado en la generación de enlaces covalentes entre este tipo de fármacos y proteínas.

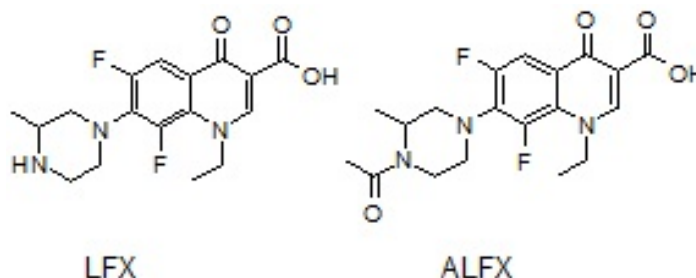


Figura VI.2. Estructura de LFX y su derivado N-acetilado ALFX

La acetilación del anillo piperazínico de una FQ puede producir cambios en las constantes de asociación a biomoléculas, como se vio en el capítulo anterior con (A)LFX y el ADN, así como modificar el comportamiento fotofísico y fotoquímico de las FQ [17, 33-35]. Sin embargo, estos cambios pueden ayudar a entender mejor los procesos fotoquímicos involucrados en las interacciones entre las FQ y las biomoléculas. Por ello en el presente estudio también se incluyó la molécula de la N-acetilación de LFX (ALFX) (Figura VI.2)

Estudios de emisión, fotólisis de destello láser y el análisis de los productos obtenidos mediante las técnicas de filtración en gel, cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (UPLC-HRMS) con (A)LFX en presencia de ASH, Tyr o Trp demostrarán que el principal proceso involucrado en la fotounión de las FQ dihalogenadas con la albúmina se produce mediante un proceso de transferencia electrónica desde el estado excitado singlete de la forma complejada ($^1(A)LFX-ASH$).

VI.2. Resultados y Discusión

VI.2.1. Estudio de las interacciones entre lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado (ALFX) con albúmina sérica humana (ASH) mediante estudios de emisión

Desactivación de la fluorescencia de proteínas por su interacción con fluoroquinolonas:

La desactivación de la emisión del triptófano (Trp) de la albúmina sérica humana (ASH) es a menudo utilizada para obtener información sobre la asociación entre una droga y la albumina [36].

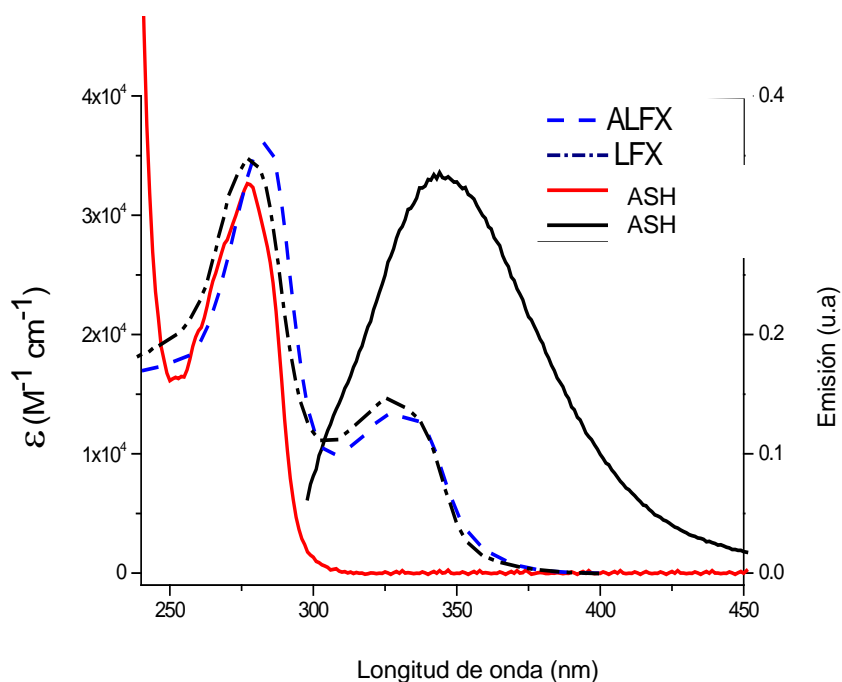


Figura VI.3. Espectros de absorción de ALFX(---), LFX (-.-.-), ASH (línea roja) y la banda de emisión del Trp en ASH (línea negra) a una longitud de onda de excitación de 320 nm.

La banda de fluorescencia del Trp de ASH se encuentra centrada ca. 344 nm (Figura VI.3.) y corresponde exclusivamente a ella si se excita a la ASH a 295 nm [36]. En éste contexto, los experimentos se realizaron con disoluciones acuosas tamponadas 10^{-3} M PB (pH 7.4) de 10^{-5} M de ASH en presencia de FQ (entre 10^{-6} M y 1.2×10^{-5} M).

Antes de proceder al análisis de estos resultados se realizaron las correcciones del efecto filtro que producen las FQ sobre la longitud de onda de excitación así como sobre la de emisión del Trp (los detalles se mostrarán en el apartado de experimental).

Tal y como se puede ver en la Figura VI.3., (A)LFX absorben a longitudes de onda donde emite ASH y en la longitud de onda de excitación (295 nm) por lo que las intensidades de la banda de emisión de ASH que se obtienen están alteradas y se requieren correcciones. Así, adicionando cantidades crecientes de LFX a una disolución de ASH no se detectó ninguna desactivación significativa de la emisión de la ASH. Por el contrario la adición de ALFX sí produjo una apreciable disminución de la fluorescencia de la proteína. De esta forma, asumiendo que en éste proceso el desactivador al unirse a la albumina suprime totalmente su fluorescencia, a partir de la ecuación 1:

$$\boxed{F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]} \quad (1)$$

se pudo determinar la constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para ALFX--ASH (ca. $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). En el caso de las interacciones LFX—ASH la K_{sv} no se pudo calcular debido a la baja desactivación de fluorescencia que se obtuvo. Los valores de K_{sv} se corresponderán con las constantes de asociación fármaco-proteína si la desactivación de la fluorescencia es únicamente estática y la unión de la droga a la proteína produce una desactivación total de su fluorescencia [37]. Por lo tanto, si aplicamos estas condiciones, la K_{sv} resultante sería una buena aproximación de la constante de asociación FQ--albúmina [38]. Así, los resultados también son indicativos de que las constantes de asociación (K_a) de LFX--ASH deben ser menores de 10^3 M^{-1} , lo cual está de acuerdo con el obtenido por electroforesis capilar [39]. En éste contexto cabe destacar que existe una importante divergencia entre el resultado obtenido para LFX en el presente estudio y los datos descritos en la literatura utilizando la misma metodología para su asociación con albúminas séricas humanas y bovinas [40-42]. Este hecho probablemente sea debido a la falta de la aplicación de las correcciones por el efecto filtro en los datos de su emisión como ya se ha descrito en estudios previos con otras FQ [31].

Desactivación de la fluorescencia del derivado acetilado de lomefloxacin (ALFX) por su interacción con albúmina sérica humana (ASH):

Los resultados obtenidos con anterioridad, así como aquellos descritos recientemente para el estudio de otras FQ [31], están de acuerdo con la baja afinidad

que presentan muchas FQ por ASH. El estudio de la desactivación de la fluorescencia de FQ, se llevó a cabo adicionando ASH (hasta 10^{-4} M) sobre disoluciones de FQ 10^{-4} M ($\lambda_{exc.} = 320$ nm) con el objetivo de determinar con mayor exactitud las constantes de asociación para (A)LFX y una FQ monohalogenada como el norfloxacin (NFX).

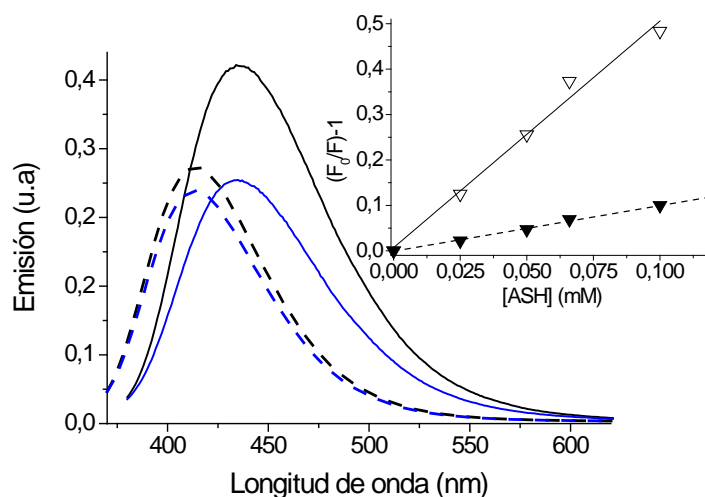


Figura VI.4. Espectro de emisión de 10^{-4} M LFX ($\lambda_{exc.} = 320$ nm, líneas rayadas) o ALFX (líneas sólidas) en disolución acuosa 10^{-3} M PB, en ausencia (líneas negras) y presencia (líneas azules) de 10^{-4} M ASH. Insertado: Representación de Stern-Volmer (F/F_0 vs. [ASH]) correspondiente a la desactivación de la fluorescencia de disoluciones 10^{-4} M de ALFX (triángulos negros) y LFX (triángulos blancos) por la adición de cantidades crecientes de ASH.

La Figura VI.4. muestra las intensidades de fluorescencia de (A)LFX en presencia y ausencia de 10^{-4} M de ASH. Es de destacar el hecho de que la emisión de ALFX es desactivada más eficientemente que la de LFX. En el caso de NFX, se observaba una desactivación de su emisión similar a la observada para LFX (los datos no se muestran). Para obtener la constantes de asociación (K_a), se recurrió a la ecuación de Stern-Volmer (K_{SV}) asumiendo que la unión FQ--ASH no emite [43] y que no está involucrado ningún proceso dinámico en la desactivación de la emisión. Esta última condición fue confirmada cuando no se observaron cambios en los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de ambas FQ en ausencia y presencia de ASH (τ_F para LFX y ALFX son 1.1 y 1.7 ns respectivamente). De esta manera, las K_{SV} determinadas para la formación del complejo LFX--ASH fueron ca. 1×10^3 M $^{-1}$, valores que están de acuerdo con los determinados utilizando otras técnicas [39]. Sin embargo, la K_{SV} para ALFX resultó ser bastante mayor (ca. 5×10^3 M $^{-1}$) y muy cercana a la obtenida en los ensayos de desactivación de fluorescencia de las proteínas. También se observó

experimentalmente que un cambio en la longitud de onda de excitación de 320 nm a 355 nm no modificaba los resultados.

El uso de sondas específicas para desplazar ligandos unidos a proteínas es un método bien conocido para asignar los lugares de unión a estas biomoléculas. Así se eligieron el ibuprofeno (IBP) y la warfarina (WAR) (Figura VI.5.) como las moléculas modelo que se unen mayoritariamente al sitio I y al sitio II respectivamente [44].

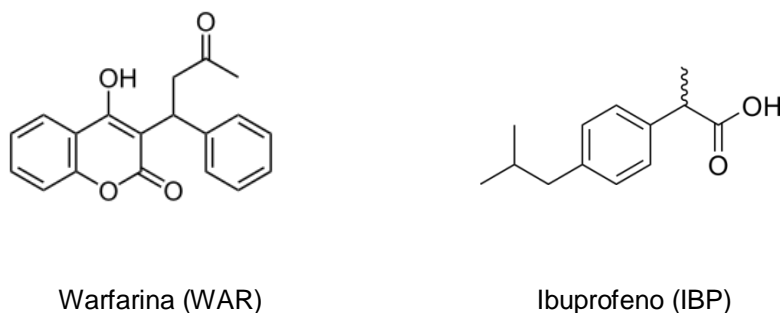


Figura VI.5. Estructuras químicas de Warfarina (WAR) e Ibuprofeno (IBP)

Es importante destacar que el Trp214 es el candidato que con mayor probabilidad formará un complejo en el sitio de unión I de la ASH, mientras que en el caso del sitio II, lo formaría con el aminoácido hidrofóbico Tyr411 [44].

