



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL PROCESO DE ABSTRACCIÓN DE
HIDRÓGENO EN DERIVADOS FOTOACTIVOS DEL
COLESTEROL**

Fabrizio Palumbo

Directores de tesis:

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Prof. Miguel A. Miranda Alonso

Tutora de tesis:

Prof. Julia Pérez Prieto

Programa de Doctorado en Química

Universitat de València

Valencia, Diciembre 2016

La presente tesis doctoral ha sido realizada dentro del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València. Asimismo, como parte de la actividad investigadora asociada, se incluye una estancia de 4 meses en el Institute of Physical and Theoretical Chemistry (PTC) de la Technical University of Graz (TU Graz, Austria).



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Institute of Physical and Theoretical Chemistry



D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Profesor Catedrático de Química de la Universitat Politècnica de València, y Dña. INMACULADA ANDREU ROS, Investigadora SNS “Miguel Servet” en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe de Valencia.

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Estudio del proceso de abstracción de hidrógeno en derivados fotoactivos del colesterol**”, ha sido desarrollada por FABRIZIO PALUMBO, bajo su dirección, en el Instituto Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València.

D. Miguel A. Miranda Alonso

Dña. Inmaculada Andreu Ros

VºBº de la tutora de tesis

Dña. Julia Pérez Prieto

A mia madre e a mio padre

Alle mie due nonne

Agradecimientos

Después de muchos años, una importante etapa de mi vida ha llegado a su fin. Llegué a Valencia siendo un jovencito; en estos años maravillosos aquí en España me he convertido en un hombre.

Muchas son las personas a las que tengo que agradecer por su apoyo, comprensión y ayuda.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, Inmaculada Andreu y Miguel Ángel Miranda, por la gran oportunidad que me han ofrecido, por los preciosos consejos y por permitir que lograra una formación científica e investigadora de la que voy orgulloso. Trabajar con estos excelentes profesionales ha sido un verdadero privilegio.

Gracias a todos los compañeros del grupo de fotoquímica, con los que he tenido el placer de compartir momentos de vida profesional y personal a lo largo de estos años. Gracias a Patri, Edurne, Sonia, Giacomo, Rebeca, Ofelia, Cristina, Ana, Isabel A., Sandra, Lara, Jana, Vicky, Miguel, Paula M., Gemma, Mireia, Filomena, Maria, Chelo C., Marisa, Virginie y Paco. A los compañeros del departamento: Raúl, Nacho, Oscar, Rafa, Dani, Neus, Susana, Isabel M. y Chelo J.

A todas las personas que, con su trabajo, hacen que el Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC sea un extraordinario centro de investigación. En particular a Francesca, Guillermo, Judit, Larisha, Paula R., Miguel R., María, José Miguel, Víctor, Yari, Fran, Pablo, Cristina L. y Aidé, con los que he compartido cervezas, almuerzos y muchas conversaciones.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España, tanto por la concesión de la beca FPU como de la ayuda para la realización de la estancia en el extranjero.

Al Prof. Georg Gescheidt, al dr. Dmytro Neshchadin y a todos los compañeros de la Technical University of Graz (Austria), por acogerme en su laboratorio durante 5 meses y hacerme sentir parte integrante del grupo. A los amigos que he conocido en Graz: Francesca, Ettore, Rafael y Emanuele, de los que siempre me acordaré.

A todos los compañeros del máster de química orgánica de Valencia, Barcelona y Palma de Mallorca. En particular a Mari, Manuel, Sora, Rosy, Alberto, Néstor, Jorge y a la “adoptada” Diana. Muchas han sido nuestras cenas y espero que, sea donde sea, muchas habrá en el futuro.

Gracias a Bruno, por apoyarme en todo momento. A mi artista favorita, Elena, por nuestras interminables conversaciones. A Rita, por cuidarme casi como una madre. A mis amigas Nené y Elena C., con las que he compartido pizzas, risas y momentos inolvidables. Gracias a toda la gente que he tenido el placer de conocer en estos años: Alessandro, Simona, Franci, Serena, Kike, Valentina, Olga, Victor y Pedro. Gracias a todos vosotros por ser mi familia aquí en Valencia.

A todos mis amigos de Cosenza, que aun estando lejos, están más cerca que nunca.

Gracias a mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos. ¡Os quiero mucho!

Gracias a toda mi familia. A mi hermano y a mi hermana, a mis sobrinos,
a mis tíos y tías, a mis cuñados y a mis queridas abuelas.

Grazie mille

Semper ad maiora

Fabrizio

Abreviaturas y símbolos

A	Absorción
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AH	Abstracción de hidrógeno
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AL	Ácido linoleico
BR	Birradical
BZF	Benzofenona
BZT	2-Benzotiofeno
C₆D₆	Benceno deuterado
C₇D₈	Tolueno deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₂Cl₂	Diclorometano deuterado
CD₃CN	Acetonitrilo deuterado
Ch	Colesterol
CI	Conversión interna
CIDNP	Polarización nuclear dinámica inducida químicamente
CIS	Cruce intersistemas
D	Sustrato dador
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
δ	Desplazamiento químico
¹Δg	Oxígeno singlete
ET₃N	Trietilamina
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser

FS	Fotosensibilizador
ϕ_{BR}	Rendimiento cuántico de birradical
ϕ_{KR}	Rendimiento cuántico de radical cetilo
ϕ_{ISC}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
ϕ_{PR}	Rendimiento cuántico de fotodegradación
ϕ_{Δ}	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete
<i>hfc</i>	Constante de acoplamiento hiperfino
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
k_{iq}	Constante de velocidad de desactivación intramolecular
k_{ISC}	Constante de velocidad de cruce intersistemas
k_H	Constante de velocidad de abstracción de hidrógeno
k_p	Constante de desactivación física
k_q	Constante de desactivación
KP	Ketoprofeno
KR	Radical cetilo
LUMO	Orbital molecular desocupado de más baja energía
MeOD	Metanol deuterado
λ	Longitud de onda
NH₂Ch	Aminocolesteno
NP	Naftaleno
¹ O ₂	Oxígeno singlete
OM	Orbital molecular
P	Fosforescencia
PL	Peroxidación lipídica

PN	Perinaftenona
ppm	Partes por millón
RL	Radicales libres
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROOH	Derivado hidroperóxido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RV	Relajación vibracional
S_n	Estado excitado singlete
S₁	Primer estado excitado singlete
SP	Suprofeno
T_n	Estado excitado triplete
T₁	Triplete de más baja energía
T-T	Triplete - triplete
<i>t</i>-BUOOH	<i>Tert</i> -butilhidroperóxido
TPA	Ácido tiaprofénico
τ_{BR}	Tiempo de vida de birradical
τ_T	Tiempo de vida de triplete
UV	Radiación ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta de tipo A
UVB	Radiación ultravioleta de tipo B
UV-vis	Ultravioleta visible

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Principios generales de la fotoquímica.....	3
1.2. Procesos de fotosensibilización.....	6
1.2.1. Abstracción de hidrógeno (AH)	6
1.2.2. Producción de oxígeno singlete.....	8
1.2.3. Fotosensibilización mediada por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	9
1.3. Peroxidación lipídica (PL)	11
1.3.1. Aspectos mecánicos de la PL	11
1.3.2. La membrana celular: diana de las radiaciones UVA	13
1.4. Abstracción de hidrógeno (AH) en el colesterol (Ch).....	15
1.4.1. Autooxidación del Ch.....	15
1.4.2. Fotooxidación del Ch por arilcetonas.....	19
1.5. Polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP) ...	22
Capítulo 2. Objetivos	25
2.1. Objetivos	27
2.2. Aims	29
Capítulo 3. Influencia del disolvente en el proceso de abstracción de hidrógeno en el colesterol por el estado excitado triplete de la benzofenona	31

3.1. Introducción	33
3.2. Resultados y discusión	34
3.3. Conclusiones	46
3.4. Procedimiento experimental.....	46
3.4.1. General	46
3.4.2. Medidas de fotólisis de destello láser.....	46
3.4.3. Medidas de fotólisis en estado estacionario	47
Capítulo 4. Control topológico en el proceso de abstracción de hidrógeno intramolecular en diadas aminocolesteno-benzofenona..	51
4.1. Introducción	53
4.2. Resultados y discusión	54
4.3. Conclusiones	71
4.4. Procedimiento experimental.....	71
4.4.1. General	71
4.4.2. Síntesis de 3 α -amino-5-colesteno (NH ₂ Ch)	72
4.4.3. Síntesis de las diadas (<i>S</i>)-KP-NHCh y (<i>R</i>)-KP-NHCh.....	73
4.4.4. Medidas de fotólisis en estado estacionario	75
4.4.5. Medidas de fotólisis de destello láser.....	77
4.4.6. Estudios de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP).....	77

Capítulo 5. Fotogeneración de birradical vs oxígeno singlete en sistemas que contienen suprofeno-colesterol	79
5.1. Introducción	81
5.2. Resultados y discusión	83
5.3. Conclusiones	93
5.4. Procedimiento experimental.....	94
5.4.1. General	94
5.4.2. Síntesis de <i>epi</i> -colesterol (α -Ch).....	94
5.4.3. Síntesis de las diadas (<i>S</i>)-SP- α -Ch y (<i>R</i>)-SP- α -Ch	95
5.4.4. Síntesis de la diada (<i>S</i>)-SP- β -Ch	97
5.4.5. Medidas de fotólisis en estado estacionario	98
5.4.6. Medidas de fotólisis de destello láser.....	99
5.4.7. Medidas de oxígeno singlete	100
Capítulo 6. Abstracción intramolecular de hidrógeno en la posición C-4 del colesterol	101
6.1. Introducción	103
6.2. Resultados y discusión	106
6.3. Conclusiones	120
6.4. Procedimiento experimental.....	120
6.4.1. General	120

Índice

6.4.2. Síntesis de 7-oxo-acetilCh.....	120
6.4.3. Síntesis de los dioles 7 β y 7 α -OH-Ch.....	121
6.4.4. Síntesis de las diadas KP-7-acetilCh.....	122
6.4.4.1. Síntesis de 7 β y 7 α -OH-acetilCh	122
6.4.4.2. Síntesis de las diadas (<i>R</i>) y (<i>S</i>)-KP-7- α -acetilCh.....	123
6.4.4.2. Síntesis de la diada (<i>S</i>)-KP-7- β -acetilCh	125
6.4.5. Medidas de fotólisis en estado estacionario	125
6.4.5.1. Fotólisis en estado estacionario de lo dioles	125
6.4.5.2. Fotólisis en estado estacionario de las diadas KP-7- acetilCh.....	126
6.4.6. Medidas de fotólisis de destello láser.....	127
6.4.7. Estudios de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP).....	128
Capítulo 7. Instrumentación.....	129
7.1. Instrumentación general	131
7.2. Instrumentación fotoquímica.....	131
Bibliografía	135
Conclusiones	147
Conclusiones	149

Índice

Conclusions	153
Resúmenes	157
Resumen en castellano	159
Resum en valencià.....	163
Summary	167
Anexo I. Espectros de RMN mono y bidimensionales	171
Anexo II. Polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP)	217
Anexo III. Contribuciones a congresos	227
Anexo IV. Publicaciones	231

Capítulo 1. Introducción

1.1. Principios generales de la fotoquímica

La fotoquímica molecular es la disciplina que estudia las reacciones químicas inducidas por la luz ultravioleta – visible (UV-Vis, 200 – 800 nm). En una molécula, la entidad responsable de la absorción de dicha radiación es el grupo cromóforo (un átomo o un grupo de átomos). Los espectros de absorción y emisión de un compuesto proporcionan información acerca de la estructura, la energía y la dinámica de los estados electrónicos excitados, permitiendo interpretar su reactividad fotoquímica y propiedades fotofísicas.

Con anterioridad a la absorción de luz, una molécula se encuentra en su nivel mínimo de energía, que se corresponde con su estado fundamental. Esto significa que los electrones se encuentran en los orbitales moleculares (OM) de más baja energía. Cada OM, que resulta de la superposición de los orbitales atómicos *s* y *p*, puede alojar como máximo dos electrones con espines antiparalelos. Tras la absorción de un fotón, un electrón es transferido del OM ocupado de más alta energía (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) a un orbital desocupado de mayor energía. Esta transición electrónica conduce desde el estado fundamental a un estado electrónicamente excitado de la molécula. La transición más relevante es la que corresponde al orbital desocupado de más baja energía (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO).

Los OM pueden ser clasificados en tres grupos: enlazantes (σ o π), antienlazantes (σ^* o π^*) y no enlazantes (n). Los HOMOs son enlazantes o no enlazantes, mientras que los LUMOs son usualmente antienlazantes. Así, en fotoquímica las transiciones más frecuentes son de tres tipos: $\pi \rightarrow \pi^*$ (característico de los alquenos, alquinos y compuestos

aromáticos), $n \rightarrow \pi^*$ (por compuestos que contienen heteroátomos con un par no compartido de electrones, tales como grupos carbonilo, tiocarbonilo, nitro, azo e imino) y $n \rightarrow \sigma^*$ (por ejemplo aminas y alcoholes). En general, los electrones de los orbitales π y n son los más relevantes para la reactividad de una molécula, ya que son los que pueden ser excitados con más facilidad.

Un compuesto, una vez ha alcanzado su estado excitado, puede liberar el exceso de energía y consecuentemente regresar a su estado fundamental a través de diversas rutas. Así, puede reorganizar su estructura o fragmentarse originando productos con una constitución o configuración diferente a la correspondiente al estado inicial (procesos fotoquímicos), o puede cambiar su estado cuántico pasando de un estado excitado a otro o de un estado excitado al estado fundamental (procesos fotofísicos). Las interconversiones entre estados excitados se producen a través de transiciones radiantes o no radiantes, dependiendo de si se produce la emisión de radiación electromagnética o no durante la desactivación. En el diagrama simplificado de Jablonski (Figura 1.1) se muestran las principales rutas de desactivación que un cromóforo puede seguir tras absorber un fotón.

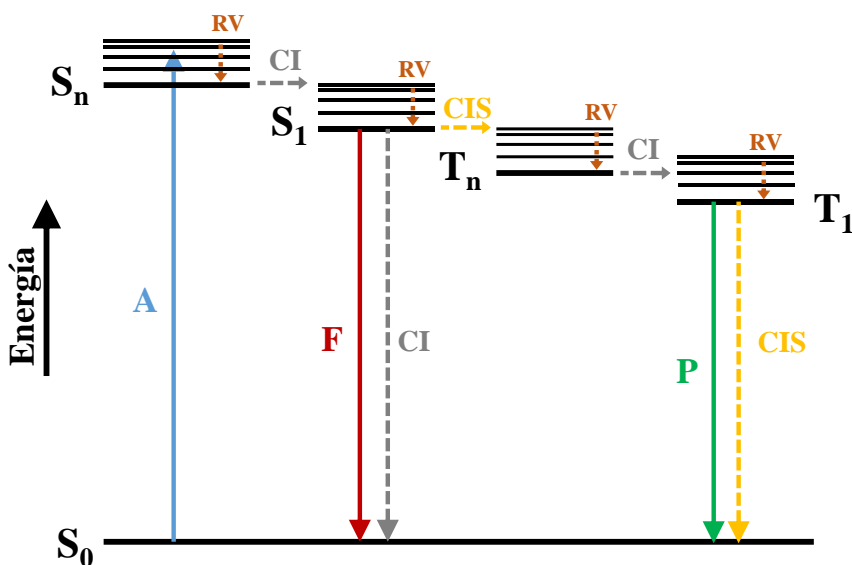


Figura 1.1. Diagrama simplificado de Jablonski.

Así, el cromóforo tras la absorción (A) de luz, es excitado electrónicamente a un estado singlete superior (S_n). La energía absorbida puede disiparse en forma de relajación vibracional (RV) o conversión interna (CI) generando el primer estado excitado singlete (S_1). La desactivación del S_1 puede ocurrir por fluorescencia (F) o cruce intersistemas (CIS) para formar un estado excitado triplete (T_n) o por CI para volver al estado fundamental de la molécula. Las moléculas que hayan alcanzado el estado triplete de menor energía, T_1 , pueden relajarse al estado fundamental por fosforescencia (P). La absorción, la fluorescencia y la fosforescencia son procesos radiantes (indicados con flechas continuas en el diagrama de Jablonski), mientras que la conversión interna, el cruce intersistemas y la relajación vibracional son procesos no radiantes (indicados con flechas discontinuas) en la Figura 1.1.

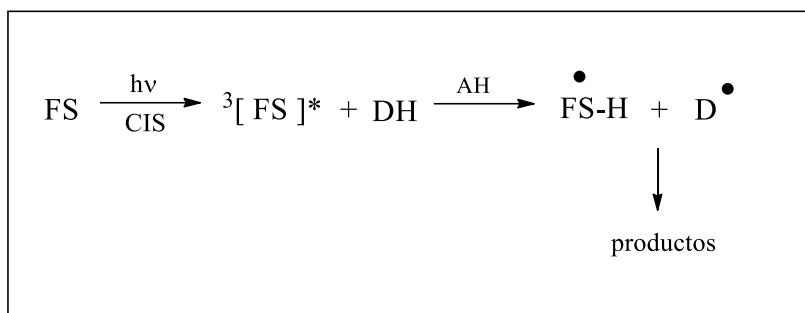
1.2. Procesos de fotosensibilización

La fotosensibilización es un proceso por el cual un compuesto sufre una alteración física o química como resultado de la absorción inicial de luz por otro compuesto denominado fotosensibilizador (FS). Desde un punto de vista fotobiológico, las radiaciones a considerar son las caracterizadas por longitudes de onda en el rango comprendido entre 290 – 320 nm (UVB) y 320 – 400 nm (UVA). La radiación UVB es más dañina ya que puede causar daño directo a biomoléculas. Sin embargo, la radiación UVA también podría ser perjudicial en presencia de un fotosensibilizador ya que puede dar lugar indirectamente a fotolesiones en biomoléculas como el ADN, los lípidos y las proteínas.

Los mecanismos que operan en el fenómeno de la fotosensibilización se pueden dividir en dos grupos: Tipo I y Tipo II. En el mecanismo de Tipo I, el FS en el estado excitado induce un proceso de abstracción de hidrógeno (AH) o de transferencia de carga o de energía que desencadena diferentes tipos de lesiones en la biomolécula. Por el contrario, en el mecanismo de Tipo II tiene lugar una transferencia de energía desde el estado excitado triplete del FS al oxígeno molecular para producir oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$ o $^1\Delta_g$), una de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

1.2.1. Abstracción de hidrógeno (AH)

Como se ha mencionado anteriormente, un mecanismo clave del proceso de fotosensibilización de Tipo I es la AH en un sustrato dador (D) por un FS en su estado excitado (Esquema 1.1).



Esquema 1.1. Reacción general de AH.

La AH ocurre generalmente a partir de estados excitados tripletes $n\pi^*$ de compuestos carbonílicos con un alto rendimiento cuántico de cruce intersistemas. La ruptura homolítica del enlace C-H genera un par de radicales (uno centrado en el dador y otro en el aceptor) para el proceso intermolecular o bien un birradical en una reacción intramolecular. Estas especies radicalarias pueden formar productos de diferente naturaleza (recombinación de los radicales aceptor-dador o dador-dador, AH por el radical del aceptor, etc), tal y como se muestra en la Figura 1.2. La velocidad del proceso de AH es inversamente proporcional a la energía del enlace C-H del dador y directamente proporcional a la energía del estado excitado triplete del aceptor.

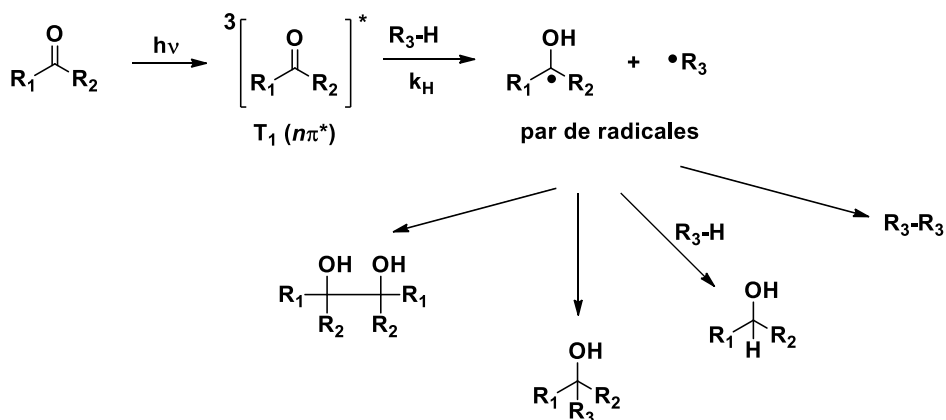
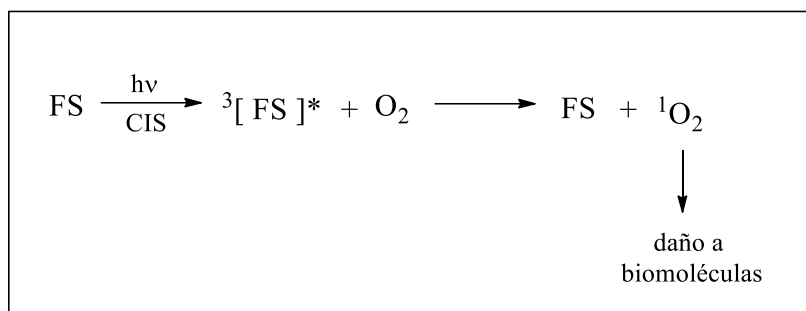


Figura 1.2. Reacción de AH a partir de un compuesto carbonílico para un proceso intermolecular.

Las especies transitorias generadas (triplete y radicales) pueden ser detectadas mediante diferentes técnicas; entre ellas destaca la técnica de Fotólisis de Destello Láser (FDL) que permite estudiar la cinética de reacción de los intermedios en la escala de nanosegundos, picosegundos e incluso femtosegundos.

1.2.2. Producción de oxígeno singlete

En el mecanismo de Tipo II, el FS en su estado excitado triplete puede transferir su energía al oxígeno molecular para producir ¹O₂ (Esquema 1.2). Este proceso puede ocurrir siempre y cuando el tiempo de vida del estado excitado involucrado sea suficientemente largo y su energía mayor que la del ¹O₂.¹⁻⁴ Esta especie es un agente oxidante muy potente capaz de reaccionar con numerosos sustratos biológicos tales como el ADN,⁵⁻⁷ los lípidos de la membrana celular^{8,9} y las proteínas.¹⁰⁻¹²



Esquema 1.2. Producción de oxígeno singlete

1.2.3. Fotosensibilización mediada por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los procesos de fotosensibilización incluyen reacciones fototóxicas y fotoalérgicas. Los síntomas clínicos de la fototoxicidad comprenden quemaduras solares exageradas, eritema, edema, hiperpigmentación, descamación, etc. Estas reacciones aparecen inmediatamente después de la primera exposición y están confinadas a las zonas expuestas de la piel. Típicamente, ni el fármaco ni la exposición solar por separado, a las mismas dosis, son capaces de producir estas reacciones cutáneas adversas. Por el contrario, el fenómeno de la fotoalergia se asocia con una respuesta inmunitaria mediada por las células, y sus manifestaciones clínicas incluyen eritema, eczema y erupción vesiculobullosa,^{13,14} apareciendo tras una sensibilización previa.

Los agentes fotosensibilizantes pueden ser endógenos (flavinas, porfirinas) o exógenos (xenobióticos de uso común como son los fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, etc.). Entre los fármacos que actúan como fotosensibilizadores, podemos mencionar algunos

antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) derivados del ácido propiónico, tales como el ketoprofeno (KP), el ácido tiaprofénico (TPA) y el suprofeno (SP, Figura 1.3), los cuales pueden provocar reacciones fotosensibilizantes¹⁵⁻²⁵ en pacientes tratados que se han expuesto a luz solar. Estos fármacos poseen un grupo cromóforo (de tipo diarilcetona) y un centro estereogénico en la cadena carbonada. Así, el KP contiene el cromóforo benzofenona (BZF) y muestra un estado excitado triplete de más baja energía de tipo n,π^* ,^{14,26,27} mientras que el TPA y SP incluyen el cromóforo 2-benzoiltiofeno (BZT) y poseen un estado excitado triplete de más baja energía de tipo π,π^* .^{1,14} En general, la reactividad fotoquímica de los tripletes n,π^* es más alta que los tripletes π,π^* .

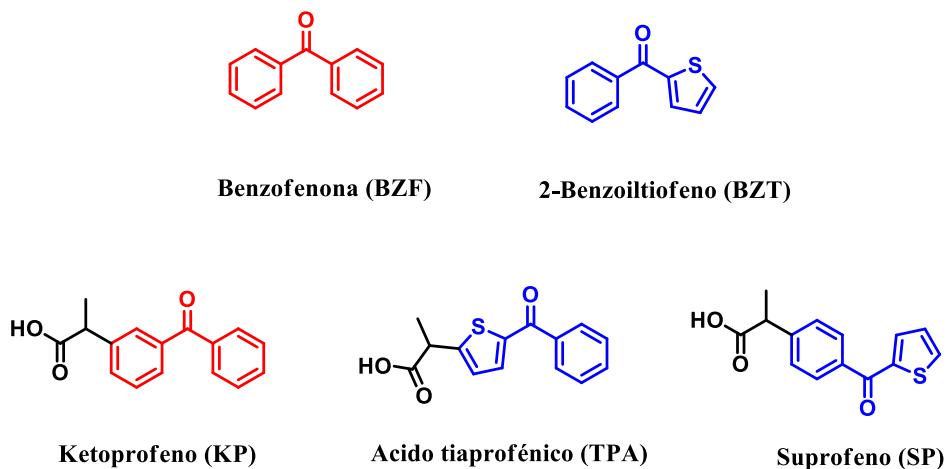


Figura 1.3. Estructura de algunos ácidos 2-arilpropiónicos antiinflamatorios fotoactivos.