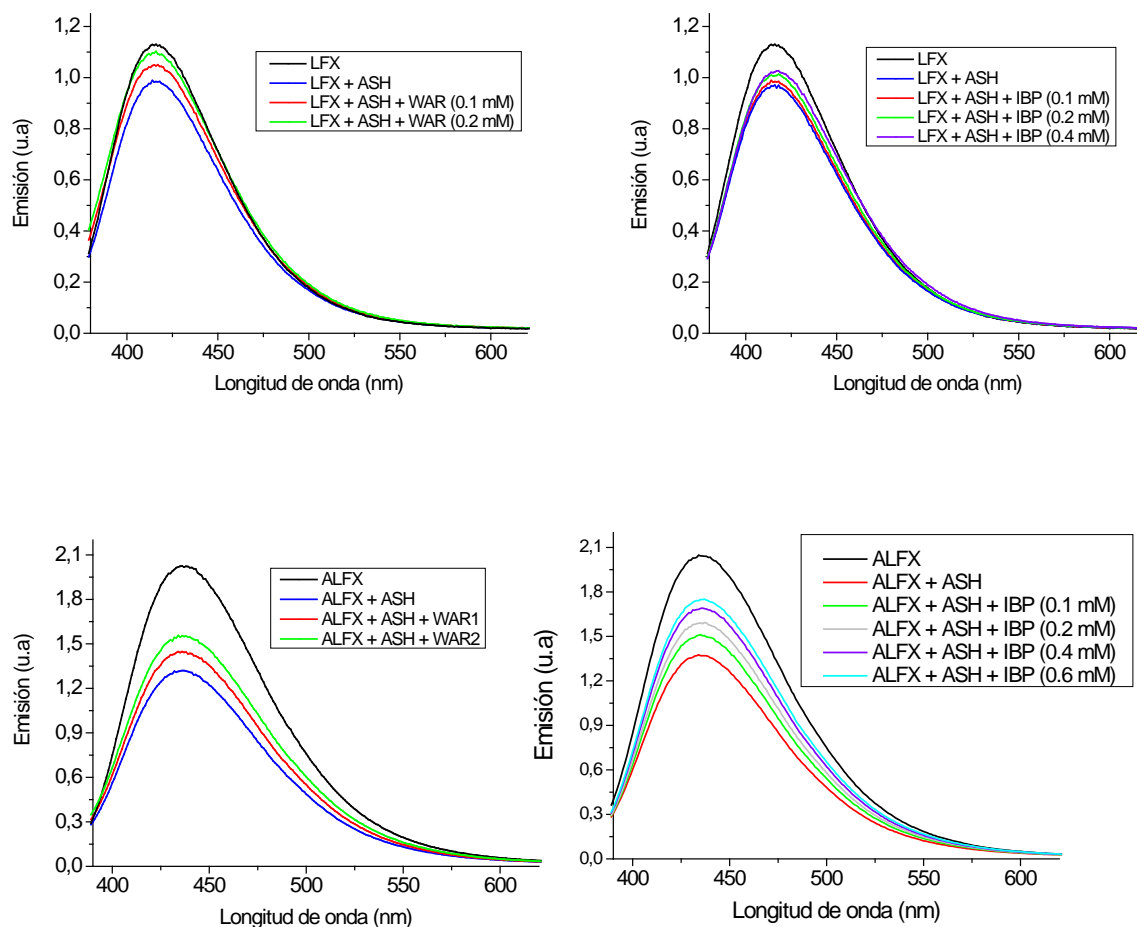


Figura VI.6. Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$) de LFX (arriba) y ALFX (abajo) en disolución acuosa de 10^{-4} M ASH y 1 mM PB antes y después de la adición de cantidades crecientes de IBP (hasta $6 \times 10^{-4} \text{ M}$) y WAR (hasta $2 \times 10^{-4} \text{ M}$).

Los experimentos se llevaron a cabo en disoluciones acuosas (10^{-3} M de PB) de FQ y ASH en proporciones 1/1 y la valoración se realizó por adición de cantidades crecientes de IBP (hasta $6 \times 10^{-4} \text{ M}$) o WAR (hasta $2 \times 10^{-4} \text{ M}$) utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm (Figura VI.6.) La subida de la banda de emisión de LFX resultó ser mayor en presencia de WAR que en presencia de IBP, lo cual indica cualitativamente que LFX está principalmente complejoado en el sitio I.

Las constantes de asociación para WAR--ASH e IBP...ASH son de $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y de $2.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Así, a concentraciones mayores de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ de estas sondas, más del 95% de los respectivos sitios de la albúmina debe de estar ocupada por ambos fármacos. Así la adición de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ de IBP y WAR en disoluciones de FQ/ASH 1/1 ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) bajo nuestras condiciones experimentales evidenció que el porcentaje de LFX que había en el sitio I era de ca. 8% y de ca. 3%

en el sitio II. Un comportamiento diferente se observó al realizar el mismo experimento con una disolución acuosa de ALFX/ASH (1/1). En este caso, la adición de ambas sondas mostró un aumento similar de la emisión, lo cual era indicativo de que ca. 20% de ALFX asociado a ASH estaba en el sitio I otro ca. 20% estaba en el sitio II.

Así, la N-acetilación de LFX produjo un aumento de la afinidad y mayormente el sitio II, lo cual es completamente consistente con el hecho de que el ácido nalidíxico (una quinolona desprovista de anillo piperazínico) tenga mayor afinidad por el sitio II de la ASH [45]. Es razonable pensar que el carácter catiónico del anillo piperazínico aumenta la afinidad de la FQ por el medio acuoso.

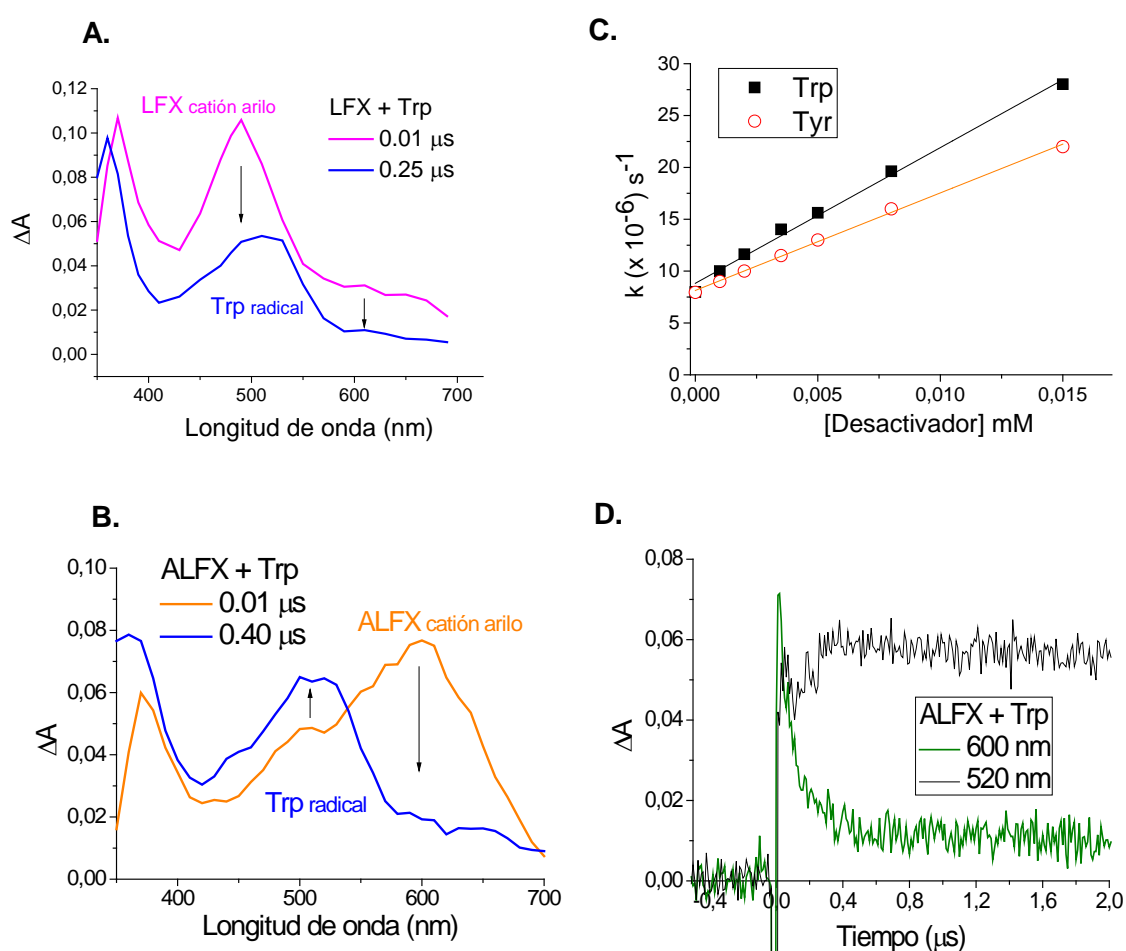


Figura VI.7. **A)** Espectro de absorción transitoria de 10^{-4} M LFX en disolución acuosa 1 mM NaHCO_3 y 15×10^{-3} M Trp 10 ns (línea rosa) y 0.4 μs (línea azul) después de la excitación láser a 355 nm. **B)** Espectro de absorción transitoria de ALFX 10^{-4} M en disolución acuosa 1 mM NaHCO_3 y 9×10^{-3} M de Trp, 10 ns (línea naranja) y 0.4 μs (línea azul) después de la excitación láser a 355 nm. **C)** Recta de Stern-Volmer correspondiente a la desactivación del catión arilo de LFX por Trp (negro) y Tyr (rojo). **D)** Desactivación y crecimiento de las trazas a 600 (verde) y 520 nm (negro), correspondientes con el máximo de absorción del catión arilo de ALFX y el radical Trp, respectivamente.

Reactividad de los cationes arilo de lomefloxacino (LFX) y derivado acetilado (ALFX) con albúmina sérica humana (ASH):

La fotólisis de LFX y ALFX bajo N_2O a pH 7.4 genera los cationes arilo correspondientes de LFX ($\lambda_{m\acute{a}x} = 490$ nm con τ ca. 200 ns) y ALFX ($\lambda_{m\acute{a}x} = 600$ nm con τ ca. 340 ns) [17]. Sus espectros de absorción transitoria se muestran en la Figura VI.7. parte A en rojo y B en verde, respectivamente.

La excitación láser de (A)LFX (10^{-4} M) en disoluciones acuosas con $NaHCO_3$ (10^{-4} M, pH ca. 7.4) bajo atmósfera de N_2O mostraron los mismos espectros de absorción transitoria tanto en ausencia como en presencia de ASH (hasta 1.5×10^{-4} M). Además, los tiempos de vida de los cationes arilo de las FQ no se vieron alterados (Figura VI.8).

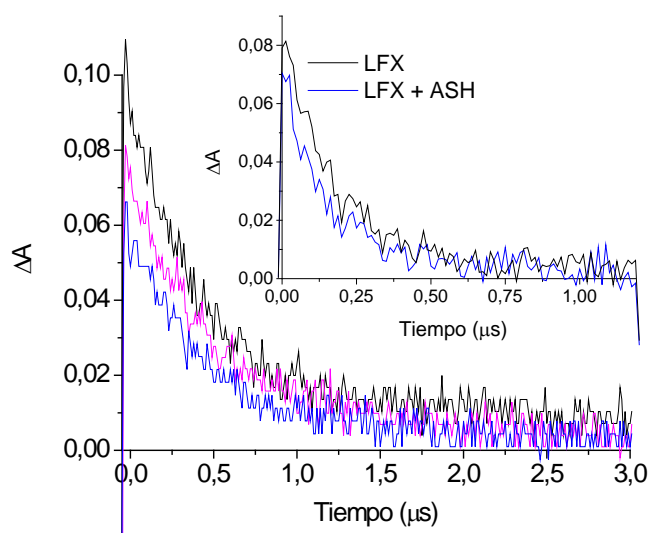
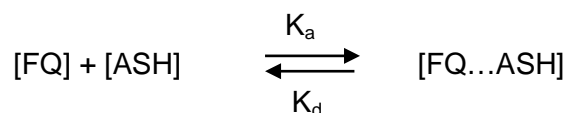


Figura VI.8. Trazas de desactivación a 600 nm del catión arilo de ALFX en disolución acuosa 1 mM $NaHCO_3$, tras la excitación láser a 355 nm de 10^{-4} M ALFX en ausencia (negro) y presencia de 0.5 y 1×10^{-4} M ASH (rosa y azul, respectivamente). Insertado: El mismo experimento utilizando LFX en presencia y ausencia de 1×10^{-4} M ASH a 490 nm.

Sin embargo, la generación de éstos intermedios decrecía cuando la ASH era añadida, siendo éste efecto mucho más importante en el caso del catión arilo de ALFX.

La Figura VI.8. muestra el descenso de la absorción del catión arilo de (A)LFX a sus $\lambda_{m\acute{a}x}$ conforme va aumentando la cantidad de ASH en el medio. De esta forma, considerando el equilibrio fármaco-biomolécula:



la constante de asociación es:

$$K_a = [FQ...ASH] / ([ASH] \times [FQ])$$

Con ello, teniendo en cuenta los valores de K_a previamente determinados mediante el estudio de la desactivación de fluorescencia y así como las concentraciones iniciales de fármacos y biomoléculas en los experimentos de fotólisis de destello láser, el aumento en la cantidad de fármaco complejado es coincidente con la disminución de la generación del catión arilo correspondiente.

Reactividad de los cationes arilo de lomefloxacin (LFX) y de su derivado acetilado de (ALFX) con triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr):

También se utilizó la técnica de fotólisis de destello láser (FDL) para estudiar la reactividad de los cationes arilo de (A)LFX en presencia de Trp y Tyr. Los resultados mostraron que los cationes arilo eran mucho más reactivos a biomoléculas como Tyr y Trp que frente a la albúmina.

Tabla VI.1. Reactividad de los aril cationes de LFX y ALFX con biomoléculas.

	$k_{q(LFX)}/10^9 (M^{-1} s^{-1})$	$k_{q(ALFX)}/10^9 (M^{-1} s^{-1})$
Trp	1.2	0.7
Tyr	0.9	0.1
ASH	<0.001	<0.001

Las constantes bimoleculares (K_q) para estas interacciones se determinaron utilizando la ecuación de Stern-Volmer (ver Figura VI.7C y Tabla VI.1.).

El análisis de los espectros de absorción transitorios obtenidos con disoluciones de ALFX y de LFX con Trp reveló la formación del radical triptófano ($\lambda_{m\acute{a}x}$ a 520 nm) [46] en ambos casos. Sin embargo, con Tyr no fue posible identificar inequívocamente la formación del radical Tyr ($\lambda_{m\acute{a}x} = 410$ nm) debido a que existía la superposición de

señales con otras especies que absorben en el mismo rango espectral. En la Figura VI.7. se muestran las especies transitorias que se forman en disoluciones acuosas de (A)LFX en presencia de Trp. Cuando se realizaron experimentos equivalentes bajo condiciones aeróbicas se observó que los tiempos de vida de los intermedios (catión arilo y la otra especie con un máximo de absorción en 520 nm) no variaba. Esta observación confirmó la asignación del radical Trp ya que esta especie es muy poco reactiva con el oxígeno molecular [46].

En general, los datos obtenidos poden entenderse mediante la intervención de una reacción de transferencia de electrones entre los cationes arilo de (A)LFX y los aminoácidos. El hecho de que la reactividad de los cationes arilo frente a las biomoléculas resulte mayor en el caso de LFX que en ALFX está en consonancia con la reactividad descrita para ambos intermedios con aniones [17, 18].

Unión covalente entre lomefloxacin(LFX) y su derivado acetilado (ALFX) y la albúmina sérica humana(ASH):

Se detectó la formación de aductos entre (A)LFX y ASH cuando las correspondientes fotomezclas fueron analizadas mediante espectrometría UV-VIS, tras la filtración en gel por sephadex.

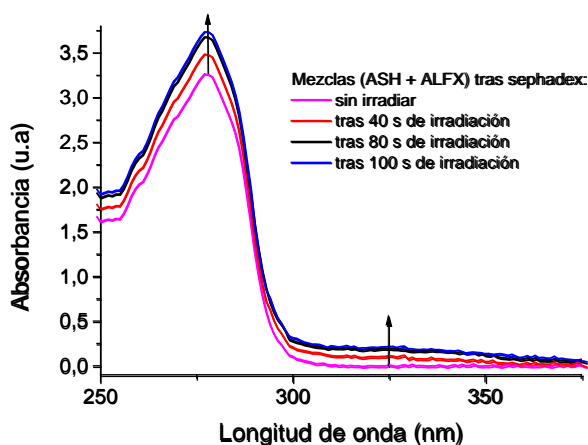


Figura VI.9. Espectro de absorción de ALFX en disolución acuosa, en presencia de ASH (1/1) tras cromatografía en sephadex.

Así, tras irradiar (20, 40, 60, 80 y 100 segundos) y filtrar disoluciones de ASH en presencia de (A)LFX se observó que la proteína separada mostraba aumentos en su espectro absorción que podía atribuirse a la unión covalente de la FQ a la albúmina (Figura VI.9.).

De los espectros de absorción podemos conocer la cantidad de aducto fármaco-albúmina obtenido durante el tiempo de irradiación de una disolución de FQ en presencia de ASH. Tal y como se observa en la Figura VI.10., la fotounión de ALFX es mucho más eficiente que la detectada para LFX y NFX. Interesantemente, en el caso de NFX, no se genera el fotoaducto NFX...ASH a pesar de que también se han descrito uniones covalentes de la albúmina con FQ monofluoradas [28]. Este hecho puede comprenderse analizando las dosis de luz utilizadas en los estudios de fotounión realizados ya que la dosis de luz empleada en los mostrados aquí es de 280 mJ/cm² mientras que la utilizada en los estudios descritos en la literatura era de 4 J/cm² (valores 15 veces superiores) [28].

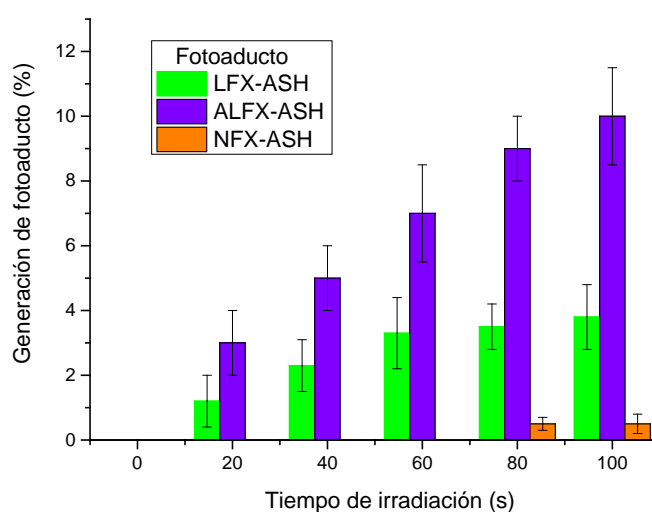


Figura VI.10. Porcentaje de fotoaducto FQ...ASH generado tras distintos tiempos de irradiación (calculados a 320 nm).

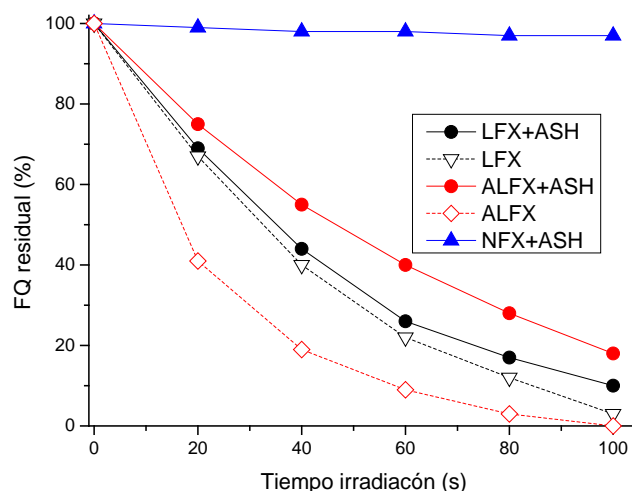
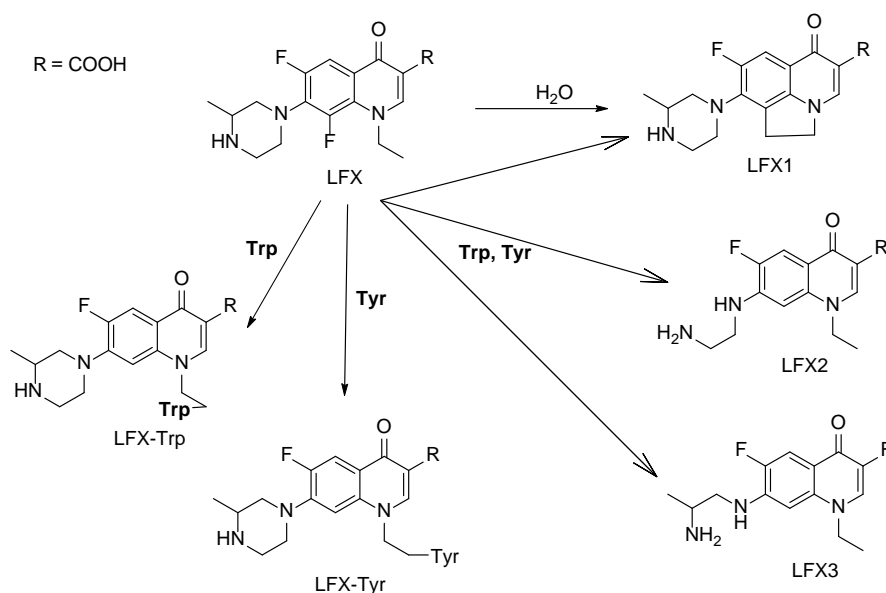


Figura VI.11. Porcentaje de FQ residual presente en las fotomezclas tras la irradiación a diferentes tiempos.

El análisis de la cantidad de FQ que permanecía en disolución tras la irradiación durante diferentes tiempos evidenció la relación inversa entre la fotodegradación y la fotounión (Figuras VI.10., VI.11.). Así, la fotodegradación de las FQ dihalogenadas decrece en presencia de albúmina lo cual es más significativo en el caso de ALFX. Este efecto puede comprenderse teniendo en cuenta las constantes de asociación del fármaco y albúmina y las concentraciones utilizadas de ambas moléculas (ca. 2×10^{-4} M) ya que la ALFX se encuentra complejada con ASH en un 40% mientras que LFX tan solo se compleja un 11%.