El estado excitado más relevante en los procesos de fotosensibilización es el triplete de más baja energía (T_1). Su tiempo de

vida relativamente largo permite su detección directa mediante técnicas de fotólisis de destello láser en la escala de nanosegundos, así como el estudio de su reactividad bajo diferentes condiciones experimentales. El T_1 puede participar en procesos intermoleculares, dando lugar a interacciones con oxígeno y/o con biomoléculas. Entre los procesos inducidos como consecuencia de las interacciones AINEs-biomolécula en el estado excitado podemos citar la peroxidación lipídica, la oxidación y la reticulación de proteínas²⁸⁻³⁰ y el daño al ADN (roturas de la cadena, oxidación de las bases y dimerización de timinas).³¹⁻³⁸

1.3. Peroxidación lipídica (PL)

1.3.1. Aspectos mecanísticos de la PL

La peroxidación lipídica (PL) es un proceso degenerativo a través del cual los lípidos de las membranas celulares sufren cambios químicos que están asociados con consecuencias adversas.¹³ La degradación peroxidativa de fosfolípidos insaturados, glicolípidos y colesterol (Ch) se produce mediante reacciones desencadenadas por: a) radicales libres (RL) tales como los radicales, peroxilo e hidroxilo y por b) especies no radicalarias como oxígeno singlete, ozono y peroxinitrito generado por la reacción del superóxido con óxido nítrico.³⁹

La PL afecta principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), debido a que éstos contienen numerosos dobles enlaces entre los cuales se encuentran grupos metileno (-CH₂-) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. Dicho proceso genera una serie de derivados tóxicos, como son los hidroperóxidos (ROOH), dienos conjugados, malonildialdehído, 4-hidroxiálquenos, isoprostanos y oxisteroles.

Además, la PL juega un papel crucial en muchos procesos oxidativos y es responsable del deterioro de alimentos y de numerosas enfermedades, como el Alzheimer y la aterosclerosis.^{8,40-42}

Un paso clave en la peroxidación de lípidos puede ser la AH de las posiciones alílicas por los RL reactivos, tales como hidroxilo, alquilo, alcoxilo, radicales peroxilo, y tripletes de estados excitados carbonílicos.^{14,43,44} Después de capturar una molécula de oxígeno, se forman radicales libres hidroperóxilos, que a su vez pueden propagar en la cadena de peroxidación.⁴⁵

Por otra parte, se ha demostrado que la PL puede producirse mediante irradiación ultravioleta (UV) de tipo A en combinación con agentes fotosensibilizantes,^{1,46} entre los que se encuentran los AINEs anteriormente mencionados. Así, la irradiación de disoluciones acuosas de KP en presencia del ácido linoleico (AL), un AGPI, produce cantidades significativas de derivados hidroperóxidos.^{3,47,48} La fotoperoxidación del AL por el KP se produce a través de un mecanismo radicalario (Tipo I), ya que la primera etapa es la abstracción de un hidrógeno doblemente alílico por el cromóforo BZF (Figura 1.4).

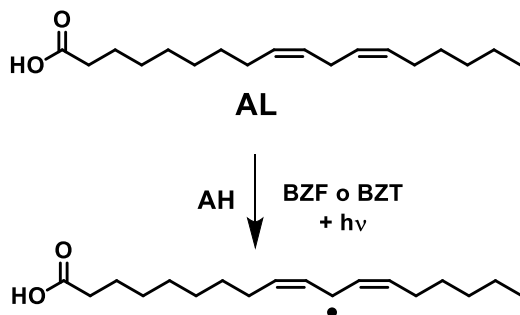


Figura 1.4. AH primaria en el ácido linoleico por el cromóforo BZF.

El TPA fotosensibiliza, aunque menos eficientemente, la peroxidación de AL a través de un mecanismo de tipo I. Sin embargo, siendo caracterizado por un estado excitado triplete de más baja energía de tipo π, π^* , también es capaz de producir oxígeno singlete, por lo que el mecanismo de Tipo II contribuye de manera eficiente en este proceso.¹ Además, se ha investigado la fotorreactividad del SP hacia el AL y como en el caso del TPA, ambos mecanismos Tipo I y II están involucrados en el proceso de peroxidación del AL.⁴⁹

1.3.2. La membrana celular: diana de las radiaciones UVA

La membrana plasmática es un constituyente muy importante de las células de los mamíferos. Entre sus funciones, destaca la de proteger el interior de la célula frente al líquido extracelular, y la de actuar como una barrera semipermeable, que permite el intercambio controlado de sustancias entre las regiones intra- y extracelulares. Está compuesta por proteínas (aproximadamente el 55 %), fosfolípidos (25 %), Ch (13%), otros lípidos (4 %) e hidratos de carbono (3 %). Su estructura básica es una bicapa lipídica constituida por dos estratos moleculares (Figura 1.5) que tienen orientados los grupos polares hacia el exterior y los apolares al interior, contactando entre sí y unidos por fuerzas de Van der Waals. Las proteínas se disponen de forma irregular entre los lípidos de la bicapa y se clasifican en: a) integrales, que atraviesan toda la membrana (actuando como canales o transportadoras) y b) periféricas, que están unidas sólo a la superficie (funcionando como enzimas o biocatalizadores). Por último, los carbohidratos aparecen en combinación con lípidos y proteínas en forma de glicoproteínas y glicolípidos.

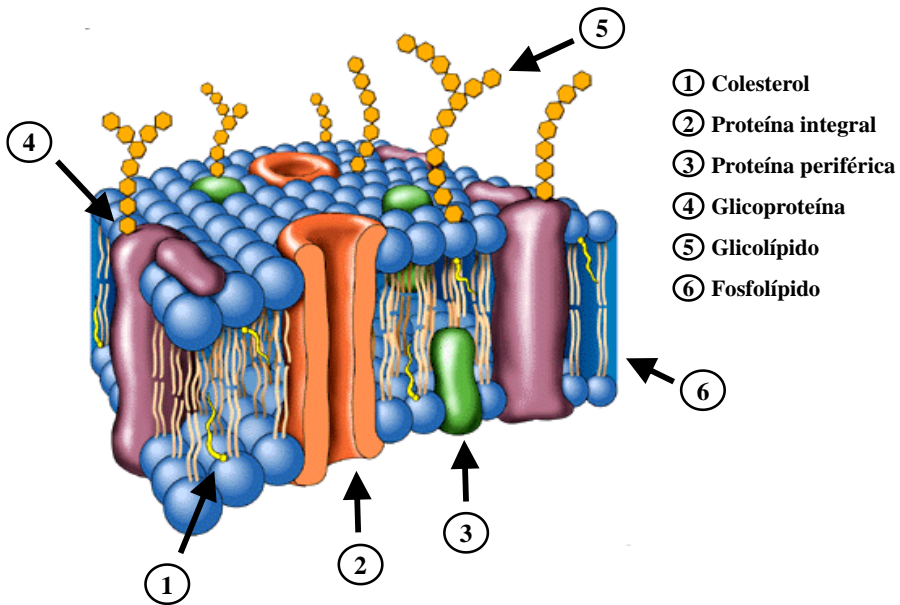


Figura 1.5. Estructura de la membrana plasmática. Modelo del mosaico fluido.

El Ch es un componente estructural esencial de la membrana celular, ya que garantiza la fluidez y la correcta permeabilidad de la bicapa lipídica. En el cuerpo humano, se encuentra también en el hígado e intestino, así como en la sangre, donde es transportado dentro de lipoproteínas. Además, el Ch juega un papel crucial como precursor de las hormonas esteroideas, vitamina D y ácidos biliares.

Por otra parte, las biomoléculas presentes en la membrana celular, tales como el Ch, son susceptibles de ser atacados por acción de un fotosensibilizador. Además, como el movimiento del Ch en la bicapa lipídica está fuertemente restringido por el entorno, este lípido de membrana es más proclive que los AGPI circundantes⁵⁰ a la formación de radicales.

1.4. Abstracción de hidrógeno (AH) en el colesterol (Ch)

1.4.1. Autoxidación del Ch

La oxidación del Ch en las células ocurre a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los productos de oxidación del Ch (oxiesteroles), tales como hidroperóxidos, dioles, epóxidos y cetonas,⁵¹⁻⁵³ están implicados en patologías como la aterosclerosis,⁵⁴ degeneración de la retina⁵⁵⁻⁵⁹ y trastornos metabólicos como la enfermedad de Niemann-Pick.⁶⁰ En particular, se está consolidando la hipótesis de que la oxidación del Ch contribuya de manera decisiva al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer,⁶¹⁻⁶³ ya que los oxiesteroles, a diferencia del Ch, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en el cerebro dando lugar a procesos inflamatorios.⁶⁴

Los mecanismos de oxidación no enzimáticos del Ch (Figura 1.6) se pueden encuadrar dentro del Tipo I (*via* AH por ROS y tripletes de carbonilos), o del Tipo II (mediada por $^1\text{O}_2$).⁶⁵⁻⁶⁷

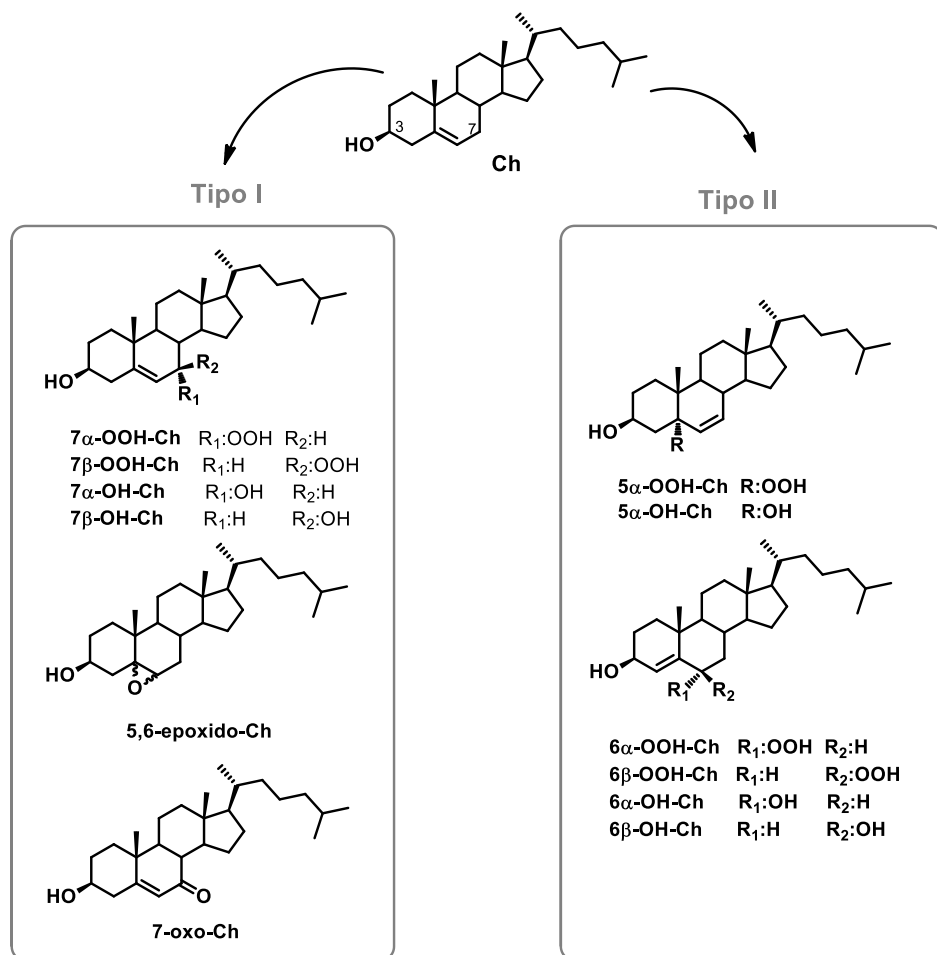


Figura 1.6. Oxiesteros formados por los dos mecanismos de autoxidación del Ch.

A través del mecanismo de Tipo I pueden formarse una serie de oxiesteros. Como se puede observar en la Figura 1.7, el sitio preferido para la AH en el Ch es la posición alílica en el carbono 7, donde el enlace C-H es relativamente débil. La AH primaria conduce a un radical centrado en el carbono (Ch•), que puede reaccionar con oxígeno en el estado fundamental y producir el radical peroxilo ChOO•.⁶⁸ Estos radicales peroxilo son suficientemente reactivos para abstraer hidrógeno

de una nueva molécula de Ch, dando lugar a una reacción en cadena. Además, en las membranas celulares, los $\text{ChOO}\cdot$ pueden abstraer hidrógeno de diferentes lípidos, como los AGPI, iniciando diversas reacciones radicalarias que conducen a la PL. Así, se forman diferentes oxisteroles (como los hidroperóxidos 7α y 7β -OOH-Ch), que se utilizan como marcadores biológicos para el estrés oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 1.7).

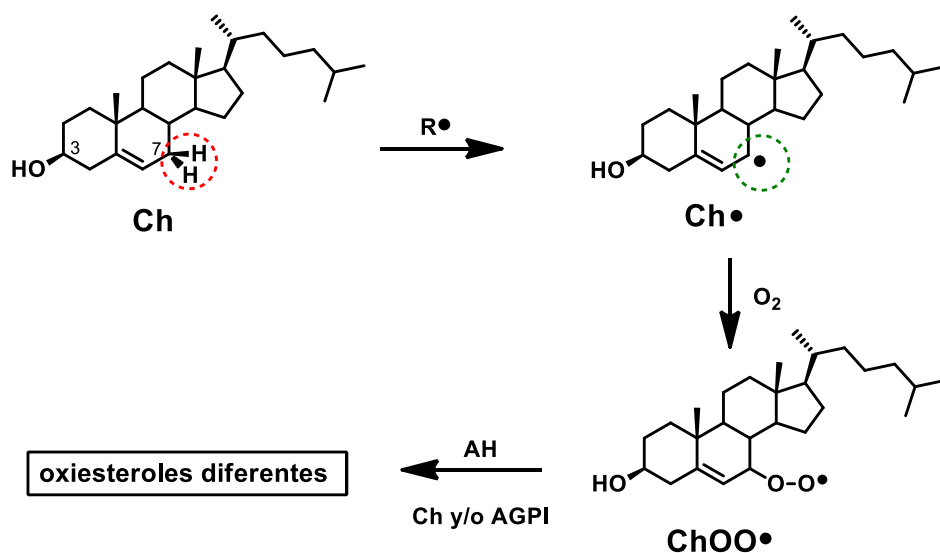


Figura 1.7. Oxidación del Ch *via* radicales libres.

La reducción de los hidroperóxidos 7α y 7β -OOH-Ch da lugar a los dioles 7α y 7β -OH-Ch, respectivamente.^{39,69} En cambio, su deshidratación⁷⁰ conduce a la formación de la cetona 7-oxo-Ch, uno de los oxisteroles más abundantes encontrados en las lesiones ateroscleróticas.⁵⁴ Los dioles y la cetona pueden formarse también por desproporción de los hidroperóxidos.⁷¹ La adición de un radical peroxilo

al doble enlace del Ch conduce a otro grupo de productos, los 5,6-epoxido-Ch (Figura 1.6).⁶⁵

Recientemente, se ha descrito que la oxidación del Ch por *via* radicalaria no conduce exclusivamente a la formación de 7-hidroperóxidos. Así, la AH en el carbono 4 puede originar 4- y 6-hidroperóxidos (Figura 1.8).⁷²

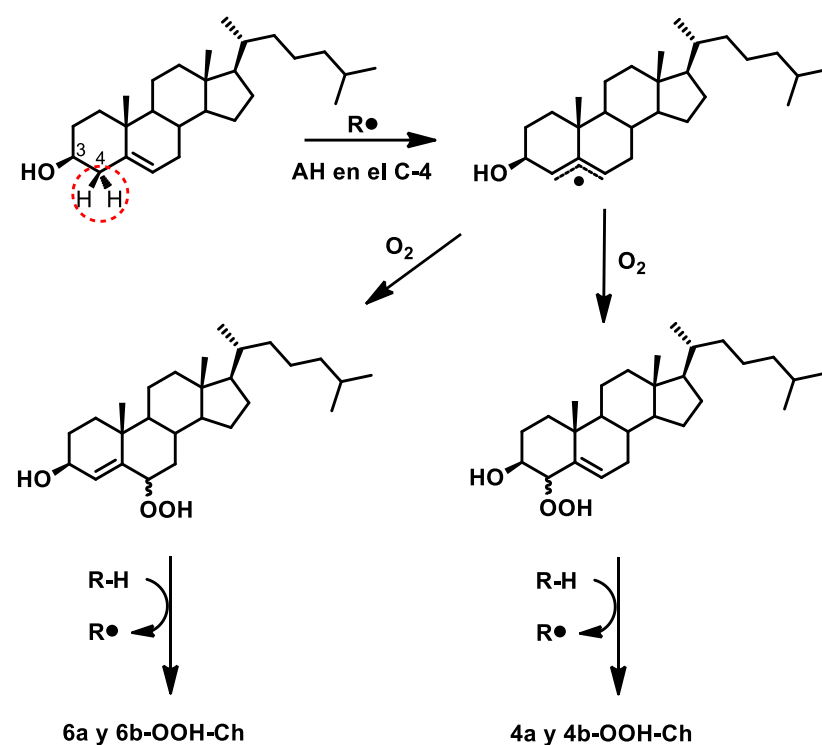


Figura 1.8. Formación de 4- y 6-hidroperóxidos por AH en C-4.

A pesar de que la energía del enlace C4-H es significativamente más alta que la del enlace C7-H (89.0 *vs* 83.2. kcal/mol), la AH en el carbono 4 se encuentra posibilitada por la formación de enlaces de

hidrógeno entre el radical peroxilo aceptor y el grupo hidroxilo en la posición 3 del Ch.

En cuanto a la oxidación Tipo II del Ch (por $^1\text{O}_2$, ver Figura 1.6), se generan los oxisteroles 5α y 5β -OOH-Ch como productos mayoritarios, junto con los 6α y 6β -OOH-Ch.^{71,73,74}

1.4.2. Fotooxidación del Ch por arilcetonas

En los últimos 40 años, la reacción de AH iniciada por compuestos carbonílicos ha sido ampliamente investigada en fotoquímica. De este fotoproceso se han estudiado diferentes aspectos mecanísticos, como la multiplicidad de espín^{75,76} (singlete vs triplete), la naturaleza electrónica del estado excitado^{77,78} (n,π^* vs π,π^*), la estereoquímica,⁷⁹ el impedimento estérico^{76,80,81} y la influencia del entorno químico (polaridad del disolvente, presencia de enlaces de hidrógeno).^{76,82,83}

El estado excitado triplete n,π^* de la benzofenona (BZF) es ampliamente utilizado como modelo apropiado en reacciones de radicales libres biológicamente relevantes.^{26,75,84,85} Su estructura electrónica y las constantes de velocidad de AH son similares a las de los radicales libres centrados en el oxígeno (Figura 1.9). El 2-benzoiltiofeno (BZT) es un derivado de la BZF y se diferencia de esta última por la sustitución de un benceno por un tiofeno. Como se ha mencionado anteriormente, su estado excitado triplete de más baja energía es de naturaleza π,π^* .

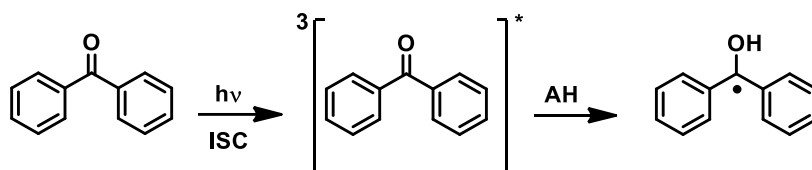


Figura 1.9. Proceso de AH por excitación de la benzofenona.

En trabajos anteriores, se ha demostrado mediante experimentos de fotólisis en estado estacionario y de destello láser que compuestos diastereoisoméricos en los que el KP está unido a moléculas dadoras de hidrógeno (tetrahidrofurano e isopropilbenceno) generan birradicales a través de AH intramolecular estereoselectiva. Estos birradicales pueden recombinar para formar sistemas macrocíclicos con una estereoquímica definida.^{86,87}

Asimismo, la irradiación de 1,4-ciclohexadienos, que poseen hidrógenos doblemente alílicos unidos de manera covalente al KP, da lugar a productos de acoplamiento BZF-dieno.^{4,88} También en este caso se forman intermedios birradicalarios mediante AH por el triplete de la BZF.

En la década de los años 1970, R. Breslow y colaboradores prepararon diferentes ésteres en los que varios esteroides estaban unidos covalentemente a derivados de la BZF. Tras ser irradiados, algunos de estos ésteres experimentaban la abstracción intramolecular de hidrógeno del esqueleto esteroide por la BZF. La reacción de AH llevaba a la formación de distintos productos (olefinas, cetonas, lactonas) cuya naturaleza dependía en gran medida de la geometría de los esterios preparados (Figura 1.10).⁸⁹⁻⁹²

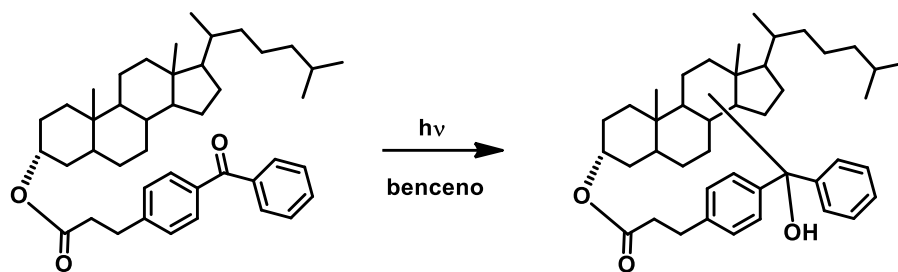


Figura 1.10. Oxidación remota mediante fotólisis de 3α-colestanol unido covalentemente a la BZF.

Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se han sintetizado ésteres en los que el Ch está unido de manera covalente a fármacos AINEs. Así, se ha demostrado mediante estudios fotoquímicos y fotofísicos que en diadas que contienen KP (que posee el cromóforo BZF) covalentemente unido al Ch, son excelentes sistemas para generar birradicales mediante AH intramolecular y, por tanto, para estudiar el mecanismo de oxidación de Tipo I del Ch.⁹³ Por el contrario, en diadas que contienen TPA, con un cromóforo diarilcetona de naturaleza π,π^* , no se observa AH. Sin embargo, se genera $^1\text{O}_2$ que participa en un mecanismo de Tipo II (Figura 1.11).^{93,94}

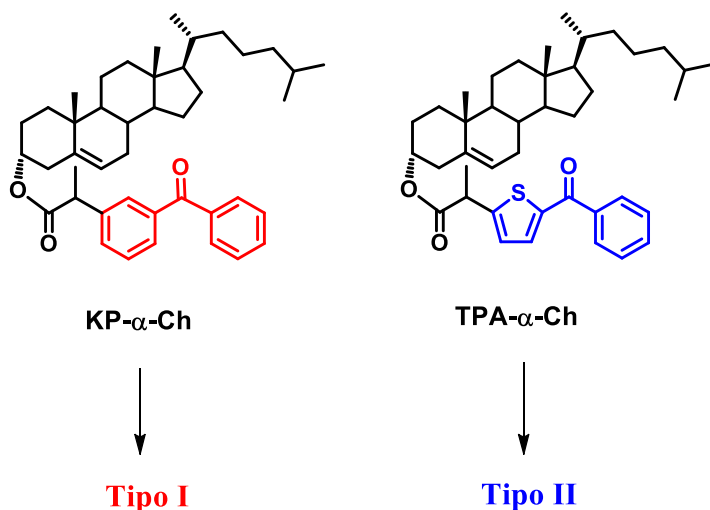


Figura 1.11. Diadas Kp- α -Ch y TPA- α -Ch.

1.5. Polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP)

La detección directa de los ROS es complicada por sus tiempos de vida cortos y sus bajas concentraciones en el estado estacionario. La polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP) en tiempo resuelto es un método basado en el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear (RMN) de los productos de reacción que implican intermedios radicalarios.⁹⁵⁻⁹⁷ Es una técnica muy eficaz que permite identificar radicales con tiempos de vida muy cortos y productos formados selectivamente a través de reacciones radicalarias. Así, al registrar el espectro de RMN de un determinado sistema dinámico, la formación de radicales libres puede ser detectada al observar una polarización en dirección positiva (absorción) o negativa (emisión) de algunas señales. En este sentido, la técnica de CIDNP se ha utilizado para la investigación de la peroxidación lipídica en sistemas que contienen

hidrógenos doblemente alílicos, como el ácido linoleico (AL), indicando que la AH puede ser responsable de la isomerización de los AGPI. Este proceso es la base de la alteración de la estructura de las membranas causada por el estrés oxidativo.⁸⁵ En el Anexo II de la presente tesis se encuentra una descripción más detallada de la técnica del CIDNP.

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivos

Los fármacos usados hoy en día para el tratamiento de las enfermedades son, en general, seguros y eficaces. Sin embargo, presentan efectos secundarios con bastante frecuencia. Entre ellos, las reacciones de fotosensibilización constituyen en la actualidad un tema de gran interés.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), en especial los ácidos 2-arilpropiónicos, son fármacos fotoactivos capaces de reaccionar con lípidos de membrana induciendo su peroxidación. Por lo tanto, el objetivo general de la presente tesis es investigar los mecanismos involucrados en la oxidación del colesterol (Ch), en particular en el proceso de abstracción de hidrógeno (AH) por los cromóforos benzofenona (BZF) y 2-benzoiltiofeno (2-BZT), contenidos en los AINEs ketoprofeno (KP) y suprofeno (SP), respectivamente. Para ello se combinan estudios de fotólisis en estado estacionario, fotólisis de destello láser (FDL) y foto-polarización nuclear dinámica inducida químicamente (foto-CIDNP).

Los objetivos específicos de la tesis son los siguientes:

- Estudiar la influencia del disolvente en la abstracción de los hidrógenos alílicos en la posición C-7 del Ch, por el estado excitado triplete de la BZF.
- Investigar cómo los factores topológicos influyen en el proceso de AH intramolecular en sistemas en los que el Ch está unido covalentemente al KP a través de un puente de tipo amida, con rotación restringida.

- Estudiar cómo la naturaleza electrónica del estado excitado triplete del BZT (π,π^*) afecta al proceso de AH en diadas SP-Ch.
- Investigar el proceso de AH en la posición C-4 del Ch en oxisteroles unidos covalentemente al KP a través del grupo OH de la posición 7 (α y β).

2.2. Aims

Drugs used nowadays for treatment of diseases are generally safe and effective. However, side effects can occur quite frequently. Among them, photosensitization reactions are currently a subject of great interest.

Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), especially 2-arylpropionic acids, are photoactive drugs capable of reacting with lipids inducing their peroxidation. For this reason, the general objective of the present thesis is to investigate the mechanisms involved in cholesterol (Ch) oxidation, in particular in the hydrogen abstraction (HA) by benzophenone (BZF) and 2-benzoylthiophene (BZT) chromophores, contained in the NSAIDs ketoprofen (KP) and suprofen (SP), respectively. For this purpose, steady-state photolysis, laser flash photolysis and photo-CIDNP will be combined.

The specific aims of the thesis are:

- to investigate the solvent effects on abstraction of the Ch C-7 allylic hydrogens by the triplet excited state of BZF.
- to study the influence of topological factors on intramolecular HA in covalently linked benzophenone–aminocholestene dyads, which possess an amide bridge, with restricted rotation.
- to investigate how the electronic nature (π,π^*) of the BZT triplet excited state affects the HA process in SP-Ch systems.
- to study the HA process at position C-4 of Ch in oxysterols covalently linked to KP through the OH group at position 7 (α or β).

**Capítulo 3. Influencia del disolvente en el proceso
de abstracción de hidrógeno en el colesterol por el
estado excitado triplete de la benzofenona**

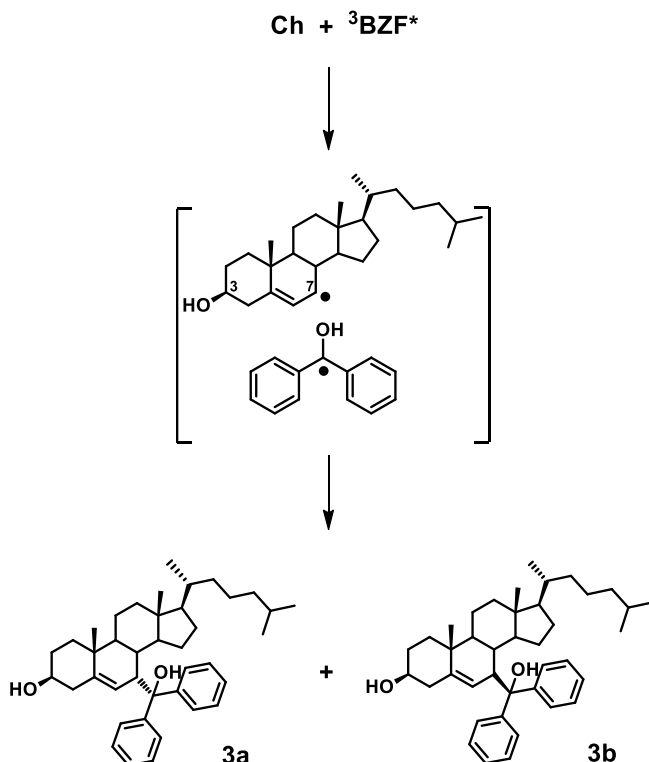
3.1. Introducción

La activación oxidativa del colesterol (Ch) en la posición C-7 es considerada un proceso de interés tanto en química como en biología. Así, la principal ruta de síntesis de los ácidos biliares a partir del Ch es iniciada por la hidroxilación del C-7, que es mediada por la enzima 7α -hidroxilasa (CYP7A1), la cual pertenece a la familia de las enzimas metabólicas P450.⁹⁸ Además, se ha evidenciado que la oxidación de C-7 del Ch está implicada en la disminución de oxidantes presentes en sangre y plasma. Por tanto, el Ch puede actuar como un eficaz antioxidante *in vivo*.⁹⁹

Como se ha descrito en la introducción general, el Ch es una diana importante para el daño oxidativo.^{74,100-103} El proceso de oxidación del Ch puede ocurrir a través de un mecanismo de Tipo I (*via* radicales libres) mediante abstracción de un átomo de hidrógeno alílico por fotosensibilizadores activados mediante luz UVA.^{93,94} Teniendo en cuenta la importancia del proceso de abstracción de hidrógeno (AH) en la fotooxidación Tipo I del Ch, en el presente capítulo se pretende llevar a cabo estudios mecanísticos de la fotorreacción entre el estado excitado triplete de la benzofenona (BZF) y el Ch. En particular, se investigarán los efectos del disolvente en la abstracción de los hidrógenos alílicos en la posición C-7 del Ch por el estado excitado triplete de la BZF, mediante estudios en estado estacionario y en tiempo resuelto empleando distintos disolventes orgánicos.

3.2. Resultados y discusión

Para investigar la formación de fotoproductos, se han llevado a cabo estudios de fotólisis en estado estacionario de disoluciones de BZF/Ch (1.5:1 proporciones molares) en atmósfera de nitrógeno, en diclorometano y acetonitrilo, usando un fotorreactor multilámpara equipado con 8 lámparas UVB ($\lambda_{\text{max}} = 300$ nm, distribución gaussiana). En diclorometano no se obtuvieron productos derivados del Ch, mientras que en acetonitrilo se aislaron dos fotoproductos diastereoisoméricos, **3a** y **3b** (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Formación de los fotoproductos **3a** y **3b** mediante fotólisis del Ch y BZF en acetonitrilo.

La formación de los productos **3a** y **3b** procede de la AH intermolecular desde la posición alílica en 7 del Ch, por el estado excitado triplete de la BZF, y posterior acoplamiento C-C del par de radicales generado. La elucidación estructural de los compuestos **3a** y **3b** se hizo en base a RMN (^1H y ^{13}C). La estereoquímica de los nuevos centros quirales se determinó mediante experimentos NOEDIFF; las interacciones más significativas se observaron entre los grupos fenilos y los protones de la cara β convexa en el fotoproducto **3b** (Figura 3.1).

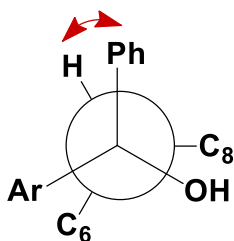


Figura 3.1. Interacciones NOE en el compuesto **3b**.

La cinética de reacción se investigó mediante estudios de fotólisis de destello láser a 355 nm. Así, cuando se representó la inversa del tiempo de vida del triplete de la BZF frente a la concentración de Ch, se obtuvo una relación lineal con diclorometano como disolvente (Figura 3.2A). La constante de desactivación del triplete resultó ser $2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, bajo estas condiciones, se observó una extensa AH a partir del disolvente. Esto se demostró comparando las cinéticas de desaparición de la especie transitoria con el tiempo de vida más largo, que se corresponde con el radical cetilo formado por AH a partir del disolvente, a 545 nm en presencia y en ausencia del Ch (Figura 3.2B).

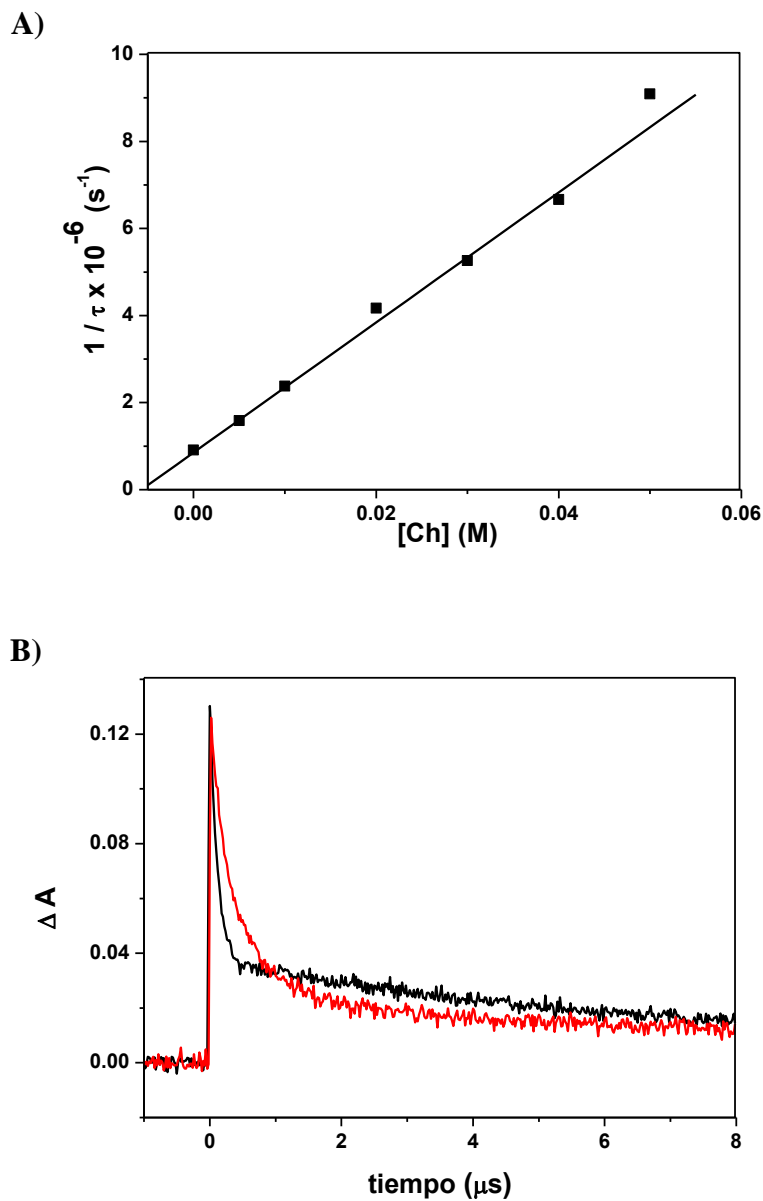
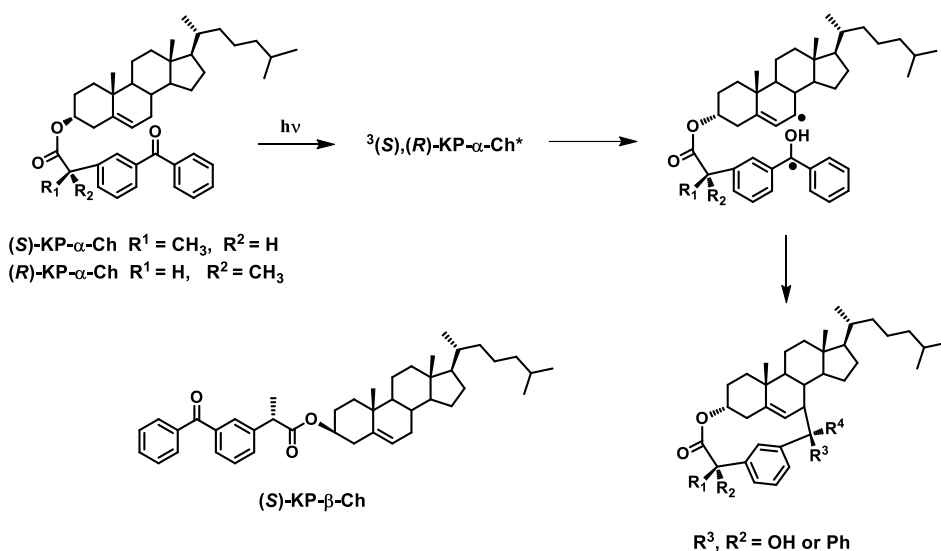


Figura 3.2. A) Efecto de la adición de Ch en la velocidad de desactivación del triplete de la BZF a 610 nm (representación Stern-Volmer) B) Cinéticas de desaparición de BZF a 545 nm en diclorometano, en ausencia (rojo) y en presencia de Ch (negro, 0.02 M).

En acetonitrilo, la desactivación del triplete de la BZF fue más rápida, pero no se pudieron determinar con precisión los parámetros cinéticos, debido a limitaciones de solubilidad; no obstante, la constante de velocidad, estimada a partir de la pendiente inicial de la traza no lineal (no mostrada), resultó ser 1 orden de magnitud mayor. Problemas similares de solubilidad se encontraron en otros disolventes orgánicos, como metanol o dioxano, que son mejores dadores de hidrógeno en comparación con el acetonitrilo. Por tanto, las principales dificultades en la obtención de datos fiables acerca de la fotorreacción intermolecular entre Ch y BZF estaban relacionadas con la baja solubilidad del Ch y con la posibilidad de AH a partir del disolvente por el triplete de la BZF.

Con el fin de evitar dichos problemas, se estudió la versión intramolecular del proceso, utilizando Ch y BZF unidos covalentemente. Esto evitaría la necesidad de altas concentraciones del desactivador e implicaría la disminución de los tiempos de vida del triplete, minimizando la AH a partir del disolvente. Por otra parte, la unión covalente entre Ch y BZF bloquearía completamente el escape de los radicales de la “jaula”, favoreciendo el acoplamiento C-C.

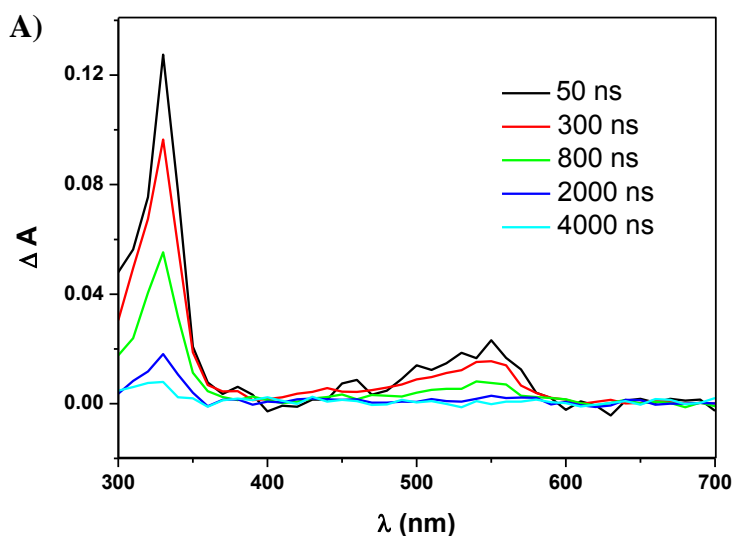
En este sentido, las diadas diastereisoméricas (**S**)-**KP- α -Ch** y (**R**)-**KP- α -Ch** (Esquema 3.2) se sometieron a estudios de fotólisis de destello láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm) bajo una serie de condiciones, a fin de determinar los parámetros cinéticos y los rendimientos cuánticos de los procesos relevantes.



Esquema 3.2. Estructuras de (S)-KP- α -Ch, (R)-KP- α -Ch y (S)-KP- β -Ch y de los productos resultantes de la irradiación de las diadas (S)-KP- α -Ch y (R)-KP- α -Ch.

Se ha demostrado previamente⁹³ que los espectros de absorción transitoria de (S) y (R)-KP- α -Ch no se corresponden con los estados excitados triplete sino con los correspondientes birradicales, generados por AH intramolecular en C-7 del Ch. La posterior ciclación de estos birradicales da lugar a fotoproductos de acoplamiento C-C de manera diastereoselectiva. Así, se registraron los espectros de absorción transitoria de (S) y (R)-KP- α -Ch en distintos disolventes (diclorometano, acetonitrilo, dioxano, metanol y octanol) 50 ns después del pulso del láser a 355 nm. En todos los casos, las especies transitorias presentaron características espectrales similares. En la Figura 3.3A se muestra el espectro de la diada (S)-KP- α -Ch en metanol, que se corresponde esencialmente con el birradical, con un tiempo de vida en la

escala de submicrosegundos. Por otra parte, en el espectro de absorción transitoria de la diada (*S*)-**KP- β -Ch** (Figura 3.3B), que adopta una conformación extendida por su configuración ecuatorial 3β , se observó inicialmente la típica banda de absorción triplete-triplete (T-T) a 525 nm y, posteriormente, el radical cetilo generado por AH intermolecular a partir del metanol que no desaparecía en varios microsegundos.



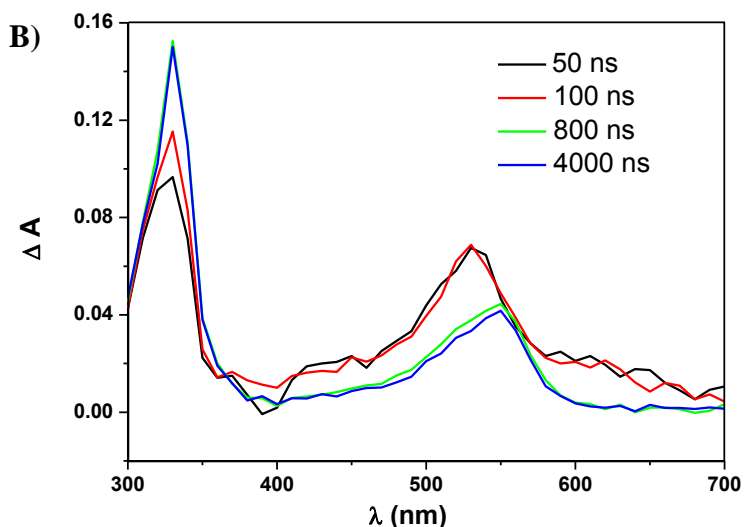


Figura 3.3. Espectros de absorción transitoria de la diada **(S)-KP- α -Ch** (A) y **(S)-KP- β -Ch** (B) en metanol (N_2) obtenidos a diferentes tiempos después del pulso del láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm).

Como consecuencia de la superposición espectral de los tripletes y los birradicales y por los tiempos de vida tan cortos de triplete, no fue posible conseguir parámetros cinéticos fiables en los distintos disolventes mediante observación directa de la absorción T-T para las diadas **(S)** y **(R)-KP- α -Ch**. Por tanto, se realizaron experimentos adicionales con el fin de conseguir valores precisos de tiempos de vida del triplete utilizando el método de transferencia de energía, usando naftaleno (NP) como aceptor.^{4,88,104} Así, se llevaron a cabo experimentos de fotólisis de destello láser a 355 nm (longitud de onda a la que el NP no absorbe) de disoluciones de **(S)** y **(R)-KP- α -Ch** en acetonitrilo, dioxano y metanol en presencia de cantidades crecientes de NP y se monitorizó la absorción

T-T de NP a 415 nm. Disoluciones en diclorometano se usaron como control.^{93,94} Cuando se representó la inversa de la absorbancia a 415 nm del triplete de NP frente a la inversa de la concentración de NP, se obtuvieron dos líneas rectas (Figura 3.4 y ecuación 1).

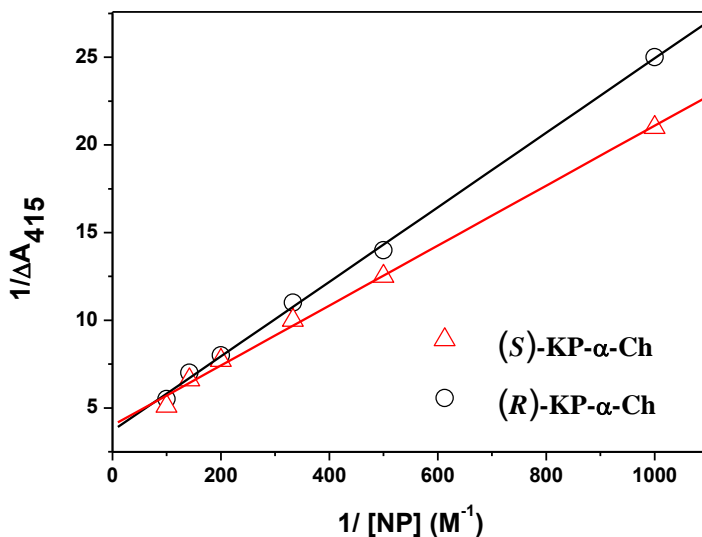


Figura 3.4. Doble recíproco para la desactivación del estado triplete excitado de las diadas (S)-KP-α-Ch (rojo) y (R)-KP-α-Ch (negro) por NP en acetonitrilo.

$$1/A_{415} = \alpha + \alpha / (k_q \times \tau_T \times [NP]) \quad (1)$$

En la ecuación (1), A_{415} es la absorbancia del triplete de NP a 415 nm, k_q es la constante de velocidad bimolecular de la desactivación del triplete por NP, τ_T es el tiempo de vida del triplete de (S) y (R)-KP-α-Ch en ausencia de NP, y α es una constante. Los parámetros de Stern-Volmer ($k_q \times \tau_T$) se obtuvieron a partir de los cocientes entre las

ordenadas en el origen y las pendientes de las rectas y resultaron ser 205 M⁻¹ y 169 M⁻¹ para (S) y (R)-KP- α -Ch, respectivamente. Por otra parte, la k_q intermolecular determinada en acetonitrilo para (S)-KP fue 8 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹, y se asumió la misma para las diadas en los diferentes disolventes (diclorometano, dioxano y metanol). Con estos datos, se pudieron obtener los tiempos de vida de triplete y los valores obtenidos se usaron para determinar las constantes de velocidad para el proceso intramolecular (k_{iq}) por medio de la ecuación (2) (Tabla 3.1).

$$k_{iq} = 1/\tau_i - 1/\tau_0 \quad (2)$$

donde τ_i se corresponde con el tiempo de vida del compuesto (S) y (R)-KP- α -Ch y τ_0 es el tiempo de vida de triplete del compuesto de referencia (S)-KP (1.6 μ s).

El análisis cinético directo de las trazas de desaparición a 545 nm permitió determinar los tiempos de vida del birradical (τ_{BR}). Los valores de rendimientos cuánticos de formación del birradical (ϕ_{BR}) se obtuvieron mediante el método comparativo,¹⁰⁵ a partir de la especie transitoria con el tiempo de vida más corto a 545 nm, inmediatamente después del pulso del láser. Como estándar se usó la BZF asumiendo el mismo coeficiente de absorción molar para los birradicales y el radical cetilo (KR) de la BZF, formado a través de AH intermolecular a partir del disolvente. Cabe destacar que, incluso en disolventes que son buenos dadores de protones (dioxano, metanol), el proceso intramolecular ($\phi_{BR} = 0.65\text{--}0.73$) era mucho más eficiente que el intermolecular ($\phi_{KR} = 0.05\text{--}0.14$). Como era de esperarse, todos los radicales resultantes de reacciones

de AH fueron desactivados por oxígeno con constantes de velocidad en el rango de $1.5 - 5.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Después de establecer los valores de k_{iq} y ϕ_{BR} , las constantes de velocidad para la AH intramolecular (k_H) y la desactivación física (k_π) fueron determinadas en todos los disolventes teniendo en cuenta que $k_H = k_{iq} \times \phi_{BR}$ y $k_{iq} = k_H + k_\pi$. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de los estados excitados triplete de las diadas (S) y (R)-KP- α -Ch en diferentes disolventes.^a

		τ_T (μs)	$k_{iq}/10^6$ (s^{-1}) ^c	$k_H/10^6$ (s^{-1}) ^d	$k_\pi/10^6$ (s^{-1}) ^d	ϕ_{BR} ^e	τ_{BR} ^d (μs)	ϕ_{KR} ^e	ϕ_{PR} ^f
(S)-KP- α -Ch	CH ₂ Cl ₂ ^b	0.010	100	80	20	0.80	0.28	0.00	0.30
(S)-KP- α -Ch	CH ₃ CN	0.025	33	26	7	0.80	0.60	0.00	0.70
(S)-KP- α -Ch	Dioxano	0.030	23	19	4	0.70	0.66	0.14	0.76
(S)-KP- α -Ch	CH ₃ OH	0.030	28	20	8	0.69	0.80	0.05	0.76
(R)-KP- α -Ch	CH ₂ Cl ₂ ^b	0.010	100	80	20	0.80	0.22	0.00	0.47
(R)-KP- α -Ch	CH ₃ CN	0.020	50	37	13	0.75	0.56	0.00	0.70
(R)-KP- α -Ch	Dioxano	0.020	39	33	6	0.73	0.62	0.13	0.76
(R)-KP- α -Ch	CH ₃ OH	0.020	45	31	14	0.65	1.10	0.05	0.64

^a Errores relativos inferiores al 5 % de los valores indicados. ^b Datos descritos en parte en la ref. 93. ^c Las constantes de velocidad de desactivación intramolecular se obtuvieron usando la ecuación $k_{iq} = 1/\tau_i - 1/\tau_0$, donde τ_i se corresponde con el tiempo de vida del compuesto (S) y (R)-KP- α -Ch y τ_0 es el tiempo de vida de triplete de la BZF en disolventes diferentes. ^d Las constantes de velocidad de AH y desactivación física fueron determinadas mediante las siguientes ecuaciones: $k_H = k_{iq} \times \phi_{BR}$ y $k_{iq} = k_H + k_\pi$. ^e Los rendimientos cuánticos del birradical se obtuvieron por el método comparativo, usando BZF como estándar y asumiendo el mismo coeficiente de absorción molar para los birradicales y el radical cetilo de la BZF. ^f El rendimiento cuántico de fotodegradación fue determinado usando *N*-metildifenilamina como actinómetro.¹⁰⁶

A pesar de que no se encontraron de manera directa correlaciones bien definidas entre los valores de k_H y las propiedades del disolvente, se observaron importantes efectos del disolvente y una significativa estereodiferenciación. Así, en diclorometano el proceso se produjo de manera mucho más rápida (*ca.* 4 veces) que en dioxano o metanol, mientras que en acetonitrilo se observó una situación intermedia. Asimismo, en la mayoría de los disolventes, los valores de k_H para **(R)-KP- α -Ch** fueron mayores que para **(S)-KP- α -Ch**.

Para investigar la influencia de los disolventes en el proceso completo de fotorreducción, se llevaron a cabo experimentos de fotólisis en estado estacionario mediante luz monocromática a 254 nm, en diclorometano, acetonitrilo, dioxano y metanol en las mismas condiciones. Se monitorizó la desaparición del cromóforo BZF en función del tiempo de irradiación mediante la disminución progresiva de la banda de absorción a 254 nm. Algunos resultados representativos se muestran en la Figura 3.5. Los rendimientos cuánticos de fotorreducción se determinaron usando *N*-metildifenilamina como actinómetro¹⁰⁶ (véase la Tabla 3.1).