Unión covalente entre lomefloxacin (LFX) y su derivado acetilado y los aminoácidos triptófano (Trp) y tirosina(Tyr):

Para complementar los estudios fotofísicos de LFX se procedió a analizar los productos de las fotorreacciones con el propósito de poder comprender cuales son los intermedios involucrados en la fotólisis de LFX en presencia de biomoléculas como Trp y Tyr. Así, el objetivo fue establecer los caminos involucrados en la generación de los enlaces covalentes entre LFX y los aminoácidos comentados. Para ello, se procedió a realizar irradiaciones de LFX en presencia y ausencia de Tyr y Trp (en disolución acuosa a pH 7.4) utilizando un fotoreactor multilámpara cuyo $\lambda_{m\acute{a}x}$ estaba en los 350 nm.



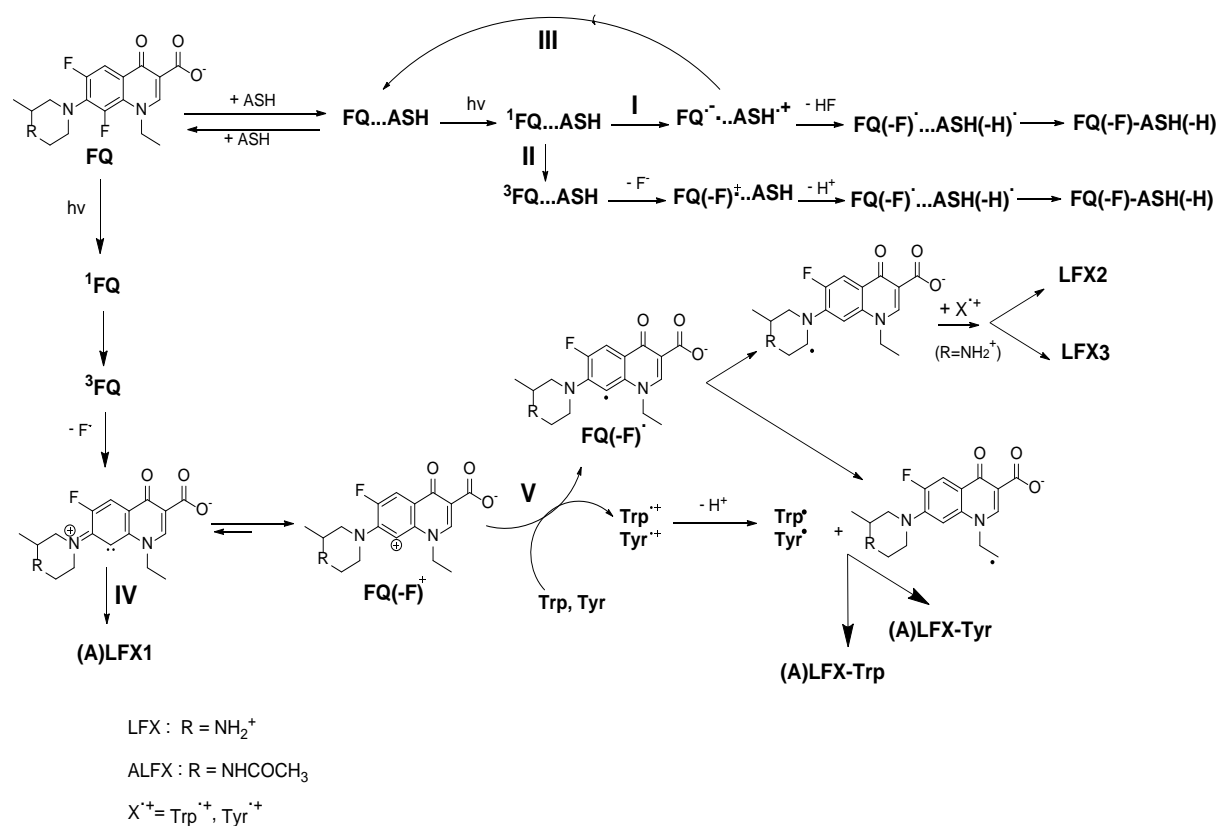
Esquema VI.1. Fotoproductos de LFX resultantes de la irradiación de disoluciones acuosas en presencia y ausencia de Tyr o Trp.

Las fotodegradaciones fueron monitorizadas mediante UPLC-HRMNS y mostraron la generación mayoritaria del fotoproducto LFX1 [47] en las disoluciones sin ningún aminoácido. Sin embargo, la presencia de Tyr y Trp (10 mM) produjo que, además de generarse LFX1 junto con LFX2 y LFX3 [48], se detectaran tres nuevos fotoproductos por la presencia de cada aminoácido los cuales absorbían a 350 nm (indicativo de que también contenían el cromóforo de las fluoroquinolonas) (Esquema VI.1.).

Los nuevos fotoproductos detectados en presencia de Trp mostraron masas exactas (m/z) = 536.2310, 536.2315, 536.2313 mientras que los obtenidos en presencia de Tyr tenían masas exactas (m/z) = 527.2306, 527.2322, 527.2330. Basándonos en éstos resultados, los primeros tres isómeros pudieron ser asignados como aductos LFX...Trp de la unión covalente entre LFX(-F⁻) y Trp(-H⁺) debido a que el valor teórico de MH⁺ calculado para C₂₈H₃₁FN₅O₅ (MH⁺) fue 536.2309. Los otros tres fotoproductos fueron asignados a aductos de LFX...Tyr debido a que el valor teórico de MH⁺ calculado para C₂₇H₃₂FN₄O₆ (MH⁺) era 527.2325 (Esquema VI.1.). La estructura para estos aductos se propuso teniendo en cuenta la descrita generación de fotoaductos a través de la reacción de la cadena etilo de LFX con moléculas como pirroles o el monofosfato de guanosina [21].

Cuando una fotólisis similar se llevó a cabo utilizando ALFX, el ALFX1 [17] fue el único fotoproducto detectado en medio acuoso sin aminoácidos pero en la fotólisis de LFX, la presencia de Trp y Tyr generó aductos de ALFX...Tyr y ALFX...Trp. Así en presencia de Trp las masas exactas (m/z) detectadas eran 578.2415, 578.2420, 578.2402 (MH⁺ calculadas para los aductos ALFX...Trp C₃₀H₃₃FN₅O₆= 578.2414) mientras que las fotomezclas con Tyr mostraron masas exactas (m/z) = 569.2412, 569.2440, 569.2458 (MH⁺ calculadas para los aductos ALFX...Tyr C₂₉H₃₄FN₄O₇, 569.2438).

Mecanismos involucrados en la fotounión del derivado acetilado de lomefloxacino (ALFX) con la albúmina sérica humana (ASH):



Esquema VI.2. Mecanismos de fotodegradación de (A)LFX en presencia de ASH, Tyr y Trp

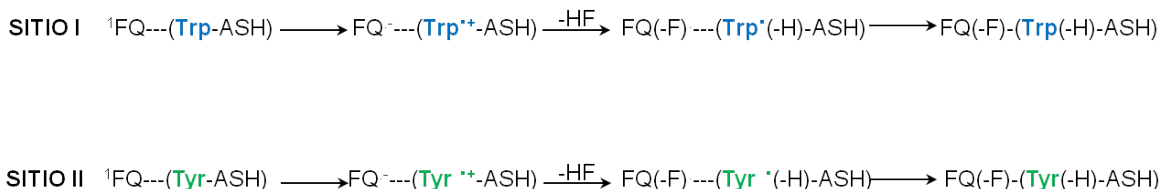
Los mecanismos propuestos para explicar las uniones de FQ a las biomoléculas estudiadas se muestran en el Esquema VI.2. De acuerdo con ello, el hecho de que la unión covalente entre FQ y ASH se produzca de una manera más rápida con (A)LFX que con NFX (Figura VI.11.) puede estar asociado con la fotoestabilidad de las FQ, siendo las dihalogenadas mucho más fotoreactivas que las monohalogenadas. En este contexto, se ha estudiado la posibilidad de que sean los aril cationes de LFX (generados a partir de la deshalogenación del estado excitado triplete (^3LFX) [19]) los que reaccionen con algún aminoácido de la proteína para generar los aductos fármaco-ASH. Los estudios de fotólisis de destello láser mostraron que los cationes arilo de (A)LFX se desactivan de manera eficiente en presencia de Trp y Tyr (Tabla VI.1. y Esquema VI.1). Además, se pudieron detectar los aductos covalentes fármaco-aminoácido (Esquema VI.2.). Sin embargo, como los cationes arilo generados fuera de la albúmina no eran desactivados por la ASH (Tabla VI.1. y Figura VI.8.), los intermedios detectados en la fotodeshalogenación de la FQ libre deben producir

predominantemente la formación del fotoproducto (A)LFX1 a través del camino **IV**. Por lo tanto, como por un lado la ASH tiene un único Trp-214 (sitio I) y algunos residuos de Tyr, y por otro lado el tiempo de vida de los cationes arilo generados es corto (menor de 1µs), la probabilidad de que estos intermedios reaccionen con los aminoácidos de las cavidades de forma directa o después de la difusión a través de la proteína, debe de ser muy baja.

Sin embargo, existe la posibilidad de que la fotounión fármaco-ASH pueda haberse generado a partir de un proceso más rápido (indetectable mediante estudios de fotólisis de destello láser a nivel de nanosegundos) a través de una deshalogenación del estado excitado triplete de (A)LFX y reacción de su catión arilo correspondiente con aminoácidos como Tyr y Trp alojados en la cavidad de la ASH (vía **II**). Esta hipótesis explicaría el decrecimiento en la absorbancia de los cationes arilo en presencia de ASH (Figura VI.8. para ALFX). Sin embargo, el hecho de que la fluorescencia de (A)LFX se desactive por ASH y que los decrecimientos de esas emisiones sean similares al descenso en la absorción de los cationes arilos (ver Figuras VI.4. y VI.8.) parece indicar que el mecanismo clave en el proceso de unión covalente FQ-ASH es un proceso de transferencia electrónico del complejo¹FQ...HSA (vía I).

Interesantemente, se ha observado que cuando parte del fármaco se encuentra acomplejado con la albúmina, la deshalogenación de FQ es menos eficiente (Figura VI.9.). Así, la deshalogenación de ³FQ tiene una eficiencia intrínseca por lo que no se ve afectada por el entorno.

En el caso del complejo ¹FQ...ASH, en primer lugar se podría producir una transferencia de electrón que generaría los radical aniones correspondientes (FQ⁻...ASH⁺) seguido de un camino de fotodeshalogenación o bien de la regeneración de FQ...ASH mediante el mismo proceso en el sentido inverso de la reacción (camino **III**, Esquema VI.2.).



Esquema VI.3. Mecanismos posibles de uniones entre FQ y ASH

La transferencia electrónica podría ocurrir entre el ^1FQ complejado y los aminoácidos electrón-dadores de la ASH como el Trp en el sitio I o la Tyr en el sitio II (Esquema VI.3.); de hecho, es bien conocida la elevada reactividad entre muchos de los estados ^3FQ y estos aminoácidos [31]. Sin embargo, como no se detectaran los intermedios que se generan desde el complejo $^1\text{FQ}\dots\text{ASH}$, la participación de otros aminoácidos electrón donadores como la cisteína-34, que es el único aminoácido con un grupo tiol en el superficie de la albúmina o puente disulfuro S200-S246 (localizado en el sitio I) [45] no puede ser descartada.