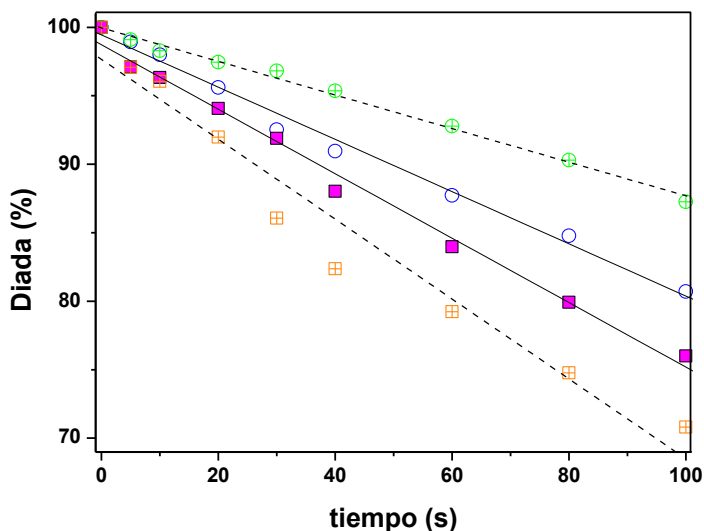


Figura 3.5. Fotorreducción de las diadas (*S*) y (*R*)-KP- α -Ch en distintos disolventes desaireados en función del tiempo de irradiación. Verde: (*S*)-KP- α -Ch en CH₂Cl₂. Azul: (*R*)-KP- α -Ch en CH₂Cl₂. Naranja: (*S*)-KP- α -Ch en MeOH. Magenta: (*R*)-KP- α -Ch en MeOH.

Una vez más, se observaron importantes efectos del disolvente y una significativa estereodiferenciación. La fotorreacción menos eficiente ocurrió en diclorometano, a pesar de los altos valores de k_H , k_{iq} y ϕ_{BR} en este disolvente. En realidad, la formación del birradical no conduce necesariamente a productos de acoplamiento C-C. Esto se debe al hecho que los birradicales pueden seguir rutas alternativas de desaparición, como por ejemplo la transferencia de hidrógeno del oxígeno carbonílico al carbono en posición 7 regenerando el compuesto de partida, un proceso que hubiera sido retardado por la estabilización de los 1-hidroxi-birradicales *via* enlaces de hidrógeno con el disolvente.

3.3. Conclusiones

La abstracción de hidrógeno en la posición C-7 del Ch por el estado excitado triplete de la BZF muestra una significativa dependencia del disolvente. En la versión intermolecular, se observa una diferencia considerable en el estudio de productos entre diclorometano y acetonitrilo, aunque resulta difícil evaluar los efectos cinéticos, debido a limitaciones de solubilidad. Sin embargo, la unión covalente de las unidades de Ch y BZF en las diadas (*S*) y (*R*)-**KP- α -Ch** ha permitido determinar una serie completa de medidas cinéticas en diferentes condiciones. Así, se han revelado importantes efectos del disolvente y una significativa estereodiferenciación en la mayoría de los procesos involucrados y, en particular, en las constantes de velocidad de AH intramolecular.

3.4. Procedimiento experimental

3.4.1. General

La BZF y el β -Ch eran disponibles comercialmente. Los reactivos y los disolventes comerciales se usaron sin purificación adicional. Las diadas KP- α -Ch se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en la ref. ⁹³.

3.4.2. Medidas de fotólisis de destello láser

Todas las muestras se disolvieron en diclorometano y las disoluciones obtenidas tenían una absorbancia de *ca.* 0.05 a 355 nm. Las disoluciones se purgaron mediante burbujeo de nitrógeno (cuando se

especifica). Como el naftaleno no absorbe a 355 nm, bajo estas condiciones más del 99 % de la luz fue absorbida por las diadas. Las constantes de velocidad de la desactivación del estado excitado triplete por oxígeno, NP y Ch fueron determinadas mediante la ecuación de Stern-Volmer ($1/\tau = 1/\tau_0 + k [\text{desactivador}]$). Las concentraciones usadas oscilaban entre 1.27 and 0.27 mM (concentraciones de O₂ puro y aire en diclorometano, respectivamente) en el caso de O₂, entre 0.5 y 20 mM en el caso del NP y entre 1 y 50 mM en el caso del Ch. Una reacción de transferencia de energía de (S) y (R)-KP- α -Ch a NP fue empleada para determinar los tiempos de vida de triplete de dichas diadas en diclorometano, acetonitrilo, metanol y dioxano. Así, se prepararon disoluciones de (S) y (R)-KP- α -Ch (0.5 mM) y cantidades crecientes del desactivador (1 mM y 20 mM).

3.4.3. Medidas de fotólisis en estado estacionario

Disoluciones desaireadas de Ch (92.8 mg, 0.24 mmol) y BZF (65.5 mg, 0.36 mmol) en acetonitrilo (120 mL) fueron irradiadas durante 3 horas en tubos de Pyrex en un fotorreactor multilámpara equipado con 8 lámparas UVB ($\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$, distribución gaussiana). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano acetato de etilo- diclorometano de 70:20:10 v/v/v) obteniéndose los fotoproductos puros **3a** y **3b**.

3a (18 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ 0.42 (s, 3H), 0.76 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H), 0.95 (s, 3H),

0.60-2.00 (señal compleja, 24H), 2.08-2.31 (m, 2H), 2.40 (s, 1H), 3.32 (brs, 1H), 3.45 (m, 1H), 5.30 (dd, $J = 5.3$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, 1H), 7.03-7.36 (m, 6H), 7.42 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz), δ 10.9, 18.8, 19.1, 20.7, 22.6, 22.8, 23.6, 26.3, 27.6, 28.0, 31.3, 35.7, 36.1, 36.5, 38.4, 38.7, 39.5, 40.5, 42.2, 42.8, 44.1, 48.1, 54.7, 72.2, 79.7, 124.5, 126.5, 127.1, 127.5, 127.8, 128.2, 128.7, 146.1, 146.9, 147.8. Masa exacta: encontrado m/z 569.4331, calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{O}_2$ (MH^+) 569.4359.

3b (19 %). ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ -0.65 (m, 1H), 0.43 (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 9H), 0.87 (s, 3H), 0.90- 2.18 (señal compleja, 25H), 1.97 (s, 1H), 2.30 (s, 1H), 3.18 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 5.14 (brs, 1H), 7.08-7.32 (m, 8H), 7.45 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J' = 1.5$ Hz, 2H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz), δ 12.9, 18.3, 18.8, 22.6, 23.3, 24.0, 24.6, 27.9, 28.0, 29.7, 31.7, 32.5, 35.4, 36.0, 36.1, 38.1, 39.5, 41.2, 42.5, 44.4, 46.9, 55.1, 56.3, 58.8, 70.9, 80.0, 124.5, 126.6, 126.9, 127.4, 127.5, 127.8, 128.9, 145.2, 147.0, 148.0. Masa exacta: encontrado m/z 569.4384, calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{O}_2$ (MH^+) 569.4359.

Irradiaciones de (*S*) y (*R*)-**KP- α -Ch** con luz monocromática a 254 nm se llevaron a cabo usando una lámpara de Xenon de un espectrofluorímetro Photon Technology. Las disoluciones (*ca.* 10^{-5} M de cada compuesto) fueron irradiadas en condiciones anaeróbicas y monitorizadas mediante espectrofotometría UV/Vis siguiendo la disminución de la absorción a 254 nm.

Para determinar el rendimiento cuántico de fotodegradación de las diadas (*S*) y (*R*)-**KP- α -Ch** en diferentes disolventes, se usó la *N*-

metildifenilamina en metilciclohexano como actinómetro, con un rendimiento cuántico de formación de *N*-metilcarbazol de 0.42. Las disoluciones fueron fotolizadas bajo atmósfera inerte empleando luz monocromática a 300 nm y monitorizadas mediante espectrofotometría UV, siguiendo la disminución de la absorción a 355 nm. Así, los rendimientos cuánticos se calcularon a partir de la pendiente de las rectas a una absorbancia de 355 nm *versus* el tiempo de irradiación.

**Capítulo 4. Control topológico en el proceso de
abstracción de hidrógeno intramolecular en diadas
aminocolesteno-benzofenona**

4.1. Introducción

Los factores entrópicos, tales como la proximidad y la preorientación, pueden jugar un papel relevante en la oxidación del colesterol (Ch). En las membranas celulares, el movimiento del Ch está fuertemente restringido por el entorno y, por esta razón, es más proclive a la formación de radicales que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) circundantes,⁵⁰ a pesar de que la energía de disociación del enlace C₇-H en el Ch es *ca.* 50 kJ mol⁻¹ mayor que la ruptura homolítica de los hidrógenos alílicos en los AGPI.¹⁰⁷

Para demostrar la influencia de los factores topológicos sobre el proceso de AH en el Ch, se han estudiado diadas en las que la BZF está unida covalentemente al aminocolesteno. Las diadas se han preparado a partir del KP como derivado de la benzofenona (BZF). En estos sistemas, ambas unidades poseen una geometría confinada y se encuentran próximas entre sí, mimetizando la situación del Ch en las membranas celulares.

Para investigar el proceso de AH en el 3 α -aminocolesteno (**NH₂Ch**) por el estado excitado triplete del ketoprofeno (KP) en las diadas (**S**)-**KP-NHCh** y (**R**)-**KP-NHCh** (Figura 4.1) se han combinado experimentos de fotólisis en estado estacionario, fotólisis de destello láser (FDL) y foto-polarización nuclear dinámica inducida químicamente (foto-CIDNP).

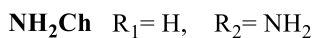
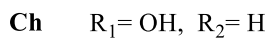
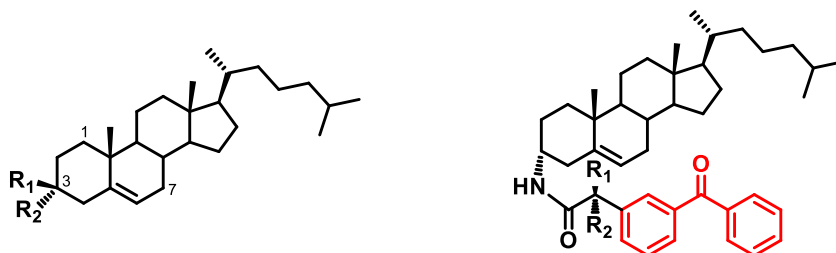


Figura 4.1. Estructuras químicas de los compuestos **NH₂Ch**, **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh**.

4.2. Resultados y discusión

Se ha llevado a cabo la síntesis de los compuestos diastereoisoméricos **(S)** y **(R)-KP-NHCh** a partir de β -Ch, como modelos más rígidos que los correspondientes ésteres previamente estudiados.^{93,94} La ruta sintética consta de 4 etapas, como se puede observar en la Figura 4.2.

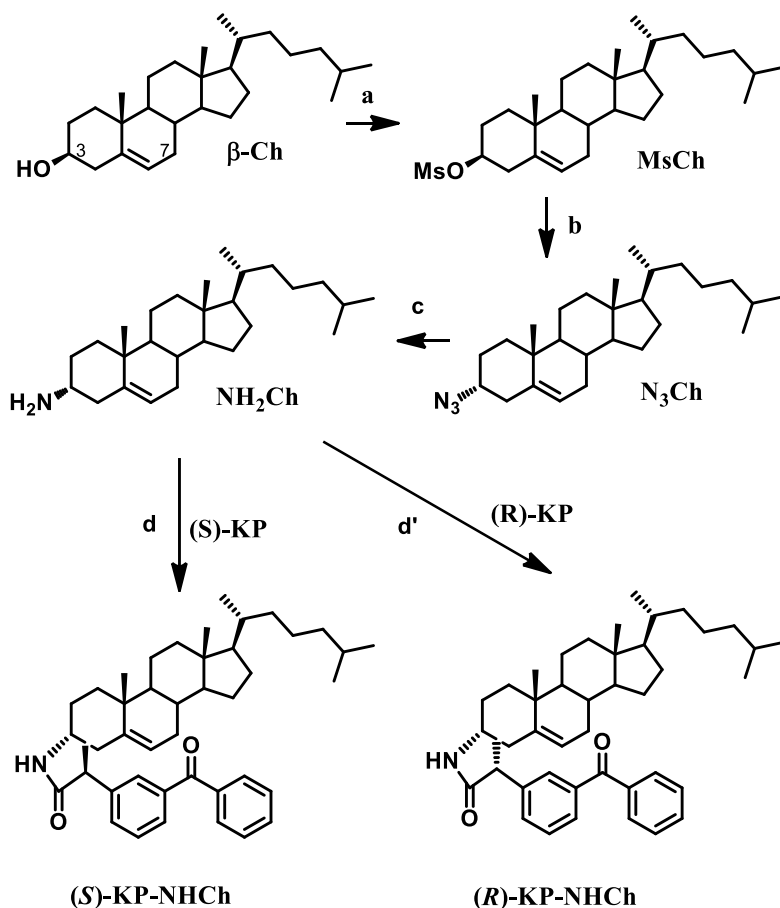


Figura 4.2. Síntesis de (S) y (R)-KP-NHCh: a) MsCl, piridina b) NaN₃, DMF c) Ph₃P, THF, H₂O d o d') DMAP, DCC.

En la primera etapa el β -Ch se convirtió en un derivado mesilato (**MsCh**) para luego llevar a cabo una sustitución nucleofílica de tipo S_N2, mediada por azida de sodio (segunda etapa). La S_N2 implica inversión de configuración, proporcionando 3 α -azido-5-colesterol (**N₃Ch**). En la tercera etapa se redujo la azida a amina empleando trifetilfosfina (Ph₃P), obteniéndose **NH₂Ch**. Por último, se llevó a cabo el acoplamiento entre **NH₂Ch** y el (S) o el (R)-KP utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) y

dimetilaminopiridina (DMAP), para dar lugar a las diadas (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh**, respectivamente. Estos compuestos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de ^1H y ^{13}C -RMN, así como por espectrometría de masas. Como se puede observar en la Figura 1, los compuestos (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh** presentan en su estructura química un cromóforo tipo BZF. Ello permitió someter a las amidas (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh** a estudios fotoquímicos y fotofísicos.

En este sentido, se llevaron a cabo experimentos de fotólisis en estado estacionario mediante luz monocromática a 254 nm, en diclorometano (*ca.* 10^{-5} M) y en atmósfera de nitrógeno, para evaluar la fotorreactividad de dichas diadas. Las cinéticas de degradación se monitorizaron mediante espectrofotometría UV, siguiendo la disminución en el máximo de absorción de la BZF a 254 nm. Como se muestra en la Figura 4.3, los cambios en dicha banda de absorción UV fueron consistentes con la reducción del cromóforo BZF. Cabe destacar que la diada (*S*)-**KP-NHCh** se fotolizó más eficientemente que su diastereoisómero (*R*)-**KP-NHCh**.

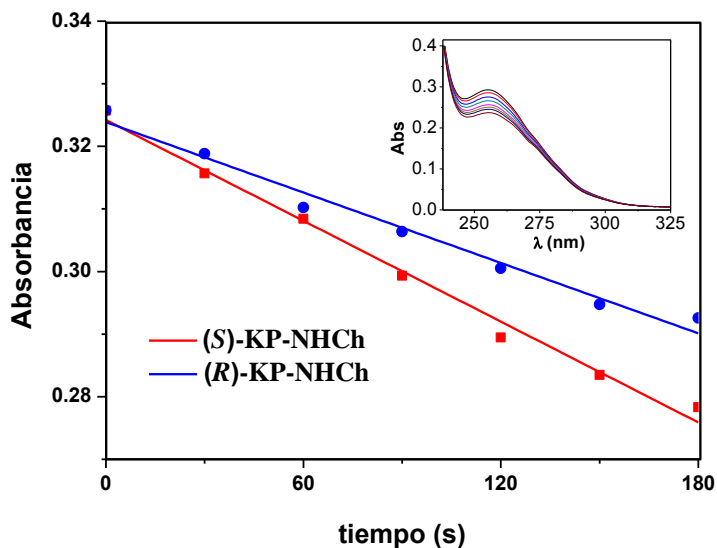


Figura 4.3. Disminución de la absorción a 254 nm para las diadas (S)-KP-NHCh y (R)-KP-NHCh en función del tiempo de irradiación. Gráfica interior: espectro UV de (S)-KP-NHCh en atmósfera de nitrógeno a diferentes tiempos de irradiación a $\lambda_{exc} = 254$ nm.

Cabe esperar que la AH intramolecular en las diadas genere birradicales centrados en el carbono,^{26,93} que pueden recombinar para formar productos de acoplamiento C-C. Teniendo en cuenta esta premisa, se realizaron irradiaciones a escala preparativa de los compuestos (S) y (R)-KP-NHCh en diclorometano para investigar la posible formación de fotoproductos. Éstas se llevaron a cabo en tubos de Pyrex con una lámpara de 400 W de mercurio de media presión. Las fotorreacciones se siguieron por cromatografía en capa fina y RMN. Los crudos de fotorreacción obtenidos se sometieron a purificación mediante cromatografía en columna de sílice, usando como eluyente hexano/acetato de etilo/diclorometano (70:20:10 v/v/v). El análisis de los

espectros de las diferentes fracciones obtenidas reveló la formación de cuatro fotoproductos diastereoisoméricos **4a-d**, dos para cada diada. La elucidación estructural de los compuestos **4a-d** se hizo en base a RMN (^1H y ^{13}C) y espectrometría de masas. Su formación resulta de la AH intramolecular desde la posición alílica 7 del Ch, por el estado excitado triplete del KP, y posterior acoplamiento C-C del birradical generado, como se muestra en la Figura 4.4. Este comportamiento permite confirmar la participación de un mecanismo radicalario en la formación de los fotoproductos obtenidos, evidenciando que el mecanismo implicado en este proceso es de Tipo I.

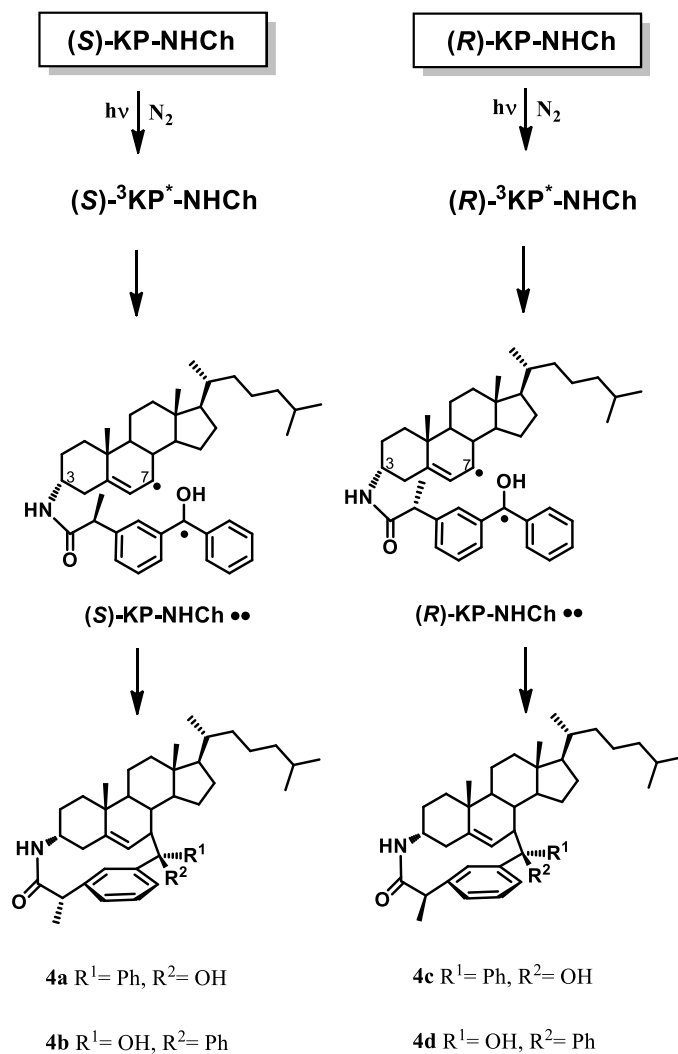
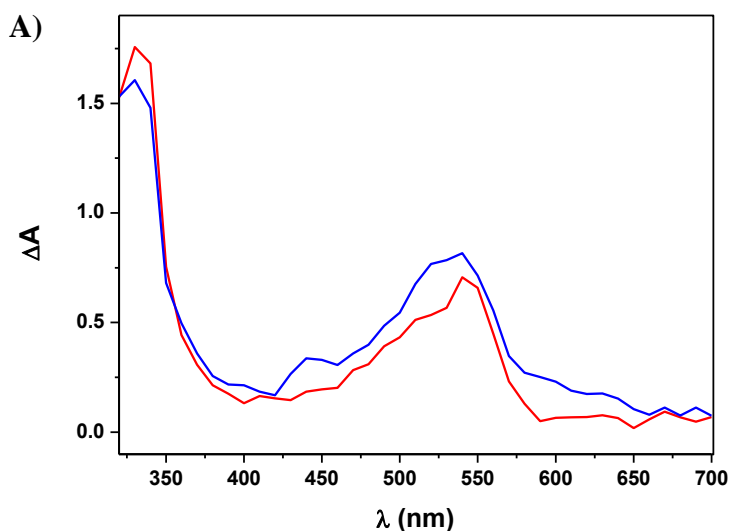


Figura 4.4. Formación de los productos **4a-d** tras la irradiación a escala preparativa de las diadas **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh**.

Además, para obtener una prueba experimental directa que confirme el mecanismo de AH intramolecular propuesto, las diadas **(S)** y **(R)-KP-NHCh** se sometieron a estudios de fotólisis de destello láser. Así, disoluciones en diclorometano, de cada una de ellas por separado y burbujeadas con N₂, fueron excitadas a 355 nm mediante un láser

pulsado Nd:YAG. Los espectros de absorción transitoria de (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh** obtenidos 200 ns después del pulso de láser correspondieron a la combinación de dos especies: un estado excitado triplete (absorción triplete-triplete del cromóforo BZF) con máximos a *ca.* 325 y 525 nm y un birradical cetilo-alilo con máximos a *ca.* 330 y 545 nm. Ambas especies se desactivaron eficientemente en presencia de oxígeno. Como se muestra en la Figura 4.5A, la diada (*S*)-**KP-NHCh** (línea roja) muestra una contribución del birradical ligeramente superior en comparación con la diada (*R*)-**KP-NHCh** (línea azul).



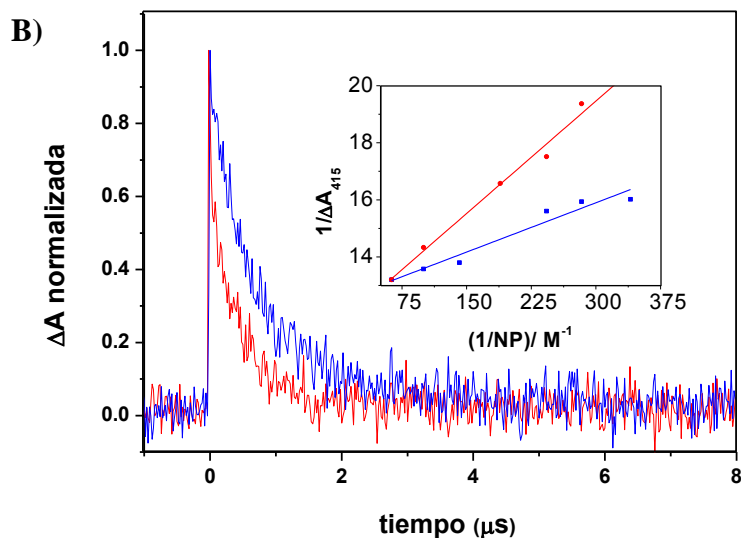


Figura 4.5. A) Espectros de absorción transitoria obtenidos *ca.* 0.2 μs después del pulso láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm) para **(S)-KP-NHCh** (rojo) y **(R)-KP-NHCh** (azul). B) Cinética de desaparición normalizada de las especies transitorias generadas a partir de **(S)-KP-NHCh** (rojo) y **(R)-KP-NHCh** (azul) monitorizada a 525 nm. Gráfica interior: doble recíproco para la desactivación del estado triplete excitado de las diadas **(S)-KP-NHCh** (rojo) y **(R)-KP-NHCh** (azul) por naftaleno (NP) en CH_2Cl_2 .

El análisis cinético de la desaparición de las señales (Figura 4.5B), utilizando una función biexponencial, permitió determinar los tiempos de vida del triplete y del birradical. Los tiempos de vida del triplete fueron muy cortos (escala de tiempo en ns), mientras que los birradicales generados presentaron un tiempo de vida más largo (0.5 y 0.8 μs para **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh**, respectivamente). Como consecuencia de la superposición espectral de los tripletes y los birradicales, no fue posible conseguir valores precisos de tiempos de vida del triplete mediante observación directa de la absorción T-T de ambas

diadas. Por tanto, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, se realizaron experimentos adicionales de FDL ($\lambda_{exc} = 355$ nm) con soluciones de (**S**) y (**R**)-**KP-NHCh** en diclorometano, utilizando el método de transferencia de energía, empleando NP como aceptor.¹⁰⁸

Los parámetros de Stern-Volmer ($k_q \times \tau_i$) obtenidos aplicando la ecuación (1) (ver capítulo anterior) fueron 440 M^{-1} y 1072 M^{-1} para (**S**)-**KP-NHCh** y (**R**)-**KP-NHCh**, respectivamente. Además, asumiendo que la k_q intermolecular determinada para el (**S**)-**KP** en diclorometano ($8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) fue la misma para ambas diadas, los tiempos de vida de triplete obtenidos fueron de 55 ns para (**S**)-**KP-NHCh** y 134 ns para (**R**)-**KP-NHCh**, respectivamente. Los valores obtenidos se usaron para determinar las constantes de velocidad para el proceso intramolecular (k_{iq}) por medio de la ecuación (2) (ver capítulo anterior), y resultaron ser $1.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ para (**S**)-**KP-NHCh** frente a $6.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ para (**R**)-**KP-NHCh**.

Desde un punto de vista cualitativo, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la fotólisis en estado estacionario, confirmando que las diadas (**S**) y (**R**)-**KP-NHCh** presentan una importante estereodiferenciación en el proceso de AH intramolecular.

Por otra parte, como se indicó en la introducción, el sitio preferido para la AH en el Ch es el átomo de carbono en la posición 7. La energía de disociación del correspondiente enlace C-H es de 88 kcal/mol.¹⁰⁷ En comparación, los valores de energía de disociación de los enlaces C-H de los grupos α -metileno en los AGPI son menores. Para ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados dichos valores son de 85 y 75 kcal/mol, respectivamente. Por lo tanto, desde un punto de vista

puramente termodinámico, la AH del Ch es menos favorable. Sin embargo, el Ch en las membranas celulares es más propenso a la oxidación que los AGPI.¹⁰⁹ Esto puede ser debido a que el entorno de la membrana es muy complejo y hace que los factores entrópicos jueguen un papel muy importante. Con el fin de evaluar cómo influye la topología en la AH de Ch, se realizaron experimentos de CIDNP intermoleculares entre la BZF y el Ch en disoluciones deuteradas de diclorometano y benceno. Aunque se empleó un amplio rango de concentraciones, no se observó polarización CIDNP en ningún caso.