El camino I, además de explicar la relación de la constantes de asociación (K_a) con la eficiencia de las uniones covalentes para (A)LFX, justifica los resultados obtenidos para NFX. Como el valor de la K_a para NFX...ASH es similar a la calculada para LFX...ASH y estos complejos no muestran emisión, la baja eficiencia en la unión covalente de NFX con la proteína (Figura VI.11.) puede ser atribuida a una más baja eficiencia en el proceso de fotodeshalogenación para el FQ^- acomplejado con HSA^+ en FQ monohalogenadas que en las dihalogenadas. Esto también justifica las propiedades fotohapténicas de todas las FQ [28] y el porqué de que las propiedades fotoalérgicas hayan sido principalmente asociadas a las FQ dihalogenadas [16, 28].

VI.3. Conclusiones

Los resultados del presente capítulo sugieren que el principal camino de fotodegradación involucrado en la unión de las FQ con la albúmina sérica humana se produce a partir del estado excitado singlete de la FQ asociada con la proteína a través de una reacción de transferencia electrónica intramolecular entre un estado excitado de (A)LFX y la ASH.

La influencia del carácter catiónico del anillo piperazínico sobre la afinidad de estos fármacos por la albúmina ha sido claramente demostrado utilizando medidas de fluorescencia y de fotólisis de destello láser.

El ALFX tiene una constante de asociación cinco veces mayor que la obtenida para el LFX. Además, el LFX está principalmente localizado en el sitio I de la ASH, mientras que el ALFX se asocia por igual a los sitios I y II.

Se ha observado que los catones arilo de (A)LFX son capaces de generar aductos covalentes con aminoácidos como Tyr o Trp, pero ello no parece estar involucrado en la fotounión de las FQ con la albúmina. Para comprender la unión

covalente que se produce entre (A)LFX y la albúmina se propuso una reacción de transferencia electrónica entre un estado excitado de (A)LFX...ASH y un aminoácido de la proteína con propiedades electrón dador seguido de la deshalogenación de la FQ.

Los resultados obtenidos han permitido explicar las propiedades fotoalérgicas asociadas con las fluoroquinolonas. Por lo tanto, quedaría claramente demostrada la posibilidad de modular no solo las propiedades farmacológicas de las fluoroquinolonas, sino su afinidad por las biomoléculas y sus propiedades de unión fotoinducida variando determinados sustituyentes. Esto podría ser utilizado para diseñar nuevos bloqueantes de ADN polimerasas como agentes quimioterapéuticos.

VI.4. Procedimiento experimental

VI.4.1. Materiales

Se utilizaron productos comerciales obtenidos en la compañía química Sigma-Aldrich: (Albúmina sérica humana libre de ácidos grasos (ASH), ibuprofeno (IBP), L-tirosina metil éster (Tyr), L-triptófano (Trp), lomefloxacino (LFX), norfloxacino (NFX) y warfarina (WAR)). Las columnas de sephadex G-25 de GE Healthcare UK limited. Los tampones de fosfato de sodio (PB) y de bicarbonato sódico se prepararon utilizando agua mili-Q. El pH de las disoluciones se midió utilizando un electrodo de vidrio ajustado con NaOH a pH 7.4. Otros productos químicos utilizados fueron de grado reactivo.

Las muestras de fluoroquinolonas (FQ) fueron preparadas en distintas concentraciones de tampón fosfato (PB), empezando con una disolución madre de 300 mM de PB ajustada a pH 7.4 con un pHímetro Crison. El ALFX (ácido 7-(4-acetil-3-metil-1-piperazinil)-1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico) fue preparado tal y como se ha descrito previamente para la disolución de LFX (300 mg, 0.94 mmol) en Ac₂O (50mL) a reflujo durante 7h [17]). La solución fue enfriada a temperatura ambiente y concentrada. A continuación, el residuo se disolvió en agua, y se neutralizó a pH 7.4, se extrajo por triplicado con CH₂Cl₂, se concentró y evaporó hasta sequedad.

VI.4.2. Medidas de absorción y emisión

Los espectros ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro UV/VIS (Cary 50). Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en un fluorímetro *Photon Technology International (PTI) LPS-220B*. Los tiempos de vida se midieron con un espectrómetro de tiempo resuelto (*TimeMaster fluorescence lifetime spectrometer TM-2/2003*) mediante la técnica estroboscópica, que es una variación de la técnica *boxcar*. Se utilizó una lámpara de hidrógeno (1.8 ns anchura de pulso) como fuente de excitación. Las trazas cinéticas se registraron siguiendo una función de desactivación monoexponencial. Las medidas se realizaron bajo condiciones anhidras a temperatura ambiente (25 °C) en cubetas de 1cm de anchura de paso. La longitud de onda de excitación que se utilizó para registrar los tiempos de vida de fluorescencia fue de 320 y 355 nm. Como patrón, se utilizó el rendimiento cuántico de fluorescencia del bisulfato de quitina en 1 N H₂SO₄ ($\phi_F = 0.546$).

VI.4.3. Desactivación de la fluorescencia de albúmina sérica humana (ASH) por fluoroquinolonas (FQ)

Tras la excitación a 295 nm, la disolución acuosa tamponada en PB (10⁻³ M, pH ca 7.4) que contenía 10⁻⁵ M de ASH presentaba una banda de fluorescencia centrada en 344 nm. Se monitorizó la desactivación de la fluorescencia de esta banda tras la adición de cantidades crecientes de (A)LFX (desde 10⁻⁶ M hasta 1.2 x 10⁻⁵ M). Tras analizar los datos, se aplicó la corrección del efecto filtro (*Inner Filter Effect (IFE)*) ya que ambas FQ absorben luz tanto en las longitudes de onda de absorción como de emisión. La corrección IFE, se aplicó utilizando la ecuación 2 [31]:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\text{exc}} + A_{\text{em}})/2} \quad (2)$$

en donde F_{corr} y F_{obs} son las intensidades de fluorescencia corregida y la observada respectivamente, y A_{exc} y A_{em} son los valores de las absorbancias a las longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente.

VI.4.4. Desactivación de la fluorescencia de fluoroquinolonas (FQ) por albúmina sérica humana (ASH)

El estudio de la desactivación de la fluorescencia se llevó a cabo añadiendo concentraciones de crecientes de ASH (de 10⁻⁵ M hasta 10⁻⁴ M) a 10⁻⁴ M FQ

disoluciones acuosas tamponadas (10^{-3} M, pH ca. 7.4) excitando a 355 nm y 320 nm. Estos datos se analizaron teniendo en cuenta la ecuación 1 del presente capítulo, para establecer las interacciones fármaco-biomolécula [37, 38].

Las reacciones competitivas entre 2×10^{-4} M (A)LFX y el ibuprofeno (IBP) o la warfarina (WAR) se llevaron a cabo utilizando disoluciones acuosas 10^{-3} M PB. El experimento consistió en registrar la fluorescencia de las FQ a 355 nm, tras la adición de cantidades crecientes de IBP (5×10^{-5} M hasta 6×10^{-4} M) o WAR. Para evitar la absorción de WAR a 355 nm, este compuesto fue añadido solo hasta 2×10^{-4} M.

VI.4.5. Experimentos de fotólisis de destello láser (FDL)

Se utilizó un láser de Nd:YAG para la excitación a 355 nm. Los pulsos fueron de ~10 ns de duración y la energía fue de 10 mJ/pulso. Se utilizó una lámpara de xenón como fuente de detección. El aparato de fotólisis de destello láser consistía en un láser pulsado, una lámpara de xenón, un monocromador y un fotomultiplicador. La señal del osciloscopio era transferida a un ordenador.

Las disoluciones acuosas de 10^{-4} M (A)LFX fueron preparadas en 10^{-3} M NaHCO_3 y los experimentos se realizaron bajo condiciones anaeróbicas burbujeando con N_2O . Las muestras que contenían albúmina requirieron de una especial manipulación bajo la imposibilidad de burbujear las disoluciones para eliminar el O_2 . Así el medio anaeróbico se creó mediante flujo continuo de N_2O durante 20 min y agitación constante de la muestra para no generar burbujas. Se registraron los espectros de absorción transitoria a diferentes tiempos tras el pulso láser para cada muestra en presencia y ausencia de ASH, prestando especial atención a los cambios en el rendimiento cuántico de cruce intersistema y a la generación de nuevos intermedios. Las concentraciones de Tyr y Trp se mantuvieron entre 10^{-4} y 10^{-2} M.

Los experimentos de desactivación se llevaron a cabo manteniendo constantes las condiciones de pH en 7.4 durante todo el experimento.

Para determinar las constantes de desactivación de los cationes arilo por las biomoléculas, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer (3):

$$\boxed{1/\tau = 1/\tau_0 + k [Q]} \quad (3)$$

Los tiempos de vida de los cationes arilo de LFX y ALFX se determinaron a partir de sus trazas desactivación a 480 nm y 600 nm respectivamente.

VI.4.6. Análisis de la unión covalente entre fluoroquinolonas (FQ) y albúmina sérica humana (ASH) inducida por luz

Para obtener las medidas de fluorescencia UV-VIS, el estudio se llevó a cabo utilizando una proporción 1/1 de fármaco/proteína. (A)LFX y NFX se añadieron a una disolución 2×10^{-4} M HSA y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La fotólisis se realizó utilizando un reactor fotoquímico Rayonet equipado con ocho luces negras de lámparas de fósforo que emitían en el rango 310-390 nm, con un máximo en 350 nm.

Las muestras se irradiaron durante varios tiempos (de 20 a 100 segundos con luces desde 40 a 280 mJ/cm²) y luego se mantuvieron en la oscuridad durante 24 horas antes de realizar el análisis (los controles incluían mezclas de fármaco-ASH mantenidas en oscuridad, ASH irradiada y sin irradiar e irradiada con fármaco añadido a la ASH). Las muestras se diluyeron por un factor de dos añadiendo agua tras la separación de la proteína. A continuación, para determinar qué cantidad de FQ se encontraba unida covalentemente a la ASH, las soluciones se cromatografiaron por columnas sephadex G-25 equilibradas con una disolución 2/8 de etanol/agua en 10 mM de PB, tal y como se ha descrito con anterioridad [28]. La primera fracción de cada muestra contenía a la albúmina (sola o covalentemente unida al fármaco), mientras que las siguientes fracciones contenían fármaco libre. Así, la primera de las fracciones fue analizada por espectrometría UV-VIS. La cantidad de fármaco unido a la albúmina se determinó registrando sus espectros de absorción, mientras que el fármaco libre (segunda fracción de la misma muestra) se determinó por HPLC en un aparato Hitachi equipado con una columna Spherisorb (ODS-2, 10 nm), una bomba L-6250, y un detector UV L-400 con longitud de onda fija a 325 nm. Como fase móvil se utilizaron mezclas de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético en proporciones 10/79.9/0.1 para LFX y NFX y 35/64.9/0.1 para ALFX. Los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.4.7. Análisis de los fotoproductos de la fotólisis del derivado acetilado de lomefloxacino (ALFX) en presencia de triptófano (Trp) y tirosina (Tyr)

La fotólisis de disoluciones acuosas de disoluciones de (A)LFX (10^{-4} M) a pH 7.4, se llevaron a cabo en ausencia y presencia de triptófano (Trp) y tirosina metil éster (Tyr) 10^{-2} M. Los fotoproductos correspondientes se identificaron mediante UPLC-HRMNS. Para resumir, la cromatografía se realizó en un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) con un autosampler a 4 °C. La separación se realizó en un equipo ACQUITY UPLC BEH con columna C18 (50 mm × 2.1 mm i.d. 1.7 μm. La temperatura

de la columna se mantuvo a 40 °C. El análisis se consiguió utilizando metanol y agua (que contenía un 0.01% de ácido fórmico) como fase móvil. El espectrofotómetro Waters ACQUITY™ XevoQToF(Waters Corp.) estaba conectado a un equipo UPLC vía un (ESI). La fuente ESI operaba en modo de ionización positiva con un voltaje de 3.0 kV.