Por el contrario, las diadas (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh** mostraron importantes polarizaciones CIDNP. Así, en las Figuras 4.6 y 4.7 se muestran los espectros de RMN y CIDNP de (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh** junto con las asignaciones de las señales correspondientes a los protones más importantes. Las asignaciones se basan en los espectros de RMN de los fotoproductos aislados **4a-d**.

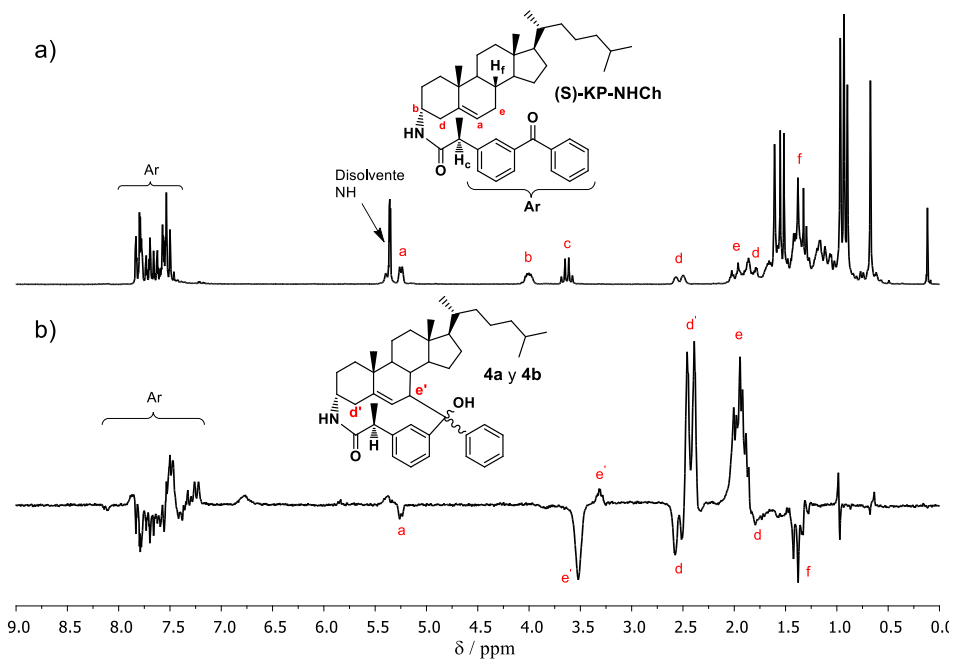


Figura 4.6. Espectros RMN (a) y CIDNP (b) de *(S)*-KP-NHCh registrados 2 μs después del pulso del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) en CD₂Cl₂.

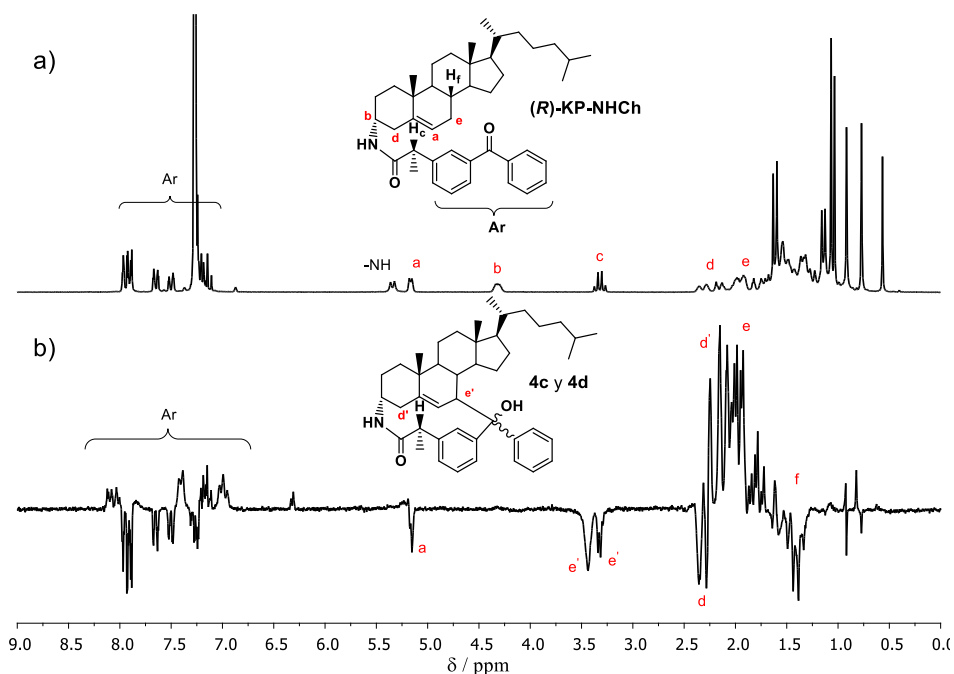


Figura 4.7. Espectros RMN (a) y CIDNP (b) de **(R)-KP-NHCh** registrados 2 μ s después del pulso del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm) en C_6D_6 .

En los espectros CIDNP de **(S)** y **(R)-KP-NHCh**, las transiciones de RMN están polarizadas en ambas direcciones, positiva (absorción) y negativa (emisión). Además de las polarizaciones de **(S)** y **(R)-KP-NHCh**, sólo se encontraron pocas señales de productos adicionales. La Tabla 4.1 muestra los desplazamientos químicos de todas las señales de RMN de las diadas **(S)** y **(R)-KP-NHCh**, junto con el tipo de polarización en los espectros CIDNP.

Tabla 4.1. Parámetros de RMN y CIDNP de las diadas (*S*)-KP-NHCh y (*R*)-KP-NHCh y sus asignaciones obtenidas aplicando las reglas de Kaptein.

Protón	Desplazamiento químico ppm	Signo de polarización CIDNP	Signo de <i>hfc</i> en el radical libre	$\Gamma = a \times \Delta g \times \mu \times \epsilon$
Diada				
(<i>S</i>)-KP-NHCh				
(CD₂Cl₂)				
H _a	5.24	-	+	- = +---
H _b	3.99	No polarizado		
H _c	3.63	No polarizado		
H _d	2.54	-	+	- = +---
H _e	1.95	+	-	+ = ----
H _f	1.37	-	+	- = +---
Señales nuevas				
H _e (1)	3.52	-	-	- = ---+
H _e (2)	3.31	+	-	+ = ----
H _d '	2.42	+	+	+ = +-+-
Diada				
(<i>R</i>)-KP-NHCh				
(C₆D₆)				
H _a	5.16	-	+	- = +---
H _b	4.31	No polarizado		
H _c	3.32	No polarizado		
H _d	2.32	-	+	- = +---
H _e	1.91	+	-	+ = ----
H _f				
Señales nuevas				
H _e (1)	3.43	-	-	- = ---+
H _e (2)	3.32	-	-	- = ---+
H _d '	2.18	+	+	+ = +-+-

El conocimiento de los valores y signos de las constantes de acoplamiento hiperfino (*hfc*s) es crucial para interpretar los espectros de CIDNP. Por tanto, teniendo en cuenta que los métodos DFT no permiten calcular las *hfc*s en birradicales, se realizaron cálculos B3LYP/TZVP DFT^{110,111} de las *hfc*s en **(S)-KP-NHCh••** y **(R)-KP-NHCh••** considerando la superposición de los mono-radicales **A** (de tipo Ch) y **B** (de tipo BZF). Además, con el fin de facilitar los cálculos, las cadenas alquílicas no se consideraron. Como punto de partida para el cálculo de los radicales libres, se utilizaron las estructuras optimizadas B3LYP/TZVP de **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh** (Figura 4.8). Es importante resaltar que la distancia entre el oxígeno carbonílico y uno de los protones alílicos en 7 de las diadas **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh** era sólo *ca.* 2.6 Å.

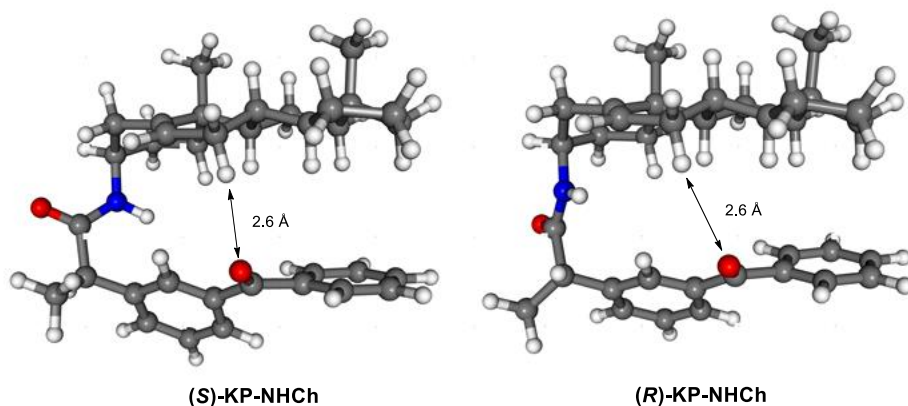


Figura 4.8. Geometrías calculadas (B3LYP/TZVP) de **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh**.

En la Figura 4.9 se muestran las geometrías y las *hfc*s (más grandes que 1 G) de los radicales **A** y **B** (para **(S)-KP-NHCh**) y **C** y **D** (para **(R)-KP-NHCh**). Las *hfc*s más prominentes de los radicales **A-D**

pertenecen a los protones H_f (24.3 G), H_e (-15.6 G) y H_d (13.6 G, promedio de dos valores). Las geometrías de los radicales libres **A-D** no eran muy diferentes de las de (*S*)-KP-NHCh y (*R*)-KP-NHCh.

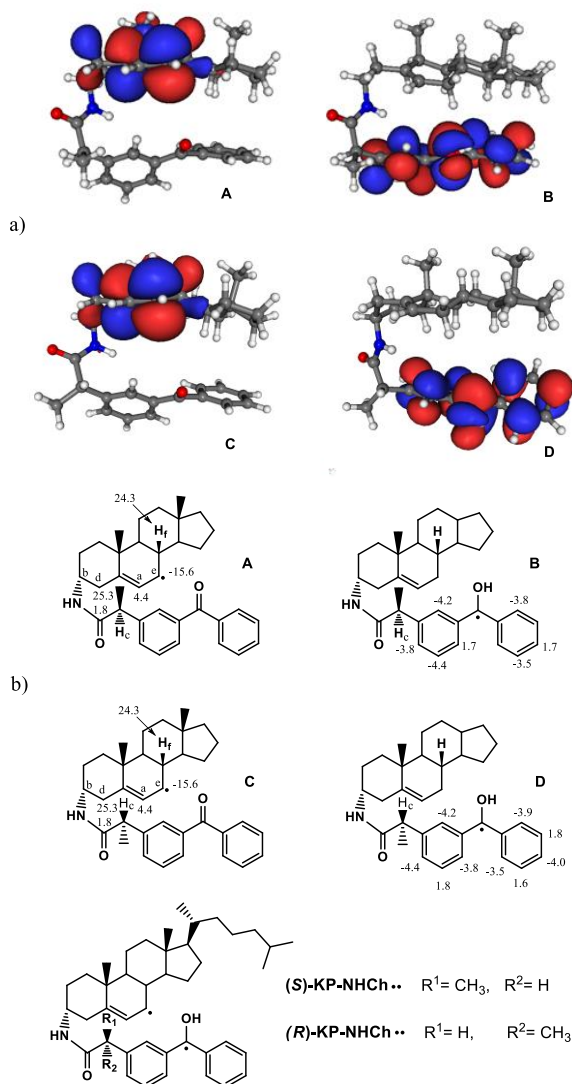


Figura 4.9. Visualización (a) de los orbitales moleculares ocupados por un sólo electron (SOMO) y *hfcs* calculados (B3LYP/TZVP) de los radicales **A-D**, que se usaron para predecir los *hfcs* en los birradicales (*S*)-KP-NHCh $\bullet\bullet$ y (*R*)-KP-NHCh $\bullet\bullet$ (b).

Los espectros ^1H CIDNP de las diadas (*S*)-**KP-NHCh** y (*R*)-**KP-NHCh** indican claramente la formación de un birradical, que se genera a través de una transferencia de hidrógeno intramolecular del aminocolesterol al cromóforo BZF. Esta transferencia de hidrógeno es parcialmente reversible y por tanto da lugar a resonancias CIDNP polarizadas de (*S*)-**KP-NHCh** y (*R*)-**KP-NHCh**. Los valores de las polarizaciones CIDNP están plenamente de acuerdo con las *hfcs* calculados (Figura 4.9). En los birradicales (*S*)-**KP-NHCh••** y (*R*)-**KP-NHCh••**, los protones que poseen valores significativos de *hfcs* son: H_a , H_d , H_e , H_f y los aromáticos. Las señales de estos protones estaban mucho más polarizadas en los espectros CIDNP. Esto concuerda con la teoría CIDNP y obedece la regla de Kaptein para una polarización neta.¹¹² Así, protones con polarizaciones opuestas poseen signos opuestos de *hfcs* (Tabla 4.1).

Después de la AH intramolecular, son dos las reacciones que pueden ocurrir: a) la transferencia inversa de hidrógeno, a través de la cual se regeneran las diadas de partida (*S*)-**KP-NHCh** y (*R*)-**KP-NHCh** y b) la ciclación radicalaria entre el carbono C_7 del aminocolesteno y el carbono carbonílico de la porción BZF, que conduce a la formación de los fotoproductos **4a-d**. La segunda reacción se confirma por la presencia en cada espectro CIDNP de tres multipletes polarizados asignados a los protones H_d y H_e de los dos pares de diastereoisómeros. Asumiendo que los factores *g* de las porciones BZF de los birradicales (*S*)-**KP-NHCh••** y (*R*)-**KP-NHCh••** son más grandes que los de las partes NH_2Ch ,¹¹³ podemos afirmar que la transferencia inversa de hidrógeno es una reacción de “caja” y la ciclación radicalaria una reacción de “escape”. Esto

concuera con la polarización positiva de H_{α} (2.18 ppm) y la negativa de H_{β} (3.43 y 3.32 ppm) en **(R)-KP-NHCh** (los signos de las polarizaciones aplicando las reglas de Kaptein se muestran en la Tabla 4.1). Sin embargo, en el espectro CIDNP de **(S)-KP-NHCh**, H_{β} está polarizado positivamente, sugiriendo así que uno de los dos diastereoisómeros **4a** o **4b** se forma directamente desde el estado triplete del birradical **(S)-KP-NHCh••**.

Como se mencionó anteriormente, una mezcla de Ch y BZF no mostró una reactividad significativa en experimentos CIDNP, mientras que las diadas **(S)** y **(R)-KP-NHCh** reaccionaron de manera muy eficiente. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos anteriormente mediante experimentos de fotólisis en estado estacionario y FDL. Para la versión intermolecular entre BZF y Ch se ha demostrado previamente¹¹⁴ que en disolventes dadores de hidrógeno (diclorometano, dioxano, metanol) el principal proceso es la AH a partir del disolvente. Sin embargo, incluso en acetonitrilo, que tiene baja capacidad de donar hidrógeno, la reacción bimolecular del estado excitado triplete de BZF con Ch es mucho menos eficiente que en diadas que contienen la BZF unida covalentemente al Ch. Los rendimientos cuánticos de los birradicales en estas diadas, producidos a través de AH intramolecular, oscilaban entre 0.65 y 0.80 dependiendo del disolvente. Estos valores son mucho más elevados que el obtenido para la reacción intermolecular (rendimiento cuántico del radical cetilo entre 0 y 0.14). En las diadas **(S)** y **(R)-KP-NHCh**, que son similares a las estudiadas anteriormente, la distancia entre el oxígeno del carbonilo y el hidrógeno alílico en C7 es sólo de 2.6 Å (Figura 4.8) en sus conformaciones mínimas en el estado

fundamental. Es muy probable que esta corta distancia y orientación precisa determinan una alta reactividad de las díadas (*S*) y (*R*)-**KP-NHCh**, en comparación con la reacción bimolecular entre Ch y BZF. Estos mismos factores topológicos pueden jugar un papel importante en las membranas celulares, donde el Ch es más propenso a la oxidación que los AGPI circundantes.

4.3. Conclusiones

La fotorreacción entre BZF y el aminocolesteno, unidos covalentemente en las díadas (*S*)-**KP-NHCh** y (*R*)-**KP-NHCh**, procede principalmente *via* AH intramolecular. La reacción análoga (bimolecular) en mezclas Ch/BZF es menos eficiente. Esto indica que la orientación específica de los reactivos es decisiva para la reacción de AH. Debido a que muchos esteroides se caracterizan por tener una cierta orientación en las membranas, tales reacciones controladas topológicamente podrían resultar esenciales en la naturaleza. Los resultados descritos ilustran también la importancia de los factores entrópicos en las reacciones radicalarias.

4.4. Procedimiento experimental

4.4.1. General

Todos los productos químicos y los disolventes empleados fueron disponibles comercialmente y se utilizaron sin purificación adicional.

4.4.2. Síntesis de 3 α -amino-5-colesteno (NH₂Ch)

A una solución enfriada (0 °C) de β -Ch (500 mg, 1.30 mmol) en piridina anhidra (5 ml), se le añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (MsCl, 0,21 ml, 2.60 mmol) en atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Después de este tiempo, se añadió HCl acuoso 6 M (100 mL) a la solución, y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con HCl 1M (10 mL) y salmuera (2 x 5 mL), se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El producto metanosulfonato colest-5-en-3 β -ol (**MsCh**) resultante se utilizó directamente en la siguiente reacción sin purificación adicional. Sus señales de ¹H RMN coinciden con las descritas anteriormente.¹¹⁵

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.70 (s, 3H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.95-2.10 (señal compleja, 26H), 2.53 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 4.54 (m, 1H), 5.44 (m, 1H).

Una solución de MsCh (560 mg, 1.20 mmol) y azida sódica (NaN₃, 130 mg, 2 mmol) en dimetilformamida (DMF, 10 mL) se calentó a reflujo durante 5 horas en ausencia de luz. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a sequedad. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo 99:1 v/v) para dar 3 α -azido-5-colesteno¹¹⁶ (**N₃Ch**) como un sólido blanco (296 mg, 60%).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.70 (s, 3H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.99-2.08 (señal compleja, 26H), 2.21 (dt, J = 14.7 Hz, 2.4 Hz, 1H), 2.54 (brd, J = 14.7 Hz, 1H) 3.90 (quint, J = 5.7 Hz, 1H), 5.42 (m, 1H).

Posteriormente, trifenilfosfina (Ph_3P , 80 mg, 0.36 mmol) y N_3Ch (100 mg, 0.24 mmol) se disolvieron en una mezcla de tetrahidrofurano (THF, 2 mL) y agua (0.03 mL). La mezcla resultante se agitó a 50 ° C durante 8 horas. A continuación, se añadió una solución metanólica de HCl al 5% (15 mL), y se obtuvo un precipitado blanco, que se lavó con éter etílico (20 mL) y se filtró a través de una capa de Celite® para formar el clorhidrato de 3 α -amino-5-colesteno¹¹⁷ (**NH₂Ch**) (87 mg, 86 %).

^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ = 0.75 (s, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.01-2.19 (señal compleja, 27H), 2.80 (brd, J = 15.6 Hz, 1H), 3.54 (m, 1H), 5.54 (m, 1H); ^{13}C -RMN (300 MHz, MeOD) δ = 12.3, 19.2, 19.3, 21.9, 23.0, 23.2, 25.0, 25.3, 25.6, 29.2, 29.3, 33.0, 33.4, 36.2, 37.1, 37.4, 38.3, 40.7, 41.1, 43.5, 51.1, 57.6, 58.1, 126.9, 136.9.

4.4.3. Síntesis de las diadas (*S*)-KP-NHCh y (*R*)-KP-NHCh

A una disolución de (*S*) o (*R*)-KP (200 mg, 0.78 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL), se añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC, 295 mg, 1.42 mmol) en pequeñas porciones, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron una solución de **NH₂Ch** (295 mg, 0.71 mmol) en CH_2Cl_2 (7 mL) y de 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 102 mg, 0.85 mmol), y la mezcla se mantuvo en agitación durante 8 horas más a la

misma temperatura. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de Celite®. El filtrado resultante se lavó con salmuera y agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de diclorometano-acetato de 90:5:5 v/v/v) obteniéndose (**S**)-**KP-NHCh** (342 mg, 77%) y (**R**)-**KP-NHCh** (348 mg, 79%).

Diada (S)-KP-NHCh. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.55 (s, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.85 (s, 3H), 1.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.88-1.60 (señal compleja, 22H), 1.61-1.81 (m, 4H), 1.88 (dt, *J*₁ = 12.3 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H), 2.41 (*broad* d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.55 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 5.10 (*broad* d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 - 7.72 (m, 9H); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.8, 17.9, 18.7, 18.8, 20.7, 22.6, 22.9, 23.8, 24.2, 25.8, 28.1, 28.2, 31.7, 31.8, 34.3, 35.8, 36.2, 37.1, 37.2, 39.5, 39.6, 42.2, 45.7, 47.0, 50.5, 56.1, 56.6, 123.7, 128.4, 128.7, 129.2, 130.0, 131.8, 132.6, 137.4, 138.0, 138.7, 142.2, 172.4, 196.0. Masa exacta: encontrado *m/z* 622.4606, (calculado para C₄₃H₆₀NO₂ (MH⁺): 622.4624).

Diada (R)-KP-NHCh. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.56 (s, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.86 (s, 3H), 1.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.88-1.60 (señal compleja, 22H), 1.61-1.83 (m, 4H), 1.90 (dt, *J*₁ = 12.3 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H), 2.38 (*broad* d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.56 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 5.01 (*broad* d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.72 (m, 9H); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.8, 18.0, 18.7, 18.8, 20.7, 22.6, 22.9, 23.8, 24.2, 25.6, 28.0, 28.2, 31.7, 31.8, 34.4, 35.7, 36.2, 37.1, 37.2, 39.5, 39.6, 42.2, 45.6, 47.2, 50.6, 53.5, 56.1, 56.6, 123.6, 128.3, 128.7, 129.2,

130.0, 131.7, 132.5, 137.4, 137.9, 138.6, 141.8, 172.6, 196.1. Masa exacta: encontrado m/z 622.4603, (calculado para $C_{43}H_{60}NO_2$ (MH^+): 622.4624).

4.4.4. Medidas de fotólisis en estado estacionario

Se irradiaron disoluciones de (*S*)-**KP-NHCh** o (*R*)-**KP-NHCh** (100 mg, 0.16 mmol) en diclorometano anhidro (40 mL) durante 8 horas a través de Pyrex con una lámpara de mercurio de media presión de 400 W. Después de este tiempo, las mezclas de reacción se concentraron a presión reducida y se sometieron a cromatografía en columna de gel de sílice, usando hexano/acetato de etilo/diclorometano (70:20:10 v/v/v) como eluyente, proporcionando los fotoproductos puros **4a-d**.

Fotoproducto 4a (21 %). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 0.52 (s, 3H), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.88 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.48 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 0.52-2.00 (señal compleja, 24H), 2.19 (m, 1H), 2.29 (*brd*, J = 13.8 Hz 1H), 3.44 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 5.27 (m, 2H), 6.60 (m, 1H), 7.14-7.41 (m, 7H), 7.79 (m, 1H); ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 10.8, 18.3, 19.0, 20.1, 22.6, 22.9, 24.0, 25.4, 27.4, 28.1, 28.2, 34.0, 36.0, 36.3, 38.1, 38.5, 38.6, 39.0, 39.6, 42.8, 45.7, 46.9, 47.0, 50.5, 55.6, 83.5, 123.6, 127.1, 127.5, 127.6, 127.7, 128.6, 133.0, 138.3, 141.8, 141.9, 145.7, 149.0, 174.4. Masa exacta: encontrado m/z 622.4631, (calculado para $C_{43}H_{60}NO_2$ (MH^+): 622.4624).

Fotoproducto 4b (43 %). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 0.01 (m, 1 H), 0.50 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.64 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.60-2.00 (señal compleja, 27 H), 2.10 (dt, J = 13.2 Hz, 2.7 Hz, 1H), 2.50 (*brd*, J = 13.2 Hz, 1H), 3.31 (m, 1H),

3.76 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.89 (m, 1H), 5.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.10 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.32-7.50 (m, 5H), 7.85 (*br s*, 1H), 7.94 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.12 (*brd*, $J = 8.4$ Hz, 2H); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 11.6, 13.2, 17.6, 19.0, 19.5, 22.6, 22.8, 23.9, 25.4, 26.7, 27.9, 28.2, 34.1, 35.8, 36.1, 37.6, 37.7, 37.9, 39.0, 39.1, 39.4, 43.2, 45.7, 46.2, 49.8, 51.0, 54.6, 81.9, 123.7, 126.7, 127.1, 127.9, 128.0, 128.3, 130.9, 132.1, 141.5, 141.6, 142.1, 145.3, 172.3$. Masa exacta: encontrado m/z 622.4621, (calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{NO}_2$ (MH^+): 622.4624).

Fotoproducto 4c (15 %). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 0.52$ (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.90-2.00 (señal compleja, 27H), 2.13 (m, 1H), 2.23 (*brd* $J = 14.1$ Hz, 1H), 3.41 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 5.22 (m, 2H), 6.56 (m, 1H), 7.07 (*brd*, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.20-7.40 (m, 6H), 7.76 (m, 1H); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 10.9, 18.5, 19.0, 20.1, 22.6, 22.9, 24.0, 25.8, 27.4, 28.1, 28.2, 31.0, 33.8, 36.0, 36.3, 37.5, 37.8, 38.5, 38.8, 39.6, 42.8, 45.8, 47.1, 50.5, 55.6, 83.5, 126.7, 127.0, 127.5, 127.7, 128.6, 131.0, 140.3, 145.7, 148.8, 148.9, 174.2$. Masa exacta: encontrado m/z 622.4648, (calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{NO}_2$ (MH^+): 622.4624).