VI.4. Referencias Bibliográficas

1. Domagala, J. M., Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., Solomon, M. New structure-activity-relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 394-404.
2. Kang, D. H., Kim, J. S., Jung, M. J., Lee, E. S., Jahng, Y., Kwon, Y., Na, Y. New insight for fluoroquinophenoxazine derivatives as possibly new potent topoisomerase I inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1520-1524.
3. Azema, J., Guidetti, B., Dewelle, J., Le Calve, B., Mijatovic, T., Korolyov, A., Vaysse, J., Malet-Martino, M., Martino, R., Kiss, R. 7-((4-Substituted)piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin: Synthesis and in vitro biological evaluation as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5396-5407.
4. Cullen, M., Baijal, S. Prevention of febrile neutropenia: use of prophylactic antibiotics. *Br. J. Cancer.* **2009**, 101, S11-S14.
5. Kim, K., Pollard, J. M., Norris, A. J., McDonald, J. T., Sun, Y. L., Micewicz, E., Pettijohn, K., Damoiseaux, R., Iwamoto, K. S., Sayre, J. W., Price, B. D., Gatti, R. A., McBride, W. H. High-throughput screening identifies two classes of antibiotics as radioprotectors: tetracyclines and fluoroquinolones. *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 7238-7245.
6. Al-Trawneh, S. A., Zahra, J. A., Kamal, M. R., El-Abadelah, M. M., Zani, F., Incerti, M., Cavazzoni, A., Alfieri, R. R., Petronini, P. G., Vicini, P. Synthesis and biological evaluation of tetracyclic fluoroquinolones as antibacterial and anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5873-5884.
7. Paul, M., Gafter-Gvili, A., Fraser, A., Leibovici, L. The anti-cancer effects of quinolone antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2007**, 26, 825-831.
8. Lhiaubet-Vallet, V., Boscá, F., Miranda, M. A. Photosensitized DNA damage: the case of fluoroquinolones. *Photochem. Photobiol.* **2009**, 85, 861-868.
9. Marrot, L., Belaidi, J. P., Jones, C., Perez, P., Riou, L., Sarasin, A., Meunier, J. R. Molecular responses to photogenotoxic stress induced by the antibiotic

- lomefloxacin in human skin cells: From DNA damage to apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121*, 596-606.
10. Meunier, J. R., Sarasin, A., Marrot, L. Photogenotoxicity of mammalian cells: A review of the different assays for in vitro testing. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 437-447.
 11. Martinez, L. J., Li, G., Chignell, C. F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 599-602.
 12. Chignell, C. F., Haseman, J. K., Sik, R. H., Tennant, R. W., Trempus, C. S., Photocarcinogenesis in the Tg.AC mouse: lomefloxacin and 8-methoxypsoralen. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 77-80.
 13. Fasani, E., Profumo, A., Albini, A. Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 666-674.
 14. Jeffrey, A. M., Shao, L., Brendler-Schwaab, S. Y., Schluter, G., Williams, G. M. Photochemical mutagenicity of phototoxic and photochemically carcinogenic fluoroquinolones in comparison with the photostable moxifloxacin. *Arch. Toxicol.* **2000**, *74*, 555-559.
 15. Hayashi, N. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones. *Yakugaku Zasshi.* **2005**, *125*, 255-261.
 16. Hayashi, N., Nakata, Y., Yazaki, A. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 799-803.
 17. Albini, A., Monti, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 238-250.
 18. Soldevila, S., Boscá, F. Photoreactivity of fluoroquinolones: nature of aryl cations generated in water. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3940-3943.
 19. Cuquerella, M. C., Miranda, M. A., Boscá, F. Generation of detectable singlet aryl cations by photodehalogenation of fluoroquinolones. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 6441-6443.
 20. Freccero, M., Fasani, E., Mella, M., Manet, I., Monti, S., Albini, A. Modeling the photochemistry of the reference phototoxic drug lomefloxacin by steady-state and time-resolved experiments, and DFT and post-HF calculations. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 653-663.
 21. Fasani, E., Manet, I., Capobianco, M. L., Monti, S., Pretali, L., Albini, A. Fluoroquinolones as potential photochemotherapeutic agents: covalent addition to guanosine monophosphate. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3621-3623.

22. Akter, U., Niwa, M., Nose, T., Kaida, T., Matsuno, H., Kozawa, O., Uematsu, T. Effects of several agents on UVB- and UVA plus systemic fluoroquinolone-induced erythema of guinea pig skin evaluated by reflectance colorimetry. *Free Radic Biol. Med.* **1998**, *24*, 1113-1119.
23. Ball, P. Fluoroquinolone safety and tolerability. *First International Moxifloxacin Symposium – Berlin.* **2000**, 138-143.
24. Ferguson, J. Fluoroquinolone phototoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 92.
25. Neumann, N. J., Blotz, A., Wasinska-Kempka, G., Rosenbruch, M., Lehmann, P., Ahr, H. J., Vohr, H. W. Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different in vitro and in vivo methods. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2005**, *79*, 25-34.
26. Ohshima, A., Seo, N., Takigawa, M., Tokura, Y. Formation of antigenic quinolone photoadducts on langerhans cells initiates photoallergy to systemically administered quinolone in mice. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*, 569-575.
27. Clarke, K., Truscott, T. G., McGarvey, D. J., Gibbs, N. K. The triplet properties of the photocarcinogenic fluoroquinolone antibiotic, lomefloxacin, are not consistent with an energy transfer mechanism for photosensitised thymine dimer formation. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 75-75.
28. Tokura, Y., Nishijima, T., Yagi, H., Furukawa, F., Takigawa, M. Photohaptenic properties of fluoroquinolones. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 838-844.
29. Tokura, Y. Quinolone photoallergy: Photosensitivity dermatitis induced by systemic administration of photohaptenic drugs. *J. Dermatol. Sci.* **1998**, *18*, 1-10.
30. Tokura, Y., Seo, N., Fujie, M., Takigawa, M. Quinolone-photoconjugated major histocompatibility complex class II-binding peptides with lysine are antigenic for T cells mediating murine quinolone photoallergy. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117*, 1206-1211.
31. Boscá, F. Seeking to shed some light on the binding of fluoroquinolones to albumins. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, *116*, 3504-3511.
32. Zhang, P., Song, X., Li, H., Yao, S., Wang, W. Transient species of several fluoroquinolones and their reactions with amino acids. *Photochem. Photobiol. A.* **2010**, *215*, 191-195.
33. Boscá, F., Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M. C., Castell, J. V., Miranda, M. A. The triplet energy of thymine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318-6319.
34. Cuquerella, M. C., Andreu, I., Soldevila, S., Boscá, F. Triplet Excimers of Fluoroquinolones in Aqueous Media. *J. Phys. Chem. A.* **2012**, *116*, 5030-5038.

35. Cuquerella, M. C., Boscá, F., Miranda, M. A. Photonucleophilic aromatic substitution of 6-fluoroquinolones in basic media: Triplet quenching by hydroxide anion. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7256-7261.
36. Epps, D. E., Raub, T. J., Kezdy, F. J. A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum-albumin. *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 342-350.
37. Alarcon, E., Maria Edwards, A., Aspee, A., Borsarelli, C. D., Lissi, E. A. Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 933-943.
38. Ahmad, B., Parveen, S., Khan, R. H. Effect of albumin conformation on the binding of ciprofloxacin to human serum albumin: A novel approach directly assigning binding site. *Biomacromolecules.* **2006**, 7, 1350-1356.
39. Sun, H. W., He, P. Characterization of interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by CE-frontal analysis. *Chromatographia.* **2008**, 68, 969-975.
40. Zhang, L. W., Wang, K., Zhang, X. X. Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 603, 101-110.
41. Liu, B. S., Zhao, F. L., Xue, C. L., Wang, J., Lu, Y. K. Studies on the antagonistic action between chloramphenicol and quinolones with presence of bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J. Lumin.* **2010**, 130, 859-864.
42. Jin, F., Lu, J. Q., Zhou, X. W., Sun, T. Q. Spectroscopic study on interaction of lomefloxacin with human serum albumin in the presence of copper ion. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25, 1675-1680.
43. Sortino, S., Condorelli, G. Complexes between fluoroquinolones and calf thymus DNA: binding mode and photochemical reactivity. *New J. Chem.* **2002**, 26, 250-258.
44. Baroni, S., Mattu, M., Vannini, A., Cipollone, R., Aime, S., Ascenzi, P., Fasano, M. Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin - A spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6214-6220.
45. Monti, S., Manet, I., Manoli, F., Capobianco, M. L., Marconi, G. Gaining an insight into the photoreactivity of a drug in a protein environment: A case study on nalidixic acid and serum albumin. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 5742-5754.
46. Perez-Prieto, J., Boscá, F., Galian, R. E., Lahoz, A., Domingo, L. R., Miranda, M. A. Photoreaction between 2-benzoylthiophene and phenol or indole. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5104-5113

47. Fasani, E., Negra, F. F. B., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5388-5395.
48. Fasani, E., Mella, M., Monti, S., Albini, A. Unexpected photoreactions of some 7-amino-6-fluoroquinolones in phosphate buffer. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 391-397.

Capítulo VII: Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de la presente tesis doctoral, son las que se detallan a continuación:

1. Se muestra por primera vez la detección de un excímero triplete en agua mediante la técnica de fotólisis de destello laser por la que, además de obtenerse el espectro de absorción del excímero, se ha podido determinar la constante de reacción que genera dicha especie.
 - 1.1. Mediante el uso de esta técnica con ANFX y su éster metílico se han podido descartar la participación de procesos de protonación o desprotonación en los procesos de reacción de sus estados excitados triplete. Además, estos resultados han contribuido a entender los procesos fotofísicos de las FQ y el papel del tampón fosfato en ellos.
 - 1.2. Por otro lado, desde el punto de vista biológico, los resultados obtenidos parecen indicar que los excímeros triplete de las FQ deben tener una mínima influencia en los efectos fototóxicos asociados con las FQ ya que tienen energías de triplete menores que las sus ^3FQ y no intervienen en la fotodegradación de las FQ por lo que generan intermedios reactivos.

2. En función de los resultados obtenidos tal como se ha demostrado en la presente tesis, existe una clara contribución de los cationes arilo $^1\text{LFX}^+$ y $^1\text{ALFX}^+$ en las fotodeshalogenaciones de (A)LFX a pHs neutros.
 - 2.1. Teniendo en cuenta los diferentes caminos de fotodegradación mostrados (esquema IV.2), la fotoquímica de otras quinolonas 6,8-dihalogenadas como fleroxacino y BAY y3118 así como las propiedades alquilantes descritas para éste tipo de fluoroquinolonas puede ser ahora entendido mediante la participación de los cationes arilo singlete.
 - 2.2. Los resultados muestran la gran importancia de sustituyentes periféricos N-alquílicos sobre las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de las quinolonas 6,8-dihalogenadas. Así, variando los sustituyentes de las FQ es posible modular no solo sus propiedades farmacológicas si no también la reactividad de los cationes arilo involucrados.