Fotoproducto 4d (54 %). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 0.01$ (m, 1H), 0.40 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.58 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.50-2.10 (señal compleja, 27 H), 2.06 (dt, $J = 13.5$ Hz, 2.7 Hz, 1H), 2.37 (*brd*, $J = 13.5$ Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 3.55 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 5.74 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.02 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.14 (*brd*, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.23-7.36 (m, 4H), 7.84 (*br s*, 1H), 7.85 (m, 1H), 8.03 (*br*, $J = 8.4$ Hz, 2H); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 11.7, 17.7, 17.9, 19.0, 19.4, 22.6, 22.8, 24.0, 26.1, 26.8, 27.9,$

28.2, 34.2, 35.8, 36.1, 37.5, 37.6, 37.8, 38.6, 39.3, 39.5, 43.3, 45.3, 49.0, 49.8, 50.9, 54.6, 82.1, 126.5, 127.4, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 130.9, 141.5, 142.1, 142.8, 145.3, 173.3. Masa exacta: encontrado m/z 622.4629, (calculado para $C_{43}H_{60}NO_2$ (MH^+): 622.4624).

4.4.5 Medidas de fotólisis de destello láser (FDL)

Se realizaron estudios de FDL usando como fuente de excitación un láser Nd: YAG ($\lambda_{exc} = 355$ nm, aproximadamente 10 ns del pulso láser, 10 mJ / pulso). Las muestras se disolvieron en diclorometano para tener una absorbancia *ca.* 0.30 a 355 nm, y las soluciones se purgaron por burbujeo de nitrógeno.

Se determinaron los tiempos de vida del estado excitado triplete de las diadas **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh** en diclorometano mediante una reacción de transferencia de energía al NP, teniendo en cuenta que el NP no absorbe a 355 nm y por tanto más del 99% de la luz fue absorbida por las diadas. Para ello, se prepararon disoluciones de **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh** (0.5 mM) con cantidades crecientes del desactivador (0.2 mM - 20 mM). Las constantes de velocidad de la desactivación del estado excitado triplete por NP se determinaron mediante la ecuación de Stern-Volmer ($1/\tau = 1/\tau_0 + k$ [desactivador]).⁹⁴

4.4.6 Estudios de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP).

Los experimentos de CIDNP se realizaron empleando disoluciones de **(S)-KP-NHCh** y **(R)-KP-NHCh** (0.01 M) en CD_2Cl_2 y C_6D_6 . Las *hfc*s de los radicales libres se calcularon utilizando el software

Gaussian 03 package. Todos los cálculos (optimizaciones geométricas y cálculo de un sólo punto) se llevaron a cabo usando el método B3LYP/TVZP.^{110,111,118}

**Capítulo 5. Fotogeneración de birradical vs oxígeno
singlete en sistemas suprofeno-colesterol**

5.1. Introducción

Como se ha mencionado en la introducción general, la naturaleza electrónica del estado excitado triplete presenta una fuerte influencia en el proceso de fotosensibilización en sistemas en los que arilcetonas están unidas covalentemente al Ch. En estudios anteriores se ha demostrado que los sistemas KP- α -Ch (caracterizados por un estado excitado triplete $n\pi^*$ de la BZF) son apropiados para generar birradicales por AH intramolecular desde la posición alílica en C-7 del Ch,^{93,119} mientras que los análogos de TPA- α -Ch (con un cromóforo BZT, de naturaleza $\pi\pi^*$) no son reactivos *via* AH, pero sí generan oxígeno singlete de manera eficiente.⁹⁴

El suprofeno (SP) es también un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, que contiene un cromóforo BZT. La única diferencia estructural entre SP y TPA es el sitio de unión de la cadena lateral del ácido propiónico (Figura 5.1), que es el benzoilo o el grupo tenoilo, respectivamente.^{46,120} Curiosamente, esta pequeña modificación conduce a una menor diferencia de energía entre los estados T₁ ($\pi\pi^*$) y T₂ ($n\pi^*$) del SP en comparación con el TPA (*ca.* 3 vs 7 kcal / mol, respectivamente).¹²¹ Por lo tanto, considerando que las cetonas con un T₁ de carácter $\pi\pi^*$ reaccionan a través de la población térmica del estado de mayor energía $n\pi^*$, en sistemas que incluyen el SP, podrían estar operando procesos de AH.

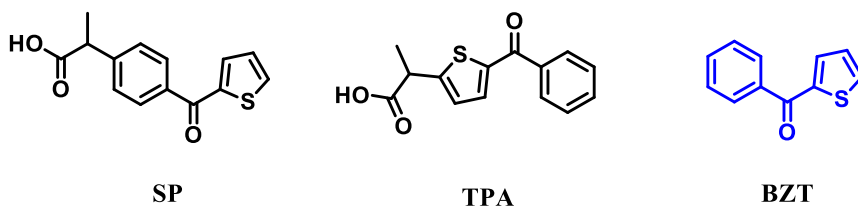


Figura 5.1. Estructuras químicas de suprofen (SP), ácido tiaprofenico (TPA) y 2-benzoitiofeno (BZT).

Teniendo en cuenta esta premisa, se han preparado las diadas (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch, así como (*S*)-SP- β -Ch (Figura 5.2) con el fin de investigar la posible competencia entre la fotogeneración de birradicales (proceso de Tipo I) y de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$, proceso de Tipo II), es decir los mecanismos claves en la fotooxidación del Ch.

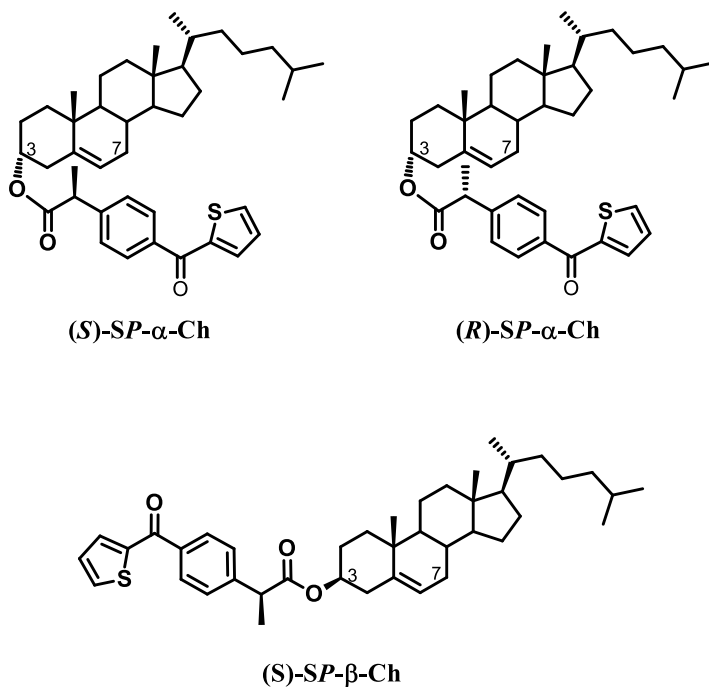


Figura 5.2. Estructuras químicas de las diadas (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch y (*S*)-SP- β -Ch.

5.2. Resultados y discusión

Se han sintetizado las diadas (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch y (*S*)-SP- β -Ch a partir del β - o α -Ch y SP (Figura 5.3).

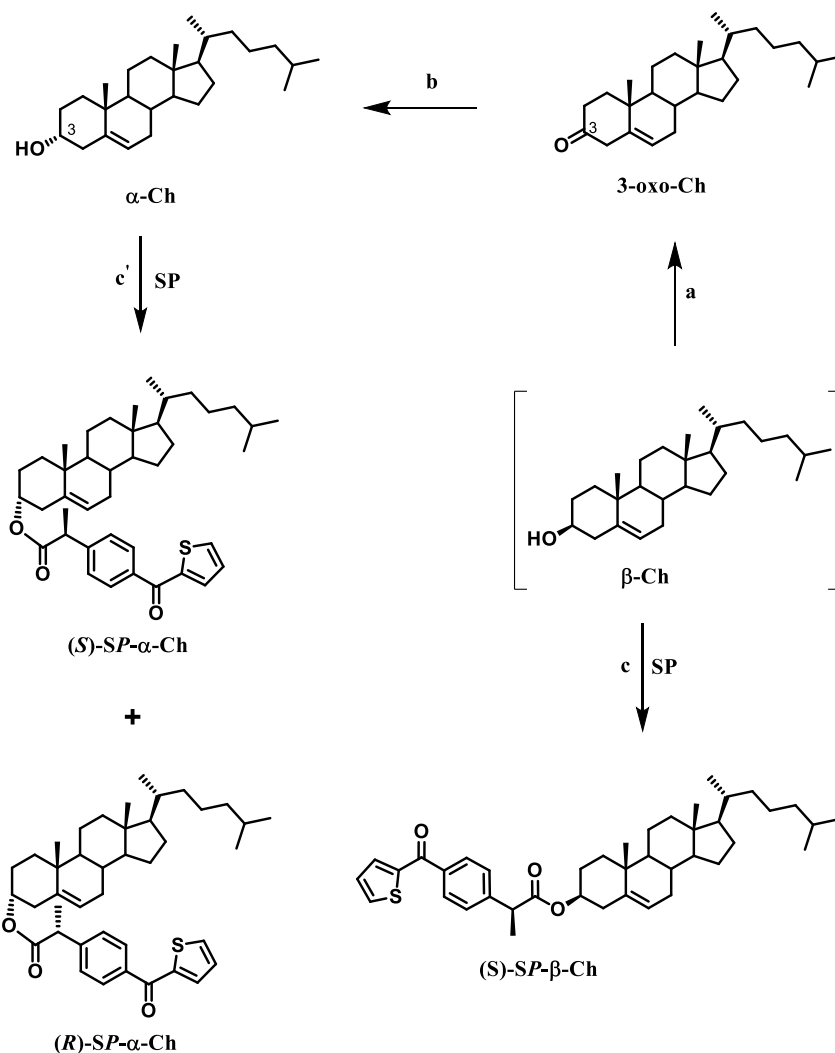
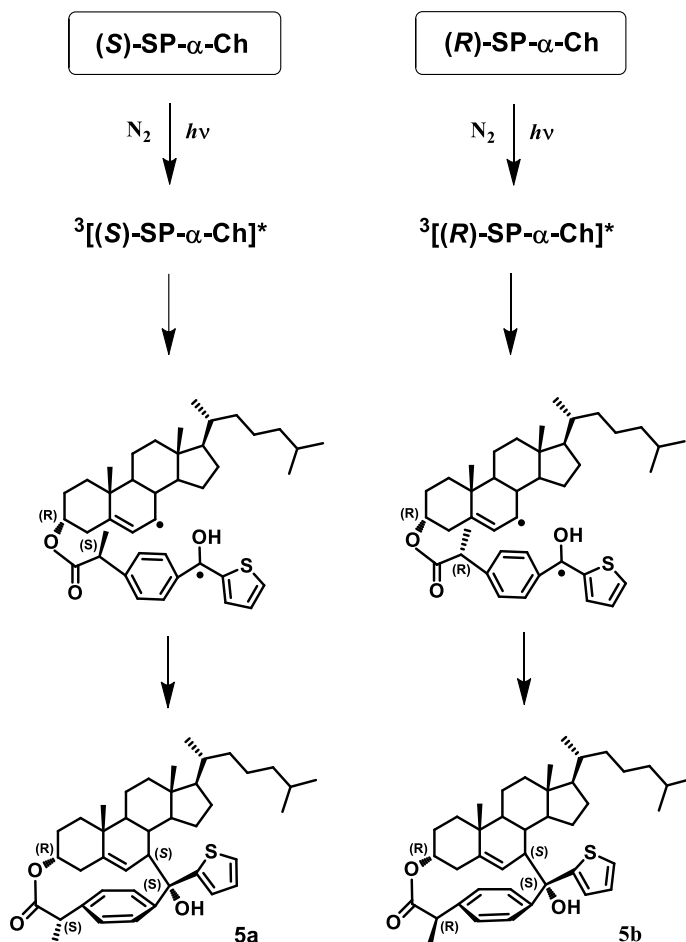


Figura 5.3. Síntesis de (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch y (*S*)-SP- β -Ch : a) cloruro de oxalilo, Et₃N b) L-selectride c o c') DMAP, DCC.

En primer lugar el β -Ch se oxidó a colesteno (**3-oxo-Ch**) usando cloruro de oxalilo y trietilamina (Et_3N). El β -Ch junto con su diastereomero α -Ch se regeneró mediante una reducción con *L*-selectride. A partir del α -Ch se llevó a cabo el acoplamiento con el SP utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP) para formar las diadas (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch, que se purificaron mediante cristalización fraccionada usando hexano/acetato de etilo. El éster (*S*)-SP- α -Ch se obtuvo como un sólido blanco, mientras que su diastereoisómero (*R*)-SP- α -Ch se obtuvo como un aceite viscoso tras la eliminación del disolvente en la disolución filtrada. Con el fin de asignar la correcta estereoquímica, muestras auténticas de (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch fueron preparadas mediante esterificación directa de (*R*)- and (*S*)-SP con α -Ch.¹²² Por otra parte, el acoplamiento en las mismas condiciones entre el β -Ch y el SP condujo a la formación de (*S*)-SP- β -Ch. Todas las diadas fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas de ^1H , ^{13}C -RMN, así como por espectrometría de masas.

Con el fin de investigar la formación de fotoproductos, se irradiaron disoluciones de (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch y (*S*)-SP- β -Ch en diclorometano, en tubos de Pyrex y en condiciones anaeróbicas, usando una lámpara de 400 W de mercurio de media presión. Las fotorreacciones fueron monitorizadas por C.C.F. y RMN. Los crudos de fotorreacción obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de sílice, usando como eluyente hexano/acetato de etilo (95:5 v/v). El análisis espectral de las fracciones separadas reveló la formación

de dos fotoproductos diastereoisoméricos **5a** y **5b** a partir de las diadas (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch, respectivamente (Esquema 5.1).



Esquema 5.1. Formación de los productos **5a** y **5b** por fotólisis de las diadas (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch.

Por el contrario, como ocurría en los anteriores sistemas que adoptan una conformación extendida, a partir de la diada (*S*)-SP- β -Ch no se obtuvo ningún fotoproducto. Esto es debido a restricciones

conformacionales que no permiten un acercamiento efectivo entre el cromóforo BZT y el Ch. La formación de los fotoproductos **5a** y **5b** resulta de la AH intramolecular desde la posición C7 del Ch, por el estado excitado triplete del BZT, y posterior acoplamiento C-C de los birradicales generados.

La estructura de los compuestos **5a** y **5b** fue asignada en base a datos espectroscópicos (^1H , ^{13}C , HSQC y NOEDIFF) y espectrometría de masas. Como en casos anteriores, debido a la rigidez del esqueleto del Ch, fueron necesarios experimentos de NOE para asignar la estereoquímica de los nuevos centros quirales generados por fotociclación. En ambos fotoproductos, la interacción más relevante fue entre el protón alílico en el C-7 y los protones del anillo de tiofeno (Figura 5.4).

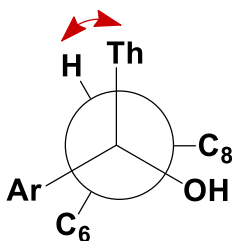


Figura 5.4. Interacciones NOE en los fotoproductos **5a** y **5b**

Una vez aclarada la naturaleza de las reacciones fotoquímicas ocurridas, fue interesante investigar la posible estereodiferenciación en el proceso de AH. Para ello, los compuestos (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch y (*S*)-SP- β -Ch se irradiaron con luz monocromática a 266 nm en diclorometano (*ca.* 10^{-5} M), bajo atmósfera de nitrógeno. Los cambios se monitorizaron mediante espectrofotometría UV-Vis siguiendo la

disminución en el máximo de absorción a 290 nm (gráfica interior de la Figura 5.5), que fue consistente con la reducción del cromóforo BZT.

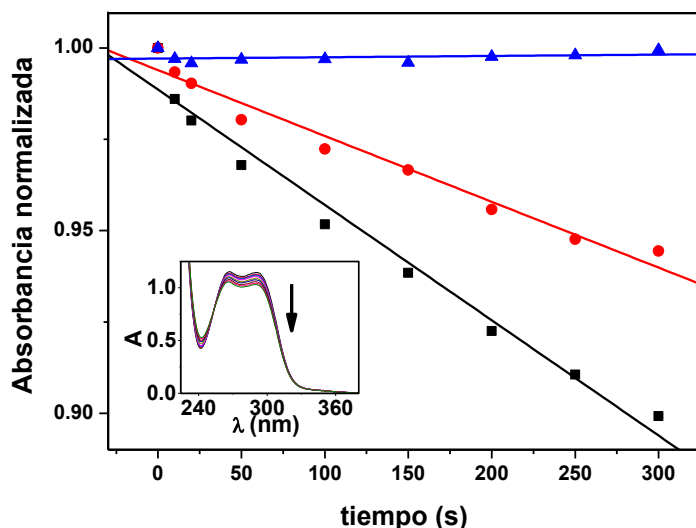


Figura 5.5. Disminución de la absorción a 290 nm de las diadas (*S*)-SP- α -Ch (rojo), (*R*)-SP- α -Ch (negro) y (*S*)-SP- β -Ch (azul) en función del tiempo de irradiación. Gráfica interior: cambios en el espectro de absorción de (*S*)-SP- α -Ch en condiciones anaeróbicas a $\lambda = 254$ nm.

Las diadas (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch se fotolizaron en condiciones anaeróbicas, mientras que la diada (*S*)-SP- β -Ch no reaccionó. Cabe destacar que la diada (*S*)-SP- α -Ch resultó más fotorreactiva que la diada (*R*)-SP- α -Ch, lo que indicó una clara estereodiferenciación en el comportamiento fotoquímico.

Para confirmar que los productos **5a** y **5b** fueron generados mediante un proceso de AH intramolecular, las diadas se sometieron a estudios de fotólisis de destello láser. Los experimentos se llevaron a cabo en diclorometano bajo condiciones anaeróbicas a $\lambda_{\text{max}} = 355$ nm.

Los espectros de absorción transitoria obtenidos para **(S)-SP- α -Ch**, **(R)-SP- α -Ch** y **(S)-SP- β -Ch** (Figura 5.6) fueron todos muy similares al previamente descrito para el estado excitado triplete del SP, con máximos de absorción a *ca.* 350 nm y 600 nm.¹²¹

En el Esquema 5.2 se ilustran las posibles rutas de fotorreacción que dan lugar a la generación de birradicales y ¹O₂ y en la Tabla 1 se proporciona un resumen de los parámetros fotofísicos junto con los valores de referencia de la literatura.¹²³⁻¹²⁵ El análisis cinético de las desapariciones de las señales a 620 nm (gráfica interior de la Figura 5.6) permitió la determinación de los tiempos de vida del triplete (τ_T) que fueron *ca.* 4.1 μ s para **(S)-SP- α -Ch** y **(R)-SP- α -Ch** y 5.8 μ s para **(S)-SP- β -Ch**. A partir de estos datos, las constantes de velocidad de desactivación intramolecular fueron determinadas mediante la ecuación (2) (ver tercer capítulo):

$$k_{iq} = 1/\tau_i - 1/\tau_0$$

donde τ_i se corresponde con el tiempo de vida del compuesto **(S)** o **(R)-SP- α -Ch** y τ_0 es el tiempo de vida de triplete de la diada **(S)-SP- β -Ch**. El valor obtenido para **(S)-SP- α -Ch** y **(R)-SP- α -Ch** fue $0.78 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

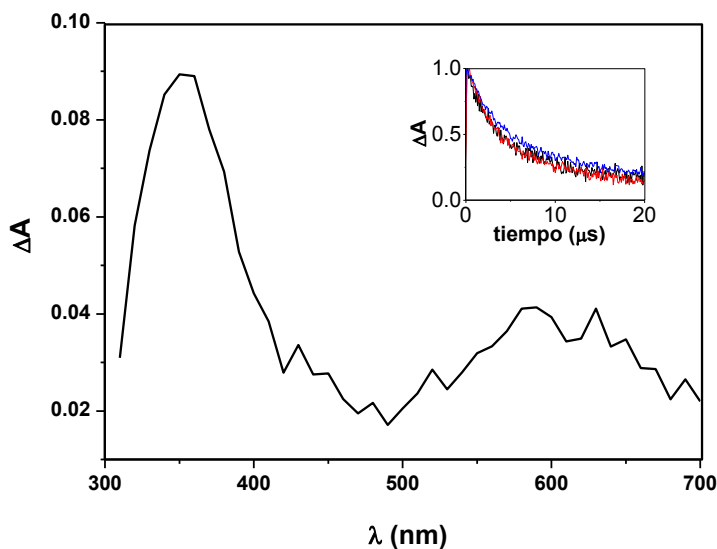
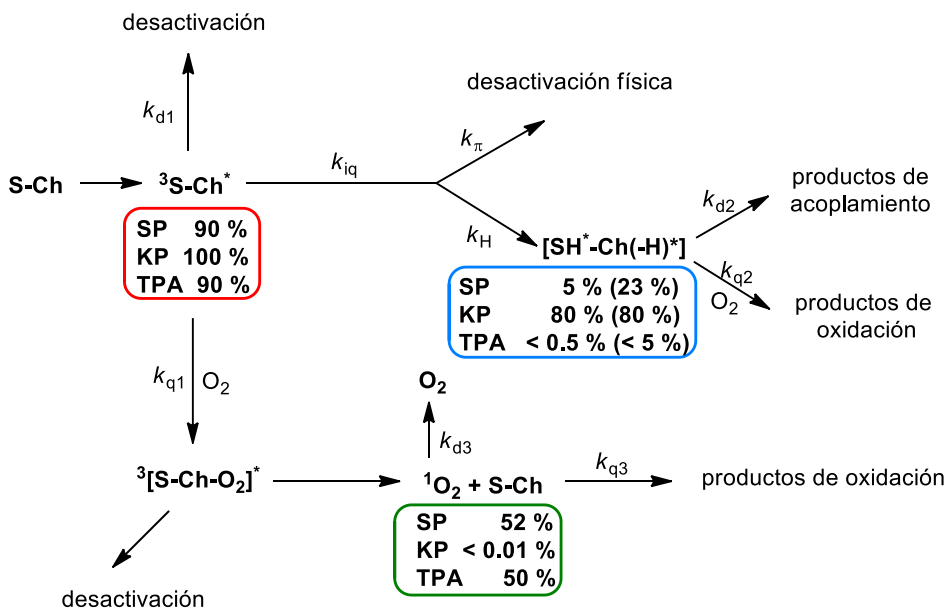


Figura 5.6. Espectros de absorción transitoria para la diada (S)-SP- α -Ch en diclorometano, 1 μ s después del pulso del láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm). Gráfica interior: cinéticas de desaparición normalizadas de los tripletes generados por las diadas (S)-SP- α -Ch (negro), (R)-SP- α -Ch (rojo) y (S)-SP- β -Ch (azul) monitorizadas a 620 nm.

Desafortunadamente, en la escala de tiempo de nanosegundos no fue posible detectar el birradical. Efectivamente, la constante de velocidad de acoplamiento (k_{d2}) debería ser similar a la de KP- α -Ch y por lo tanto mucho más alta que la constante de velocidad de abstracción de hidrógeno (k_H), que por definición es más baja que k_{iq} . Por consiguiente, no se esperaba acumulación de los birradicales, ya que su consumo era mucho más rápido que su formación. Es interesante hacer constar que para los análogos KP- α -Ch ocurre lo contrario, es decir k_{d2} es más baja que k_H (Tabla 5.1). Por tanto, en este caso se observa la acumulación del birradical ya que los productos de acoplamiento se generan mucho más lentamente.



Esquema 5.2. Rutas de fotorreacción que generan las especies birradical y oxígeno singlete del sensibilizador, como SP, KP o TPA, unido covalentemente al Ch. Los porcentajes obtenidos en condiciones anaeróbicas se encuentran entre paréntesis.

Tabla 5.1. Parámetros fotofísicos de las diadas en diclorometano

Parámetros	(S)- o (R)-SP- α -Ch	KP- α -Ch ^(a)
ϕ_{isc}	0.9 ^(b)	1.0 ^(c)
k_{d1} / s^{-1}	1.7×10^5 ^(d)	5.9×10^5
k_{iq} / s^{-1}	7.8×10^4 ^(e)	1.0×10^8
k_H / s^{-1}	6.2×10^4 ^(f)	8.0×10^7
k_{π} / s^{-1}	1.6×10^4 ^(f)	2.0×10^7
$k_{q1} / M^{-1} s^{-1}$	0.4×10^9	0.6×10^9
ϕ_{Δ}	0.52	< 0.01
k_{d2} / s^{-1}	ND ^(g)	5.0×10^6
$k_{q2} / M^{-1} s^{-1}$	ND ^(g)	3.6×10^9
k_{d3} / s^{-1}	1.4×10^4 ^(h)	1.3×10^4
$k_{q3} / M^{-1} s^{-1}$	5.7×10^4 ⁽ⁱ⁾	5.7×10^4 ⁽ⁱ⁾
$\tau_T / \mu s$	4.10	< 0.01

^a valores tomados de la ref. 94

^b valor tomado de la ref. 120

^c valor tomado de la ref. 123

^d $k_{d1} = 1 / \tau_T (S)\text{-SP-}\beta\text{-Ch}$

^e Las constantes de velocidad de desactivación intramolecular se estimaron como $k_{iq} = 1/\tau_1 - 1/\tau_0$

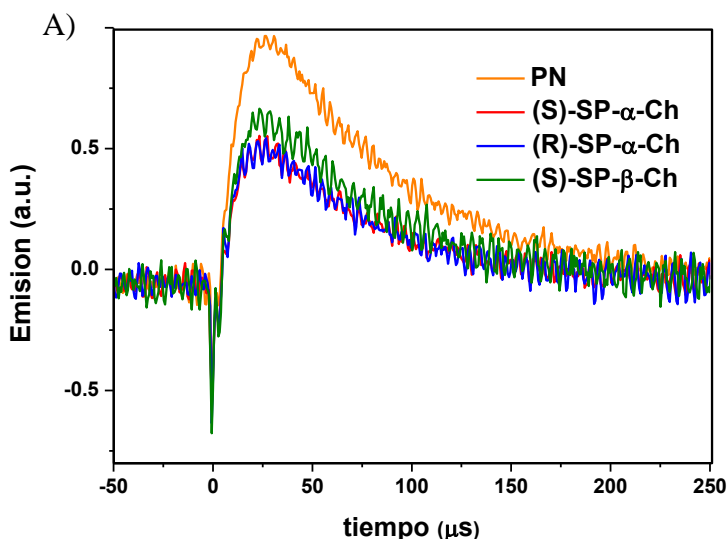
^f Las constantes de velocidad de AH (k_H) y desactivación física por el sistema π (k_{π}) se obtuvieron asumiendo que su *ratio* es similar a la determinada para las diadas KP- α -Ch y que $k_{iq} = k_H + k_{\pi}$

^g No determinada

^h $k_{d3} = 1 / \tau_{\Delta}$ usando perinaftenona como fotosensibilizador (valor tomado de la ref. 124)

ⁱ valor tomado de la ref. 125

Para determinar la capacidad de las diadas **(S)-SP- α -Ch**, **(R)-SP- α -Ch** y **(S)-SP- β -Ch** de fotosensibilizar la producción de oxígeno singlete molecular excitado ($^1\text{O}_2$ o $^1\Delta_g$), se realizaron estudios en tiempo resuelto de emisión en el infrarrojo cercano en diclorometano, usando perinaftenona (PN) como estándar. La formación de esta especie reactiva de oxígeno se detectó por su lumiscencia a 1270 nm, usando un diodo de germanio como detector. El tiempo de vida del oxígeno singlete (Figura 5.7A) obtenido fue de *ca.* 70 μs en todos los casos (similar al tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ descrito en la literatura para el mismo disolvente). El rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (ϕ_Δ) fue 0.52 para **(S)-SP- α -Ch** y **(R)-SP- α -Ch** y 0.56 para **(S)-SP- β -Ch** (Tabla 5.1 y Figura 5.7B).



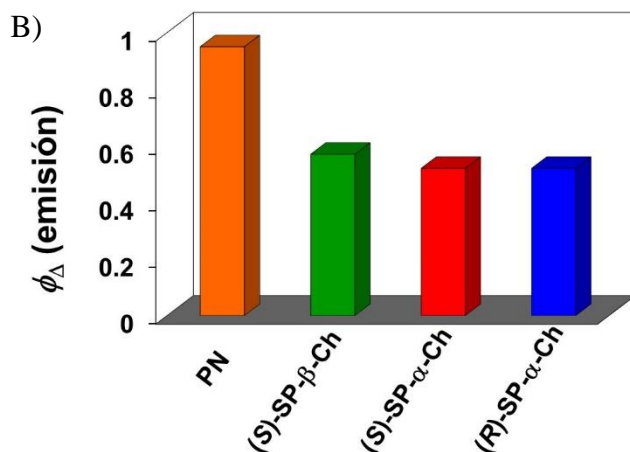


Figura 5.7. Experimentos de tiempo resuelto a 1270 nm tras excitación a 308 nm de disoluciones aireadas en diclorometano de (S)-SP- α -Ch, (R)-SP- α -Ch y (S)-SP- β -Ch, usando perinaftena como estándar de comparación A) Desactivación de luminiscencia de $^1\text{O}_2$ B) Formación de $^1\text{O}_2$.

5.3. Conclusiones

Aunque no fue posible detectar el birradical mediante estudios de fotólisis de destello láser en las diadas SP- α -Ch, su generación (5 %) ha sido químicamente demostrada obteniendo los fotoproductos de acoplamiento **5a** y **5b**. Además, los estados excitados triplete de (S)-SP- α -Ch y (R)-SP- α -Ch fueron desactivados por el oxígeno molecular para generar $^1\text{O}_2$ de manera eficiente (52 %). Resulta muy interesante el hecho que los análogos del TPA (que también poseen una arilcetona de tipo π, π^*) no son reactivos *via* AH intramolecular (< 0.5 %) pero sí producen $^1\text{O}_2$ con un $\phi_{\Delta} = 0.5$. Por el contrario, para los derivados del KP ($^3n, \pi^*$), se observa una eficiente fotogeneración de birradicales (80 %) en la posición alílica C- 7 del Ch y la producción de $^1\text{O}_2$ es despreciable (< 0.01 %).

Así, las diadas SP- α -Ch pueden ser utilizadas para generar tanto birradicales como oxígeno singlete, considerándose por tanto modelos apropiados para estudiar ambos tipos de oxidación del Ch (Tipo I y Tipo II).

5.4. Procedimiento experimental

5.4.1. General

El SP y el β -Ch fueron disponibles comercialmente. Los reactivos y los disolventes comerciales se emplearon sin purificación adicional.

5.4.2. Síntesis de *epi*-colesterol (α -Ch)

Una disolución de cloruro de oxalilo (5.8 mL, 2 M en CH₂Cl₂, 11.10 mmol) y CH₂Cl₂ anhidro (70 mL) se mezclaron en un matraz a una temperatura de -78 °C en atmósfera inerte. A continuación, se añadieron lentamente dimetilsulfóxido anhidro (0.90 mL, 12.68 mmol) y una disolución de β -colesterol (3 g, 7.76 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 mL). La mezcla de reacción se calentó hasta alcanzar la temperatura de -45 °C y se agitó durante 1.5 horas. Después de este tiempo, se añadió trietilamina (5.63 mL, 40.20 mmol) y se siguió agitando durante 1.5 horas calentando hasta temperatura ambiente. La reacción se paró mediante adición de H₂O desionizada (150 mL). La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 100 mL), las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con salmuera (2 x 100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ para dar el producto 5-colesten-3-ona, que se usó inmediatamente en la reacción siguiente sin purificación adicional.

Una solución de L-selectride (10 mL, 1 M en THF, 10.00 mmol) en THF anhidro (25 mL) se enfrió a -78 °C. El 5-colesteno-3-ona se disolvió en 15 mL de THF, y después de enfriarse a 4 °C, se añadió a la disolución de L-selectride. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a -78 °C y después una hora adicional a 23 °C. La reacción se desactivó añadiendo KOH acuoso (25 mL, 2 M), seguido de metanol (25 mL). La extracción de la mezcla se llevó a cabo con éter (2 x 50 mL). Las fases orgánicas obtenidas se lavaron con salmuera (3 x 50 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-éter dietílico de 1: 1 v/v) para dar **α-Ch** como un sólido blanco (840 mg, 28 %). Sus señales de ¹H RMN coinciden con las descritas anteriormente.¹²⁶

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.69 (s, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.94 – 2.10 (señal compleja, 28H), 2.56 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 5.41 (m, 1H).

5.4.3. Síntesis de las diadas (S)-SP-α-Ch y (R)-SP-α-Ch

A una disolución de SP racémico (375 mg, 1.45 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL), se añadió dicitohexilcarbodiimida (DCC, 535 mg, 2.60 mmol) en pequeñas porciones, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron una disolución de α-Ch (500 mg, 1.30 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) y de 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 20 mg, 0.16 mmol), y la mezcla se mantuvo en agitación durante 8 horas más a la misma temperatura. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de Celite®. El filtrado resultante se lavó con salmuera y agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por

cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo-diclorometano de 90:5:5 v/v/v) obteniéndose la mezcla diastereoisomérica de los ésteres correspondientes. Después de la cristalización usando hexano - acetato de etilo (95:5 v/v), el diastereoisómero (**S**)-**SP- α -Ch** fue obtenido como un aceite incoloro (319 mg, 39 %) y (**R**)-**SP- α -Ch** como un sólido blanco (335 mg, 41%).

Diada (S)-SP- α -Ch. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.58 (s, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.89 (s, 3H), 1.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.90–1.92 (señal compleja, 26H), 2.12 (dm, $J = 15.3$ Hz, 1H), 2.37 (dm, $J = 15.3$ Hz, 1H), 3.71 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 7.10 (dd, $J = 4.8$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.36 (dm, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.65 (dd, $J = 4.8$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.77 (dm, $J = 8.3$ Hz, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 11.8, 18.0, 18.7, 18.9, 20.7, 22.6, 22.8, 23.9, 24.2, 26.0, 28.0, 28.2, 31.8, 32.0, 33.5, 35.8, 36.2, 36.3, 36.9, 39.6, 39.7, 42.3, 46.1, 50.2, 56.1, 56.8, 71.3, 122.3, 127.8, 129.5, 134.0, 134.5, 136.7, 138.2, 143.7, 145.4, 173.1, 187.5. HRMS (EI): encontrado m/z 628.3947, calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{O}_3\text{S}$ (M^+) 628.3950.

Diada (R)-SP- α -Ch. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 0.57 (s, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.88 (s, 3H), 1.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.90-1.94 (señal compleja, 26 H), 2.09 (dm, $J = 15.3$ Hz, 1H), 2.32 (dm, $J = 15.3$ Hz, 1H), 3.70 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.94 (m, 1H), 7.10 (dd, $J = 5.1$ Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.35 (dm, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.59 (dd, $J = 3.9$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.65 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.77 (dm, $J = 8.3$ Hz, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75

MHz) δ 11.8, 17.8, 18.7, 18.9, 20.8, 22.6, 22.9, 23.9, 24.2, 26.3, 28.1, 28.2, 31.7, 31.9, 33.7, 35.8, 36.1, 36.2, 36.9, 39.6, 39.8, 42.3, 45.9, 50.2, 56.1, 56.8, 71.3, 122.4, 127.8, 129.5, 134.0, 134.5, 136.6, 138.2, 143.7, 145.4, 173.2, 187.4. HRMS (EI): encontrado m/z 628.3968, calculado para $C_{41}H_{56}O_3S$ (M^+) 628.3950.

5.4.4. Síntesis de la diada (S)-SP- β -Ch

A una disolución de SP (75 mg, 0.29 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL), se añadió β -Ch (100 mg, 0.26 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) gota a gota, y la mezcla se calentó en reflujo durante 8 horas. Después de dejar enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se lavó con agua (3 x 10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se evaporó y se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano - acetato de etilo - diclorometano de 90:5:5 v/v/v) obteniéndose el éster correspondiente (S)-SP- β -Ch (134 mg, 82 %) como un sólido blanco.

1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 0.69 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.96-2.07 (señal compleja, 26 H), 2.23 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 3.79 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.62 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 7.18 (dd, $J = 5.1$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.45 (dm, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.67 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.86 (dm, $J = 8.1$ Hz, 2H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 11.9, 18.5, 18.7, 19.3, 21.1, 22.6, 22.8, 23.9, 24.3, 27.5, 27.7, 28.0, 28.2, 31.8, 31.9, 35.8, 36.2, 36.4, 36.6, 37.0, 37.8, 38.0, 39.5, 39.7, 42.3, 45.8, 50.0, 56.2, 56.7, 74.6, 122.8, 127.6, 127.9, 129.6, 134.1, 134.7, 136.9, 139.5, 139.6, 143.7, 145.4, 173.3, 187.7. HRMS (EI): encontrado m/z 628.3933, calculado para $C_{41}H_{56}O_3S$ (M^+) 628.3950.

5.4.5. Medidas de fotólisis en estado estacionario

Disoluciones de (*S*)-SP- α -Ch, (*R*)-SP- α -Ch o (*S*)-SP- β -Ch (con una concentración de *ca.* 10^{-4} M) fueron irradiadas, en condiciones anaeróbicas, con luz monocromática a 266 nm utilizando una lámpara de Xe de un espectrofluorímetro Photon Technology equipado con un monocromador. Las cinéticas de degradación se monitorizaron por espectrofotometría UV-VIS siguiendo la disminución de la absorción a 290 nm.

Para estudiar la formación de fotoproductos, se llevaron a cabo irradiaciones a escala preparativa. Así, disoluciones de las diadas (*S*)-SP- α -Ch y (*R*)-SP- α -Ch (150 mg, 0,24 mmol) en diclorometano (20 ml), bajo N₂, se irradiaron durante 8 h a través de Pyrex con una lámpara de mercurio de 400 W de media presión. Transcurrido este tiempo, las mezclas de reacción se concentraron a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna, usando hexano / acetato de etilo 98: 2 v/v como eluyente, obteniéndose los fotoproductos **5a** y **5b**.

Fotoproducto 5a (51 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.53 (s, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.57 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.90-1.98 (señal compleja, 24 H), 2.18 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.69 (s, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.62 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 6.44 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 5.1 Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 3.6 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 5.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 1H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 10.2, 13.6, 18.8, 18.9, 20.5, 22.6, 22.9, 23.8, 25.5, 26.7, 28.1, 33.1,

35.8, 36.1, 36.2, 38.1, 39.2, 39.6, 40.2, 41.1, 42.9, 46.6, 46.7, 50.2, 56.1, 70.2, 83.9, 124.7, 124.9, 125.0, 125.9, 126.1, 126.7, 128.0, 135.7, 139.7, 146.8, 156.2, 173.4. HRMS (EI): encontrado m/z 627.3865, calculado para $C_{41}H_{55}O_3S$ (M-H)⁺ 627.3866.

Fotoproducto 5b (53 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.53 (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.90-1.97 (señal compleja, 24 H), 2.14 (m, 1H), 2.46 (m, 1H), 2.70 (s, 1H), 3.06 (m, 1H), 3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 5.4$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.68 (m, 1H), 6.48 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 5.1$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 10.2, 13.1, 18.8, 19.1, 20.5, 22.6, 22.9, 23.7, 25.9, 26.6, 28.1, 32.7, 35.3, 35.8, 36.2, 38.0, 39.2, 39.6, 40.1, 41.2, 42.9, 45.8, 46.4, 50.2, 56.1, 69.7, 84.0, 123.1, 124.7, 124.9, 125.7, 125.9, 126.7, 128.5, 130.8, 134.9, 140.1, 147.0, 156.0, 172.9. HRMS (EI): encontrado m/z 627.3846, calculado para $C_{41}H_{55}O_3S$ (M-H)⁺ 627.3866.

5.4.6. Medidas de fotólisis de destello láser

Todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente. Las muestras se disolvieron en diclorometano y las disoluciones obtenidas tenían una absorbancia de *ca.* 0.3 a 355 nm. Las disoluciones se desairearon mediante burbujeo de nitrógeno (cuando se especifica).

5.4.7. Medidas de oxígeno singlete

Las medidas de fosforescencia de **oxígeno singlete** se realizaron detectando su luminiscencia (1270 nm) mediante un fotodiodo de germanio Oriel 71614 acoplado a una celda de láser fotólisis con una geometría de ángulo recto. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) de las díadas se determinó en disoluciones de diclorometano utilizando el mismo valor de absorbancia (0.30) a 308 nm para cada compuesto. Se utilizó como estándar perinaftenona en diclorometano,¹²⁷ que tiene un rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) de 0.95.

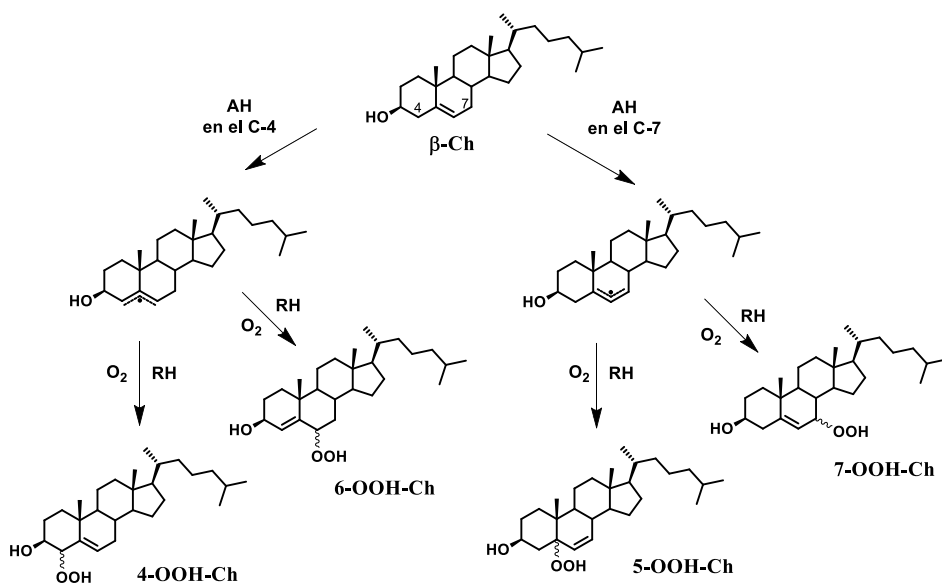
**Capítulo 6. Abstracción intramolecular de
hidrógeno en la posición C-4 del colesterol**

6.1. Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, la oxidación del colesterol (Ch) es un proceso que puede ocurrir a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Sus productos de oxidación, los oxisteroles, son compuestos que en condiciones fisiológicas (niveles muy bajos y controlados), desempeñan un rol esencial en la regulación de la homeostasis del propio Ch.⁵¹ Sin embargo, su acumulación alcanzando niveles patológicos está asociada con la aparición y el desarrollo de enfermedades crónicas, tales como la aterosclerosis y el Alzheimer.^{128,129}

En la oxidación del Ch por *via* no enzimática pueden operar dos mecanismos: Tipo I (*via* radicales libres) y Tipo II (mediado por oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$). En el primer caso, un paso clave es la abstracción de un hidrógeno alílico, inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) o por estados excitados triplete de compuestos carbonílicos.

Siempre se había descrito en la literatura que el proceso de abstracción de hidrógeno (AH) en el Ch ocurría solamente en la posición alílica 7. Así, los productos primarios de la autooxidación del Ch son los derivados 7- α/β -hidroperóxidos, que a su vez se transforman en los dioles 7 α/β -hidroxi-Ch y la cetona 7-oxo-Ch. Estos oxisteroles tienen gran relevancia biológica ya que se usan como biomarcadores para el estudio de la peroxidación lipídica.⁵¹ Por otra parte, muy recientemente se han identificado derivados hidroperóxidos del Ch en las posiciones 4 y 6, sugiriendo que la AH podría ocurrir también, aunque en menor grado, en el protón alílico del C-4 del Ch.⁷² En el Esquema 6.1 se ilustran los productos primarios obtenidos a partir de la AH en las dos posiciones alílicas 4 y 7.



Esquema 6.1. Productos primarios obtenidos a partir de la AH en las dos posiciones alílicas 4 y 7.

En este sentido, se ha descrito que la AH en la posición 4 por un radical peroxilo puede estar permitida por la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo OH en el C-3, a pesar de que la energía del enlace C4-H (89.0 kcal/mol), determinada mediante cálculos teóricos, es *ca.* 6 kcal/mol mayor que la del enlace C7-H (83.2 kcal/mol).

En la fotooxidación del Ch Tipo I, la AH en el C-7 es considerada también el proceso clave como se ha demostrado en trabajos previos del grupo.^{93,94,114,119,130} De hecho, sólo se han observado fotoproductos de acoplamiento C-C generados tras AH en el C-7 y no en el C-4.

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente capítulo se pretende estudiar la AH en la posición C-4 del Ch, inducida por el estado excitado triplete del ketoprofeno (KP) que contiene el cromóforo benzofenona (BZF). Para ello, se prepararon sistemas en los que los

oxiesteroles 7- α/β -OH-Ch están unidos covalentemente al (*S*) o (*R*)-KP. En estas diadas la posición 7 se ve bloqueada y, por tanto, la AH en C-4 podría estar favorecida por efectos estéricos y/o conformacionales. El grupo OH en la posición 3 se protegió con un grupo acetilo para que el acoplamiento con el (*S*) o (*R*)-KP se produjera exclusivamente con el OH en C-7 (Figura 6.1).

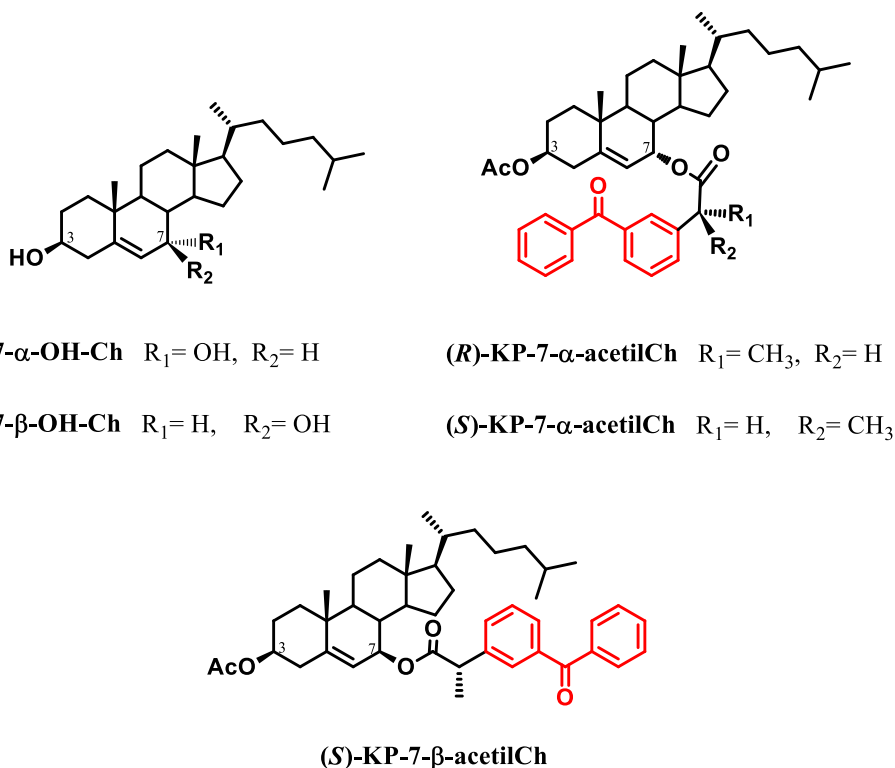


Figura 6.1. Estructuras químicas de los compuestos (*R*)-KP-7- α -acetilCh, (*S*)-KP-7- α -acetilCh y (*S*)-KP-7- β -acetilCh.

Para llevar a cabo el objetivo propuesto se han combinado experimentos de fotólisis en estado estacionario, fotólisis de destello

láser y de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP).

6.2. Resultados y discusión

Las diadas (*R*)-KP-7- α -acetilCh, (*S*)-KP-7- α -acetilCh, (*S*)-KP-7- β -acetilCh y los oxisteroles 7- α/β -OH-Ch se han sintetizado a partir del 3 β -acetoxi-5-colesteno (acetilCh). La ruta sintética se muestra en la Figura 6.2.

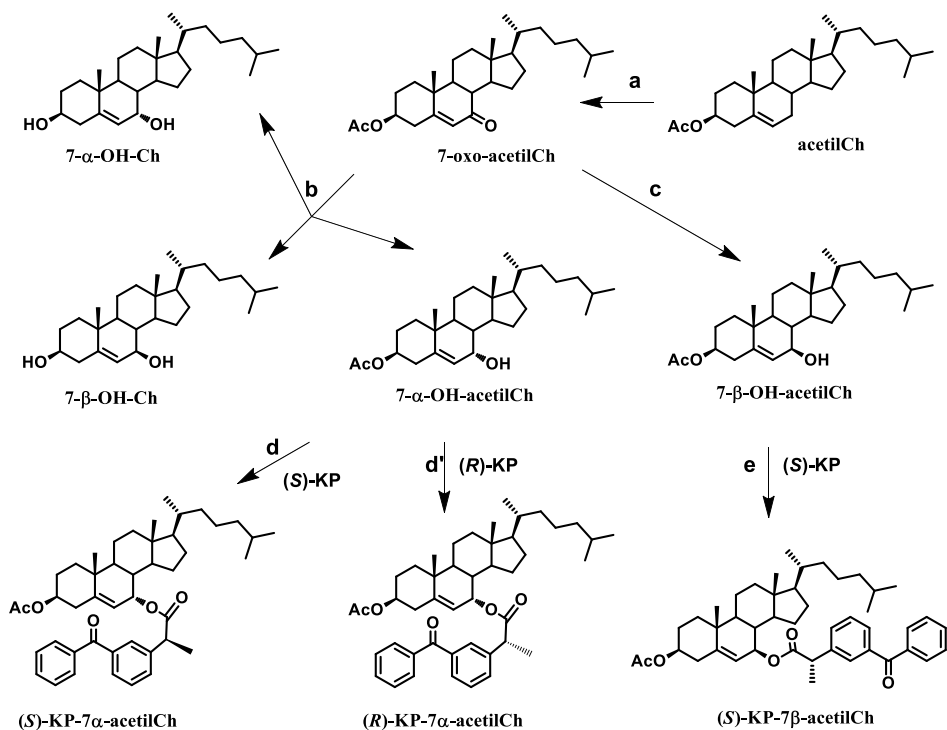
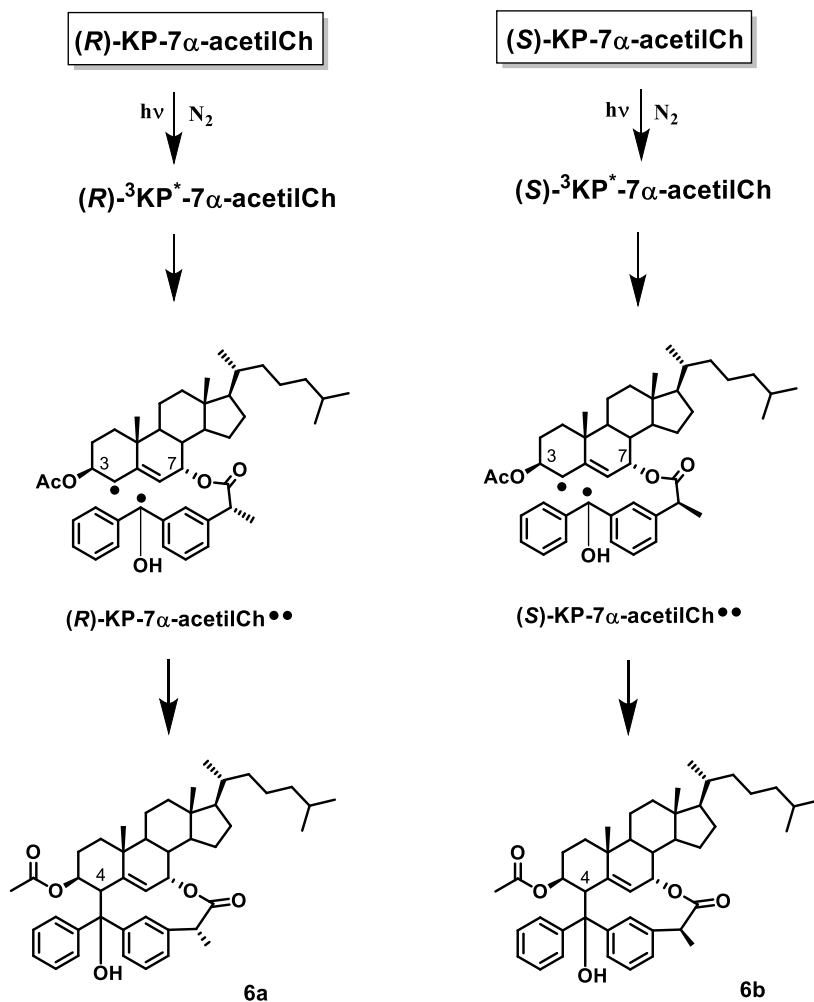


Figura 6.2. Síntesis de (*R*)-KP-7- α -acetilCh, (*S*)-KP-7- α -acetilCh, (*S*)-KP-7- β -acetilCh y 7- α/β -OH-Ch: a) *t*-BuOOH, CuI b) *L*-selectride c) NaBH₄, CeCl₃·7H₂O d, d' o e) DMAP, DCC.