3. El estudio llevado a cabo ha puesto de manifiesto que el camino de fotodeshalogenación de FQ dihalogenadas como LFX y ALFX que produce principalmente el daño al ADN se produce a través de una reacción de transferencia electrónica intermolecular entre el estado singlete de (A) LFX y el ADN que están formando el complejo (A)LFX--ADN desde el cual se generan sus correspondientes iones radicales. Por lo tanto, como ALFX tiene una constante de asociación ca. 4 unidades menos que la obtenida para LFX, la fotólisis de su derivado acetilado produce un menor daño al ADN.
 - 3.1. Se observó que la fotodeshalogenación de (A)LFX en presencia de dGuo conducía a la formación de un aducto covalente, pero su mecanismo de reacción es diferente al que ocurre entre ellos cuando la FQ está asociada al ADN, por lo que no se generaban los mismos intermedios ni se produce dicha unión covalente con el ADN.
 - 3.2. Este estudio puede servir de base para el desarrollo de nuevos bloqueadores de la topoisomerasa de ADN en mamíferos como agentes fotoquimioterapéuticos ya que cambiando los sustituyentes de las FQ, es posible modular no solo sus propiedades farmacológicas, sino también su afinidad por las biomoléculas y sus propiedades fotosensibilizantes.

4. Los resultados sugieren que el principal camino de fotodegradación involucrado en la unión de las FQ con la albúmina sérica humana se produce a partir del estado excitado singlete de la FQ asociada con la proteína a través de una reacción de transferencia electrónica intramolecular entre un estado excitado de (A)LFX y la ASH.
 - 4.1. La influencia del carácter catiónico del anillo piperazínico sobre la afinidad de estos fármacos por la albúmina ha sido claramente demostrado utilizando medidas de fluorescencia y de fotólisis de destello láser.
 - 4.2. El ALFX tiene una constante de asociación cinco veces mayor que la obtenida para el LFX. Además, el LFX está principalmente localizado en el sitio I de la ASH, mientras que el ALFX se asocia por igual a los sitios I y II.
 - 4.3. Se ha observado que los catones arilo de (A)LFX son capaces de generar aductos covalentes con aminoácidos como Tyr o Trp, pero ello no parece estar involucrado en la fotounión de las FQ con la albúmina. Para comprender la unión covalente que se produce entre (A)LFX y la albúmina

se propuso una reacción de transferencia electrónica entre un estado excitado de (A)LFX...ASH y un aminoácido de la proteína con propiedades electrón donadoras seguido de la deshalogenación de la FQ.

- 4.4. Los resultados obtenidos han permitido explicar las propiedades fotoalérgicas asociadas con las fluoroquinolonas. Por lo tanto, de nuevo ha quedado claramente demostrada la posibilidad de modular no solo las propiedades farmacológicas de las fluoroquinolonas, sino su afinidad por las biomoléculas y sus propiedades de unión fotoinducida variando determinados sustituyentes. Esto podría ser utilizado para diseñar nuevos bloqueantes de ADN polimerasas como agentes quimioterapéuticos.

Resúmenes

Resumen en castellano

Las fluoroquinolonas (FQ) son los antibióticos más utilizados en la actualidad. Además de ello se ha observado que algunos de sus derivados presentan actividad antitumoral, lo cual ha producido un aumento del interés por esta familia de fármacos durante los últimos años. Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado la propiedad anticancerígena de éstos compuestos. Su mecanismo de acción se produce mediante la inhibición de las topoisomerasas (I y II) y de la ADN polimerasa lo que desencadena efectos genotóxicos en sistemas eucarióticos. También se ha observado que radiaciones UV incrementan estos efectos lo que confiere a estas moléculas propiedades fotoquimioterapéuticas.

Esta genotoxicidad fotoinducida ha sido detectada en FQ dihalogenadas como fleroxacino (FLX), 3118BAY y lomefloxacino (LFX), proponiéndose este último compuesto como modelo para estudiar la acción fotomutagénica de fármacos.

Estas FQ muestran una inusual fotodeshalogenación por heterólisis del enlace C8-halógeno, siendo la generación de un catión arilo el intermedio clave para estudiar las propiedades de fotounión de las FQ a biomoléculas. Sin embargo, antes de iniciar el estudio de la interacción entre FQ y biomoléculas, se abordaron algunas lagunas existentes en los procesos fotoquímicos de las FQ tanto monohalogenadas como dihalogenadas. Así, las FQ muestran inusuales fotodeshalogenaciones, y sus estados excitados presentan rehibridaciones y una considerable reactividad con sales inorgánicas como el tampón fosfato (PB). En este contexto, se ha observado por fotólisis de destello laser (FDL) que además de detectarse los estados excitados triplete de las FQ se observa la formación de una especie secundaria proveniente de sus estados excitados triplete. Sin embargo, la naturaleza de esta especie secundaria no parecía estar muy clara y tampoco su participación en los procesos de degradación de las FQ. Con el propósito de poder esclarecer estas incertidumbres se realizaron estudios de FDL con NFX y algunos de sus derivados en presencia y ausencia PB a diferentes pHs. Los resultados permitieron descartar la generación de sus radicales aniónicos y la desprotonación de sus estados excitados triplete como las especies secundarias (SS) detectadas. Además se pudo determinar de manera inequívoca la naturaleza excímera de SS. Así, mediante el uso de esta técnica con ANFX y su éster metílico se ha podido descartar la participación de procesos de protonación o desprotonación en la generación de las SS. Además, estos resultados han contribuido a entender los procesos fotofísicos de las FQ y el papel del tampón fosfato en ellos.

Resúmenes

Por otro lado, desde el punto de vista biológico, los resultados obtenidos evidenciaron que los excímeros triplete de las FQ no deben tener ninguna participación en los efectos fototóxicos asociados con las FQ ya que tienen energías de triplete menores que las sus ^3FQ y no intervienen en los procesos de fotodegradación de las FQ.

En cuanto a la controversia existente en la literatura acerca de la naturaleza y reactividad del intermedio que se detecta en la fotodeshalogenación por heterólisis del enlace C8-halógeno de FQ dihalogenadas como LFX (unos autores han asignado al catión arilo carácter triplete ($^3\text{LFX}^+$) y otros lo atribuyen a un carbocatión con carácter singlete ($^1\text{LFX}^+$)), se abordó un nuevo estudio fotoquímico sobre el lomefloxacino (LFX) y su derivado N-acetilado (ALFX). En él se estudiaron las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las citadas moléculas y sus intermedios de reacción y se analizaron conjuntamente con sus procesos de fotodegradación, incluyendo la caracterización de los fotoproductos resultantes.

Los resultados mostraron claramente la intervención de los cationes arilo con carácter singlete de ambas moléculas ($^1\text{LFX}^+$ y $^1\text{ALFX}^+$) en sus fotodeshalogenaciones a pHs neutros. También se pudo demostrar que aunque sus cationes arilo con carácter triplete ($^3(\text{A})\text{LFX}^+$) también intervienen en sus procesos de fotodegradación, los intermedios detectados mediante FDL son $^1(\text{A})\text{LFX}^+$. Además se evidenció la gran importancia que tienen sustituyentes periféricos N-alquílicos sobre las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de las quinolonas 6,8-dihalogenadas lo cual mostraba una forma de poder modular, además de las propiedades farmacológicas de estos fármacos, la reactividad de los cationes arilo involucrados, lo cual podría servir de base para el diseño una nueva familia de fármacos con propiedades fotoquimioterapéuticas.

Una vez establecida la naturaleza excímera de las especies secundarias (SS) de las FQ y determinadas las propiedades del intermedio reactivo resultante de la fotodeshalogenación de 6,8-difluoroquinolonas, se procedió a evaluar mediante técnicas como las de emisión, fotólisis destello láser (FDL), de radiólisis pulsada (RP), cromatografía líquida y espectrometría de masas los principales procesos implicados en la fotodeshalogenación de FQ en presencia de biomoléculas como el ADN o su base deoxiguanosina (dGuo) y con una proteína como la albumina y alguno de sus aminoácidos más reactivos.

La fotólisis de (A)LFX en presencia de dGuo dio lugar a la formación de fotoproductos de unión entre estos compuestos y la base púrica. Sin embargo por la presencia de ADN no se detectó ningún tipo de unión covalente. Este hecho evidenciaba la participación de diferentes procesos en las fotodegradaciones de

(A)LFX en presencia de ADN y con su base más reactiva. La participación del complejo (A)LFX--ADN en las fotodegradaciones de estas fluoroquinolonas justificaba las diferencias obtenidas mediante una reacción de transferencia electrónica entre el estado singlete de (A)LFX y ADN. También se observó una disminución en el valor de la constante de asociación entre FQ y ADN cuando la FQ estaba N-acetilada, lo cual demuestra que cambiando sustituyentes de las FQ es posible modular no solo las propiedades farmacológicas y de fotoreactividad, sino también la afinidad por ADN y su fotogenotoxicidad.

Por último se analizaron las propiedades fototóxicas y fotoalérgicas de las FQ mediante el estudio de las fotoreacciones entre (A)LFX y la albumina (ASH) como proteína modelo y también en presencia de algunos de sus aminoácidos más reactivos (Tyr, Trp). Una reacción de transferencia electrónica entre el estado excitado singlete de (A)LFX y aminoácidos de ASH era el proceso responsable de las uniones covalente FQ-Proteína. También se pudo detectar el aumento de la afinidad de las FQ por el efecto de la N-sustitución.

Resum en valencià

Les fluoroquinolones (FQ) son els antibiòtics més utilitzats en la actualitat. A més d'això s'ha observat que alguns dels seus derivats presenten activitat antitumoral, el que ha produït un augment d'interès per aquesta família de fàrmacs durant els últims anys. Tant en estudis *in vitro* como *in vivo* s'ha demostrat la propietat anticancerígena d'aquests compostos. El seu mecanisme d'acció es produeix mitjançant la inhibició de les topoisomerases (I y II) i de l'ADN polimerasa el que desencadena efectes genotòxics en sistemes eucariòtics. També s'ha observat que radiacions UV incrementen aquests efectes el que confereix a aquestes molècules propietats fotoquimioterapèutiques.

Esta genotoxicitat fotoinduïda va ser detectada en FQ dihalogenades com fleroxací (FLX), 3118BAY i lomefloxací (LFX), proposant-se aquest últim compost com model per a estudiar l'acció fotomutagènica de fàrmacs.

Aquestes FQ mostren una inusual fotodeshalogenació per heteròlisi de l'enllaç C8-halògen, sent la generació d'un catió arilo l'intermediclaú per a estudiar les propietats de fotounió de les FQ a biomolècules. No obstant, avanç d'iniciar l'estudi de la interacció entre FQ y biomolècules, s'abordaren algunes llacunes existents en els processos fotoquímics de les FQ tant monohalogenades com dihalogenades. Així, les FQ mostren inusuals fotodeshalogenacions, i els seus estats excitats presenten rehibridacions i una considerable reactivitat amb sals inorgàniques com el tampó fosfat (PB). En aquest context, s'ha observat per fotòlisi de centelleig làser (FDL) que, a més de detectar-se els estats excitats triplet de les FQ, s'observa la formació d'una espècie secundària provinent dels seus estats excitats triplet. No obstant, la naturalesa d'aquesta espècie secundària no pareixia estar molt clara i tampoc la seua participació en els processos de degradació de les FQ. Amb el propòsit de poder clarificar aquestes incerteses es realitzaren estudis de FDL amb NFX i alguns dels seus derivats en presència i absència de PB a diferents pHs. Els resultats descartaren la generació dels seus radicals aniònics i la desprotonació dels seus estats excitats triplet com les espècies secundàries (SS) detectades. A més es va poder determinar de forma inequívoca la natura excímera de SS. Així, mitjançant l'ús d'aquesta tècnica amb ANFX i el seu èster metílic s'ha pogut descartar la participació de processos de protonació o desprotonació en la generació de les SS. A més, aquests resultats han contribuït a entendre els processos fotofísics de les FQ i el paper del tampó fosfat en ells.

Per altra banda, des del punt de vista biològic, els resultats obtinguts evidencien que els excímers triplet de les FQ no deuen tindre ninguna participació en els efectes fototòxics associats amb les FQ ja que tenen energies de triplet menors que les seues ^3FQ i no intervenen en els processos de fotodegradació de les FQ.

En quant a la controvèrsia existent en la literatura a costa de la naturalesa i reactivitat de l'intermedi que es detecta en la fotodeshalogenació per heteròlisi de l'enllaç C8-halògen de FQ dihalogenades com LFX (uns autors han assignat al catió aril caràcter triplet ($^3\text{LFX}^+$)) i altres l'atribueixen a un carbocatió amb caràcter singlet ($^1\text{LFX}^+$)), es va abordar un nou estudi fotoquímic sobre el lomefloxací (LFX) i el seu derivat N-acetilat (ALFX). En ell s'estudiaren les propietats fotofísiques i fotoquímiques de les citades molècules i el seus intermedis de reacció i s'analitzaren conjuntament amb els seus processos de fotodegradació, incloent la caracterització dels fotoproductes resultants.

Els resultats van mostrar clarament la intervenció dels cations aril amb caràcter singlet de ambdues molècules ($^1\text{LFX}^+$ y $^1\text{ALFX}^+$) en els seues fotodeshalogenacions a pHs neutres. També es va poder demostrar que encara que els seus cations aril amb caràcter triplet ($^3(\text{A})\text{LFX}^+$) també intervenen en els seus processos de fotodegradació, els intermedis detectats mitjançant FDL son de caràcter $^1(\text{A})\text{LFX}^+$. A més es va evidenciar la gran importància que tenen substituents perifèrics N-alquílics sobre les propietats fotoquímiques i fotofísiques de les quinolones 6,8-dihalogenades el que mostrava una forma de poder modular, a més de les propietats farmacològiques d'aquests fàrmacs, la reactivitat dels cations aril involucrats, el qual podria servir de base per al disseny d'una nova família de fàrmacs amb propietats fotoquimioterapèutiques.

Una vegada establerta la naturalesa excímera de les espècies secundàries (SS) de les FQ i determinades les propietats de l'intermedi reactiu resultant de la fotodeshalogenació de 6,8-difluoroquinolones, es va procedir a evaluar mitjançant tècniques com les d'emissió, fotòlisi centelleig làser (FDL), de radiòlisi polsada (RP), cromatografia líquida i espectrometria de masses els principals processos implicats en la fotodeshalogenació de FQ en presència de biomolècules com l'ADN o la seua base deoxiguanosina (dGuo) i amb una proteïna com l'albumina i algun dels seus aminoàcids més reactius.

La fotòlisi de (A)LFX en presència de dGuo va donar lloc a la formació de fotoproductes d'unió entre aquests compostos i la base púrica. No obstant per la presència d'ADN no es va detectar cap tipus d'unió covalent. Aquest fet evidenciava la participació de diferents processos en les fotodegradacions de (A)LFX en presència

d'ADN i amb la seua base mes reactiva. La participació del complex (A)LFX--ADN en les fotodegradacions d'aquestes fluoroquinolones justificava les diferències obtingudes mitjançant una reacció de transferència electrònica entre l'estat singlet de (A)LFX i ADN. També es va observar una disminució en el valor de la constant d'associació entre FQ i ADN quan la FQ estava N-acetilada, el que demostra que canviant substituents de les FQ es possible modular no tan sols les propietats farmacològiques i de fotoreactivitat, sinó també l'afinitat per l'ADN i la seua fotogenotoxicitat.

Per últim es van analitzar les propietats fototòxiques i fotoal·lèrgiques de les FQ mitjançant l'estudi de les fotoreaccions entre (A)LFX i l'albumina (ASH) com a proteïna model i també en presència d'alguns dels seus aminoàcids més reactius (Tyr, Trp). Una reacció de transferència electrònica entre l'estat excitat singlet de (A)LFX i aminoàcids de ASH era el procés responsable de les unions covalents FQ-Proteïna. També es va poder detectar l'augment de l'afinitat de les FQ per l'efecte de la N-substitució.

Summary

Fluoroquinolones (FQ) are the antibiotics most used nowadays. Besides it has been observed that some of its derivatives have anti-tumor activity, which has been an increase of interest by this family of drugs over the past years. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown anti-cancer property of these compounds. Its mechanism of action occurs through inhibition of the topoisomerases (I and II) and the DNA polymerase which triggers genotoxic effects in eukaryotic systems. It has also been observed that UV radiation increases these effects which provide photochemotherapeutic properties to these molecules.

This photoinduced genotoxicity has been detected in dihalogenated FQ such as fleroxacin (FLX), 3118BAY and lomefloxacin (LFX), proposed this last compound as a model to study the photomutagenic action of drugs.

These FQ show an unusual photodehalogenation for the link C8-halogen heterolysis, being the generation of an aryl cation an intermediate key to analyze the photobinding properties of the FQ to biomolecules. However, before you start the study of the interaction between biomolecules and FQ, it is necessary to deal with some gaps in the FQ photochemical processes of both monohalogenated and dihalogenated. Thus, the FQ show unusual photophysical and photochemical processes such aromatic photodehalogenations, rehybridizations of their excited states or a considerable reactivity with inorganic salts as the buffer phosphate (PB). In this context, it has been observed the formation of secondary species from their triplet excited states using the laser flash photolysis (FDL) but the nature of this secondary intermediate has not been clearly established neither its participation in the photodegradation processes of the FQ. In order to be able to clarify these uncertainties, FDL studies were performed with NFX and some of its derivatives in the presence and absence PB at different pH. The results of our study allowed to discard the generation of FQ anionic radicals and as well as a deprotonated FQ triplet excited state as the secondary species (SS) detected. In this context, it was determined unequivocally the excimer nature of SS. Thus, using this LFP technique with ANFX and its methyl ester, it has been able to discard the involvement of protonation or deprotonation processes in the generation of the SS. Moreover, these results have contributed to understand the photophysical processes of the FQ and the role of phosphate buffer in them.

On the other hand, from the biological point of view, the results showed that the triplet excimers of the FQ should not have any participation in the phototoxic effects

associated with the FQ since they have triplet energies lower than their ^3FQ and not involved in the process of photodegradation of the FQ.

In terms of the current controversy in the literature about the nature and reactivity of an aryl carbocation detected in the photodehalogenation by the heterolysis link C8-halogen in dihalogenated FQ as LFX, where some authors have assigned a triplet nature to the aryl cation ($^3\text{LFX}^+$) while others has been attributed to this intermediate a singlet carbocation character ($^1\text{LFX}^+$), it has been addressed a new photochemical study on the lomefloxacin (LFX) and its N-acetylated derivative (ALFX). This study about the photophysical and photochemical properties of these molecules has been performed analyzing the reactivity of their intermediates including the characterization of the resulting photoproducts.

Results have clearly evidenced the involvement of the singlet character of aryl cations of both molecules ($^1\text{LFX}^+$ and $^1\text{ALFX}^+$) in their photodehalogenations processes at neutral pH. It has also been demonstrated that although their triplet aryl cations ($^3(\text{A})\text{LFX}^+$) is also involved in their photodegradation processes, the detected intermediates using FDL are $^1(\text{A})\text{LFX}^+$. Moreover, the relevance of the peripheral N-alkyl substituents on the photochemical and photophysical properties of 6,8-dihalogenated quinolones has been clearly proved. Thus, these peripheral changes, in addition to modify pharmacological properties of these drugs, modulate the reactivity of the involved aryl cations, which could be used to design a new family of drugs with photochemotherapeutic properties.

Once established the excimer nature of the FQ secondary species (SS) and determined the properties of the resulting reactive intermediate of the photodehalogenation of 6,8-dihalogenated quinolones, it was proceeded to assess, using techniques such as the emission, laser flash photolysis (FDL), pulse radiolysis (RP), liquid chromatography and mass spectrometry, the main processes involved in the photodehalogenation of FQ in the presence of biomolecules such as DNA or its deoxyguanosine base (dGuo) as well as albumin as a protein model and some of its amino acids more reactive.

The photolysis of (A)LFX in the presence of dGuo give rise to photoproducts formed through the generation of covalent bonds between of union between these FQ and the purine base. By contrast, the photodegradation of these dihalogenated compound in the presence of DNA did not showed any type of covalent binding. This fact evidenced that different photodegradation pathways are involved in DNA. An electron transfer reaction of between the singlet state of (A)LFX and DNA in the (A)LFX---DNA complex justifies the results obtained. Also noted a decrease in the value of the association constant between FQ and DNA when FQ was N-acetylated,

which evidences that using small structural changes in FQ is possible to modulate photoreactivity, their pharmacological properties as well as their affinity for DNA and its photogenotoxicity.

Finally we have analysed the phototoxic and photoallergic properties of the FQ through the study of the photoreactions between (A)LFX and albumin (ASH) as a protein model and also in the presence of some of its more reactive amino acids such as Tyr, Trp. An electron transfer reaction between the singlet excited state of (A)LFX and amino acids of ASH was responsible for the FQ-protein covalent binding processes. It has also been observed that the affinity of the FQ for ASH is modified by the effect of the N-replacement.

Contribuciones a congresos

1. Sonia Soldevila, Francisco Boscá. **“Cationes arilo Singlete en la Fotodegradación de Fluoroquinolonas”** XXXIII REUNIÓN BIENAL DE LA REALSOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA (24-28 Julio **2011**, Valencia). Póster y exposición oral *flash*.
2. SoniaSoldevila, Francisco Boscá, M.A. Miranda. **“Estudios Fotofísicos y Fotoquímicos de Fluoroquinolonas e Interacción con ADN”**. III JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA *GRUFO* (4-7 Septiembre **2011**, Granada). Póster.
3. Francisco Boscá, Sonia Soldevila. **“Photophysical and Photochemical Behavior of 6,8-dihalogenated Fluoroquinolones in Aqueous Media”**. IVX IUPAC SIMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY. Julio **2012**, Coimbra (Portugal). Póster.
4. Francisco Boscá, Sonia Soldevila, M.Consuelo Cuquerella, Virginie Lhiaubet-Vallet, Ruth Edge. **“Seeking the Mechanism Responsible for the Fluoroquinolone Photomutagenicity”**4^{as} Jornadas Ibéricas de Fotoquímica, **2014**, Lisboa (Portugal). Póster.

Publicaciones

Publicaciones directamente derivadas de la presente tesis:

1. Francisco Boscá*, M.C Cuquerella, Inmaculada Andreu, Sonia Soldevila **“Triplet excimers of fluoroquinolones in aqueous media”**. *J.Phys. Chem. A.*, **2012**, *116* (21), pp 5030–5038.
2. Sonia Soldevila, Francisco Boscá* **“Nature of Aryl cations generated from a Dehalogenation Process of photoalkylating fluoroquinolones”**. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 3940–3943.
3. Sonia Soldevila, M.C. Cuquerella, Francisco Boscá* **“Understanding of the photoallergic properties of fluoroquinolones: photoreactivity of lomefloxacin with amino acids and albumin”**. *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, *4*, 514-23.
4. Sonia Soldevila, M. C. Cuquerella, Virginie Lhiaubet-Vallet, Ruth Edge, Francisco Boscá* **“Seeking the Mechanism Responsible for the Fluoroquinolone Photomutagenicity: A Pulse radiolysis. Steady-state and Laser Flash photolysis Study”**. *Free Radic. Biol. and Med.*, **2014**, *67*, 417-25