En primer lugar, el **acetilCh** se oxidó a 3 β -acetoxicolest-5-en-7-ona (**7-oxo-acetilCh**) utilizando *t*-butil-hidroperóxido (*t*-BuOOH). La reducción de **7-oxo-acetilCh** usando *L*-selectride permitió obtener los dioles **7- α / β -OH-Ch** y el compuesto 7 α -hidroxi-acetilcolesterol (**7 α -OH-acetilCh**). El acoplamiento entre este último y el (*S*) o el (*R*)-KP utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP), llevó a la formación de las diadas (*S*) y (*R*)-**KP-7- α -acetilCh**, respectivamente. Por otra parte, la reducción de **7-oxo-acetilCh**, empleando NaBH₄ dió lugar al compuesto 7 β -hidroxi-acetilcolesterol (**7 β -OH-acetilCh**), que fue acoplado al (*S*)-KP para dar la diada (*S*)-**KP-7- β -acetilCh**. Tanto los intermedios de reacción como los productos finales de la síntesis fueron caracterizados por ¹H, ¹³C-RMN y DEPT, así como por espectrometría de masas.

Con el fin de investigar la formación de fotoproductos, se realizaron irradiaciones a escala preparativa de las diadas (*R*)-**KP-7- α -acetilCh**, (*S*)-**KP-7- α -acetilCh** y (*S*)-**KP-7- β -acetilCh** en tubos de Pyrex utilizando diclorometano como disolvente y en condiciones anaeróbicas, mediante una lámpara de 400 W de mercurio de media presión. Las fotorreacciones fueron monitorizadas por C.C.F. y RMN. Los crudos de fotorreacción obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna de sílice, usando como eluyente hexano/diclorometano/acetato de etilo (85:10:5 v/v/v). El análisis de los espectros de las diferentes fracciones obtenidas reveló la formación de dos fotoproductos diastereoisoméricos **6a** y **6b** a partir de las diadas (*R*)-

KP-7- α -acetilCh y **(S)-KP-7- α -acetilCh**, respectivamente (Esquema 6.2).



Esquema 6.2. Formación de los productos **6a** y **6b** por fotólisis de las diadas **(R)-KP-7- α -acetilCh** y **(S)-KP-7- α -acetilCh**.

Los productos **6a** y **6b** se forman por AH intramolecular desde el C-4 por el estado excitado triplete del cromóforo BZF, y posterior

acoplamiento C-C de los birradicales generados. La estructura de los compuestos **6a** y **6b** fue asignada en base a datos espectroscópicos (^1H , ^{13}C , HSQC y NOESY) y espectrometría de masas. Por el contrario, a partir de la diada (*S*)-**KP-7- β -acetilCh** no se obtuvo ningun fotoproducto, debido a su conformación extendida que no permite una efectiva aproximación entre la BZF y el oxiesterol.

En particular, los experimentos NOESY proporcionaron información acerca de la estereoquímica de los nuevos centros quirales generados por fotociclación. En los fotoproductos **6a** y **6b**, la interacción más relevante fue entre el protón alílico en el C-4 y los protones del grupo fenilo. Además, cabe destacar que no se encontró ningun efecto NOE entre los hidrógenos en C-4 y en C-3, lo que significa que ambos átomos de hidrógeno se encuentran en una configuración *trans* entre sí (Figura 6.3).

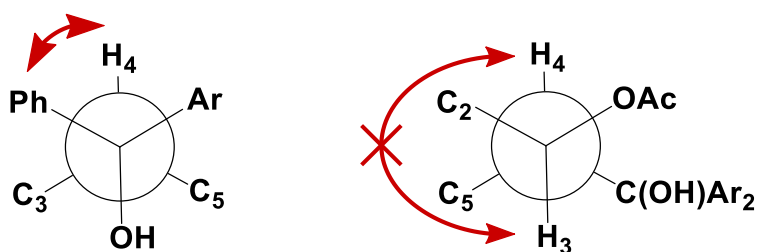


Figura 6.3. Interacciones NOE en el fotoproducto **6a**.

Para demostrar que la formación de los fotoproductos **6a** y **6b** ocurre a través de un mecanismo radicalario, las diadas (*R*)-**KP-7- α -acetilCh** y (*S*)-**KP-7- α -acetilCh** se sometieron a estudios de fotólisis de destello láser (FDL) y de polarización nuclear dinámica inducida

quimicamente (CIDNP). Los experimentos de FDL se llevaron a cabo en diclorometano, en atmósfera de nitrógeno a $\lambda_{exc} = 355$ nm. Los espectros de absorción transitoria (Figura 6.4, gráfica interior) de las diadas **(R)-KP-7- α -acetilCh** y **(S)-KP-7- α -acetilCh**, obtenidos 0.3 μ s después del pulso del láser, muestran la presencia exclusiva del triplete con un característico máximo de absorción a 525 nm. No fue posible detectar los birradicales **(R)-KP-7- α -acetilCh $\bullet\bullet$** y **(S)-KP-7- α -acetilCh $\bullet\bullet$** en la escala de tiempo de nanosegundos ya que su formación es mucho más lenta que su consumo. Por otra parte, en el caso de la diada **(S)-KP-7- β -acetilCh**, además del triplete, se observó la presencia del radical cetilo (con máximo a 545 nm) generado tras la AH a partir del disolvente. El análisis cinético de las desapariciones de las señales a 610 nm (Figura 6.4) permitió la determinación de los tiempos de vida del triplete (τ_T) que fueron *ca.* 0.40 μ s para **(R)-KP-7- α -acetilCh**, 0.60 μ s para **(S)-KP-7- α -acetilCh** y 1.67 μ s para **(S)-KP-7- β -acetilCh** (este valor se corresponde con el del compuesto de referencia (S)-KP).

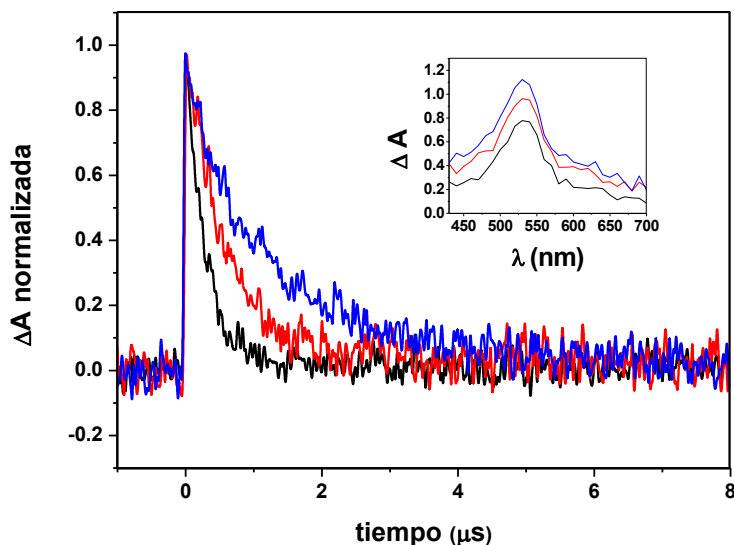


Figura 6.4. Cinéticas de desaparición de **(R)-KP-7- α -acetilCh** (negro), **(S)-KP-7- α -acetilCh** (rojo) y **(S)-KP-7- β -acetilCh** (azul) a 610 nm en diclorometano, N_2 . Gráfica interior: espectros de absorción transitoria obtenidos 0.3 μs después del pulso del láser.

Los valores de τ_T permitieron cuantificar la velocidad de la reacción de AH en la posición 4; las constantes de velocidad de desactivación intramolecular (k_{iq}) fueron determinadas mediante la ecuación (2) (ver tercer capítulo):

$$k_{iq} = 1/\tau_i - 1/\tau_0$$

donde τ_i se corresponde con el tiempo de vida del compuesto **(R)** o **(S)-KP-7- α -acetilCh** y τ_0 es el tiempo de vida de triplete de la diada **(S)-KP-7- β -acetilCh**. Los valores obtenidos para **(R)-KP-7- α -acetilCh** y **(S)-KP-7- α -acetilCh** fueron $1.90 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ y $1.07 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estos datos indican una importante estereodiferenciación en el proceso de

AH intramolecular. Además, los valores de k_{iq} para las diadas **(R)-KP-7- α -acetilCh** y **(S)-KP-7- α -acetilCh** resultaron ser bastante más bajos que los de las amidas **KP-NHCh** y los esteres **KP- α -Ch**, previamente estudiados.^{93,119} Esto es debido a que los tiempos de vida de triplete encontrados para **(R)-KP-7- α -acetilCh** y **(S)-KP-7- α -acetilCh** fueron más largos (τ y k_{iq} son inversamente proporcionales).

Los experimentos de CIDNP se realizaron en diferentes disolventes deuterados (tolueno, diclorometano, cloroformo y acetonitrilo) en atmósfera inerte. Los compuestos **(R)** y **(S)-KP-7- α -acetilCh** mostraron importantes polarizaciones CIDNP, mientras que la diada **(S)-KP-7- α -acetilCh** no dió ninguna señal polarizada. Así, en las Figuras 6.5 y 6.6 se muestran los espectros de RMN y CIDNP de **(R)** y **(S)-KP-7- α -acetilCh** junto con las asignaciones de las señales correspondientes a los protones más importantes. Las asignaciones se basan en los espectros de RMN de los fotoproductos aislados.

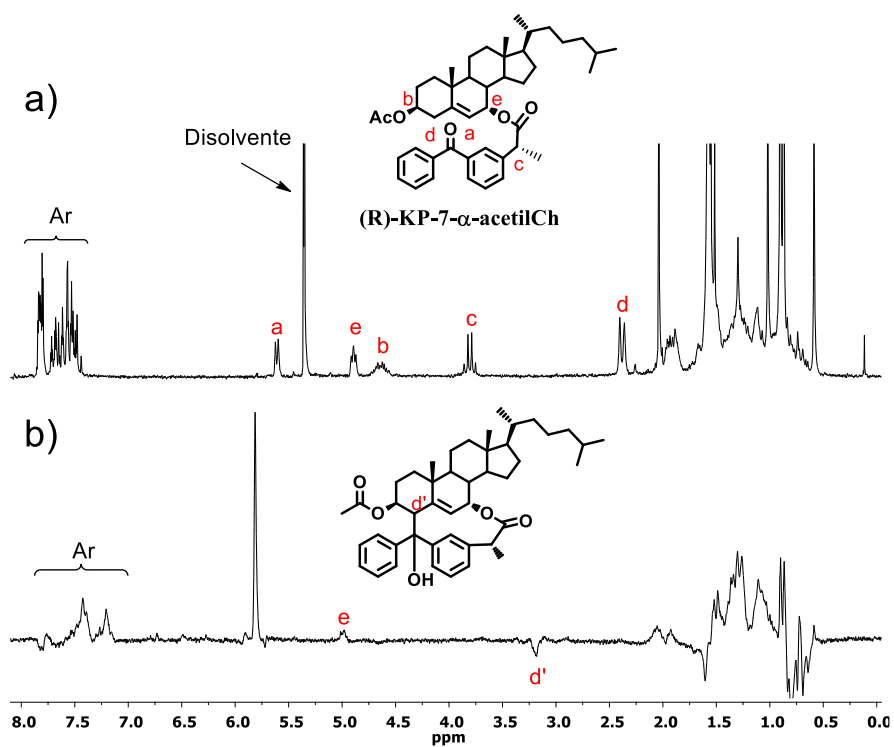


Figura 6.5. Espectros RMN (a) y CIDNP (b) de **(R)-KP-7- α -acetylCh** registrados después del pulso del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) en CD_2Cl_2 .

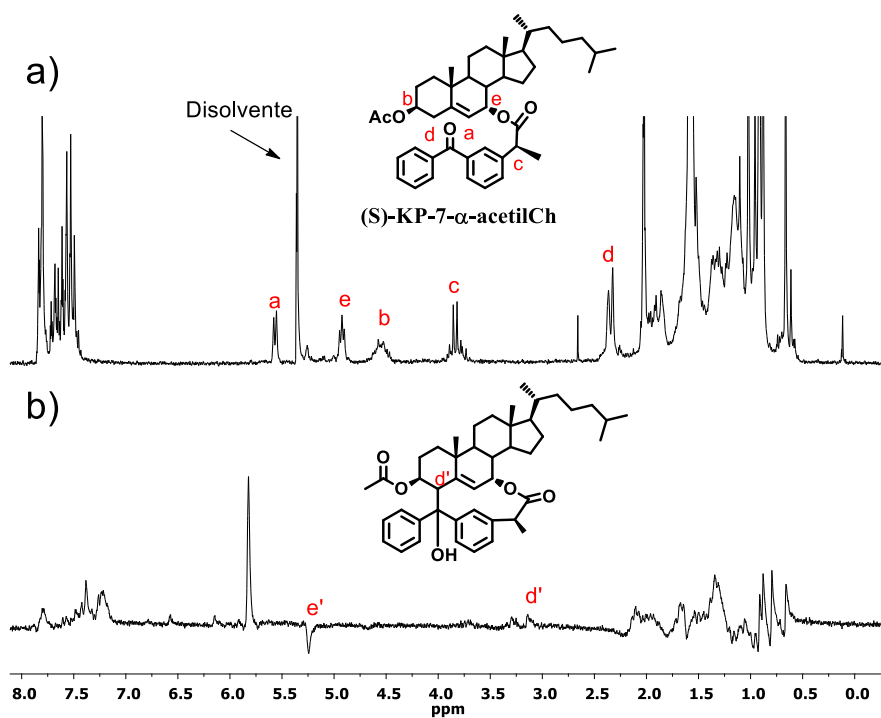


Figura 6.6. Espectros RMN (a) y CIDNP (b) de (*S*)-KP-7- α -acetilCh registrados después del pulso del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) en CD_2Cl_2 .

En los espectros CIDNP de (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetilCh, las transiciones de RMN están polarizadas en positivo (absorción) y negativo (emisión). Además de las polarizaciones de (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetilCh, sólo se encontraron pocas señales de productos adicionales. En particular, la señal nueva a 3.06 ppm (d') parece atribuirse a la correspondiente señal del protón en C-4 de los fotoproductos **6a** y **6b**, confirmando así su formación a partir de los birradicales precursores. En cualquier caso, se trata de una asignación tentativa y se están llevando a cabo cálculos teóricos para una mejor justificación de los efectos CIDNP observados.

Teniendo en cuenta que las diadas (**R**)-**KP-7- α -acetilCh** y (**S**)-**KP-7- α -acetilCh** dan lugar a un proceso de AH en la posición 4, como se evidencia con la formación de fotoproductos en C-4 tras el acoplamiento C-C de los birradicales generados, sería interesante estudiar la versión intermolecular para ver si la AH en C-4 sigue estando favorecida al irradiar los oxisteroles **7- α / β -OH-Ch** y la BZF por separado. En el tercer capítulo de la presente tesis, se ha visto que irradiaciones de disoluciones de β -Ch en presencia de BZF dan lugar a AH en C-7.¹¹⁴ Sin embargo, en los oxisteroles **7- α / β -OH-Ch**, un grupo hidroxilo sustituye uno de los dos protones en la posición 7, lo que podría desfavorecer estadísticamente y/o estéricamente la abstracción del protón remanente en beneficio de la abstracción de uno de los átomos de hidrógeno en C-4.

En este sentido, disoluciones de BZF/ **7- α** o **7 β -OH-Ch** (1.5:1 proporciones molares) se sometieron a estudios de fotólisis en estado estacionario en diclorometano y acetonitrilo para investigar la formación de fotoproductos. Los experimentos se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno, usando un fotorreactor multilámpara equipado con 8 lámparas UVB ($\lambda_{\text{max}} = 300$ nm, distribución gaussiana). Tanto en diclorometano como en acetonitrilo, se obtuvo el 7-oxo-colesterol (**7-oxo-Ch**) como producto mayoritario para ambos compuestos. Los rendimientos obtenidos para **7-oxo-Ch** en acetonitrilo (44 % y 37 % para **7 β -OH-Ch** y **7 α -OH-Ch**, respectivamente) fueron más altos que en diclorometano (22 % y 18 % para **7 β -OH-Ch** y **7 α -OH-Ch**, respectivamente). Además, el fotoproducto **7-oxo-Ch** se obtuvo en cantidad mayor a partir del **7- β -**

OH-Ch. Estos datos indican claramente una significativa influencia del disolvente y una importante estereodiferenciación entre los dioles en el proceso de AH. Efectivamente, el oxiesterol **7- β -OH-Ch** reacciona totalmente durante su irradiación con BZF, mientras que su diastereoisómero **7- α -OH-Ch** no se consume completamente. Esto significa que la abstracción del protón 7α está favorecida respecto al 7β . La formación del fotoproducto principal se explica por la AH en C-7 de **7- β -OH-Ch** o **7- α -OH-Ch** por la BZF, seguida por la desproporción del par de radicales generado. Además de la cetona **7-oxo-Ch**, se aisló el fotoproducto pinacol en todos los casos (Figura 6.7).

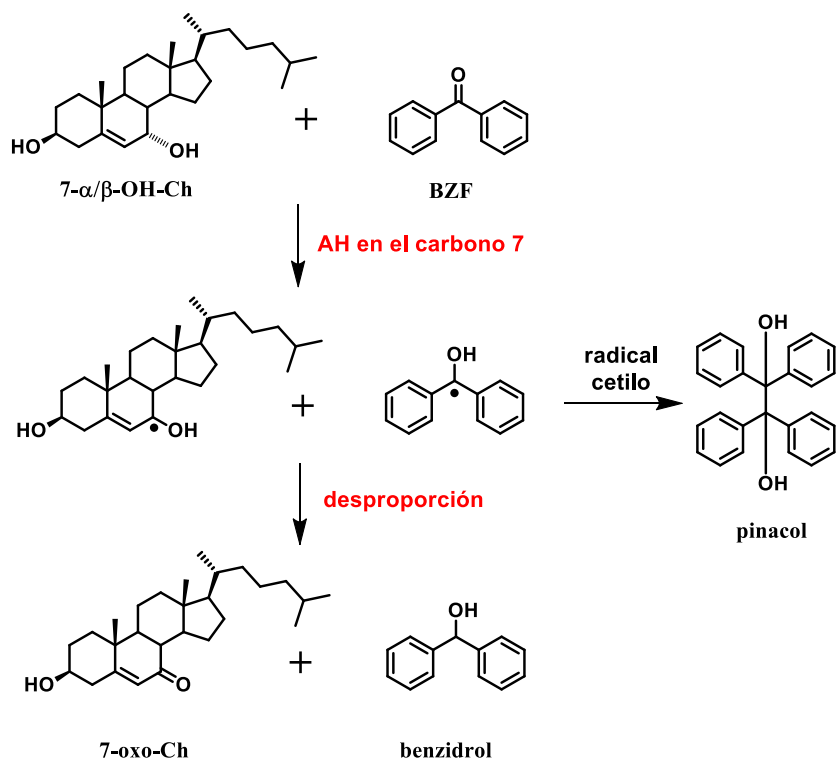


Figura 6.7. Formación de los fotoproductos **7-oxo-Ch** y pinacol.

Para confirmar que la formación del fotoproducto **7-oxo-Ch** ocurre por AH en C-7, los oxisteroles **7- α / β -OH-Ch** se sometieron a experimentos de FDL a 355 nm, en diclorometano y en condiciones anaeróbicas. Los espectros de absorción transitoria en la zona del visible para **7- β -OH-Ch** y **7- α -OH-Ch**, obtenidos 5 μ s después del pulso del láser, muestran la presencia de dos especies transitorias: el estado excitado triplete de la BZF con máximo a 525 nm y el radical cetilo con un máximo a 545 nm. Como se muestra en la gráfica interior de la Figura 6.8, el diol **7- β -OH-Ch** (línea roja) muestra una contribución del radical cetilo ligeramente superior en comparación con el diol **7- α -OH-Ch** (línea azul). El análisis cinético de la desaparición de las señales a 610 nm (donde sólo se encuentra la especie triplete) permitió demostrar que el triplete de la BZF ($^3\text{BZF}^*$) se desactiva en presencia de los oxisteroles **7- β -OH-Ch** y **7- α -OH-Ch** (Figura 6.8).

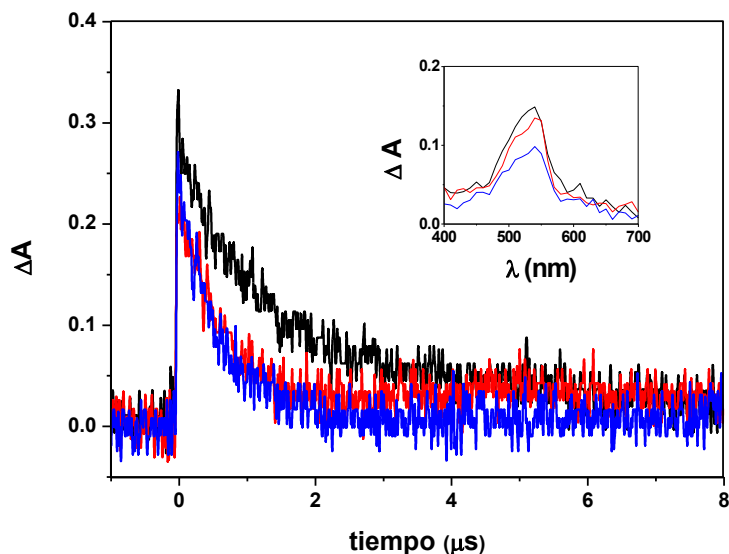


Figura 6.8. Cinéticas de desaparición de BZF en ausencia (negro) y en presencia de **7- β -OH-Ch** (rojo) o **7- α -OH-Ch** (azul) a 610 nm en diclorometano. Gráfica interior: espectros de absorción transitoria obtenidos 5 μs después del pulso del láser.

Con el fin de cuantificar la reactividad de $^3\text{BZF}^*$ con los oxisteroles **7- α/β -OH-Ch**, fueron determinadas las constantes de desactivación. Así, se representó la inversa del tiempo de vida del triplete de la BZF a 610 nm frente a la concentración de **7- β -OH-Ch** o **7- α -OH-Ch** y los valores de las constantes de desactivación se obtuvieron a partir de la pendiente de las dos rectas obtenidas (Figura 6.9).

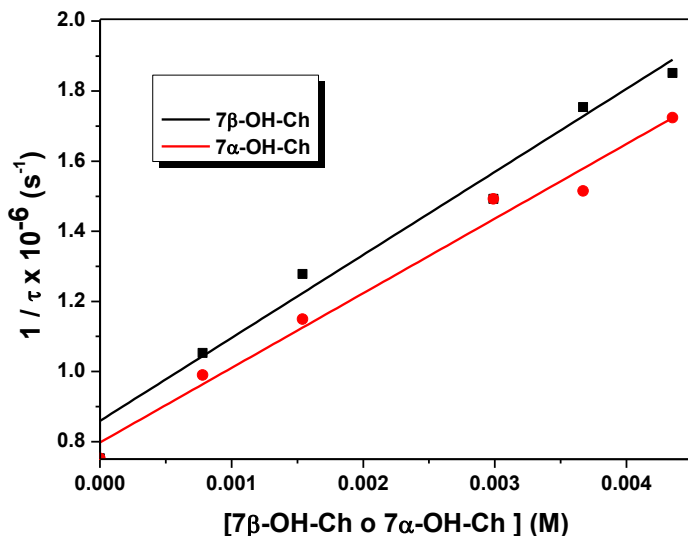


Figura 6.9. Efecto de la adición de **7-β-OH-Ch** (negro) y **7-α-OH-Ch** (rojo) en la velocidad de desactivación del triplete de la BZF a 610 nm (representación Stern-Volmer).

Las constantes de desactivación de $^3\text{BZF}^*$ fueron similares para **7-β-OH-Ch** y **7-α-OH-Ch** (2.37×10^8 y 2.13×10^8 , respectivamente), a pesar de la estereodiferenciación observada en la fotorreactividad.

Aunque las constantes de velocidad de desactivación del triplete BZF no parecen, en principio, correlacionarse con los rendimientos de los productos obtenidos en la fotólisis en estado estacionario, la diferencia observada puede explicarse teniendo en cuenta que las constantes de velocidad están asociadas con el paso inicial, mientras que la distribución de los productos es el resultado del proceso global que incluye desproporción o transferencia de hidrógeno reversible en el par radical generado.

6.3. Conclusiones

Se ha demostrado la oxidación del Ch en la posición 4 *via* AH al irradiar sistemas en los que los oxистерoles 7- α/β -OH-Ch están unidos covalentemente al (S) o (R)-KP. Así, tras AH en la posición 4, se obtienen dos fotoproductos diastereoisoméricos por acoplamiento C-C a partir de los dos birradicales generados. Cabe destacar que se observa una importante estereodiferenciación en el proceso de AH intramolecular en las diadas (R) y (S)-KP-7- α -acetilCh.

En la versión intermolecular del proceso, se observa una importante estereodiferenciación entre los oxистерoles 7 β y 7 α -OH-Ch en la fotogeneración del producto 7-oxo-Ch y una significativa influencia del disolvente. Así, los rendimientos obtenidos para 7-oxo-Ch en acetonitrilo son más altos que en diclorometano. Además, el rendimiento de formación del fotoproducto 7-oxo-Ch es mayor a partir del oxистерol 7 β -OH-Ch.

6.4. Procedimiento experimental

6.4.1. General

El (S) y (R)-KP y el acetilCh son disponibles comercialmente. Los reactivos y los disolventes comerciales se usaron directamente sin purificación adicional.

6.4.2. Síntesis de 7-oxo-acetilCh

A una disolución de acetilCh (5.5 g, 12.80 mmol) y CuI (0.1 g, 0.50 mmol) en tolueno anhidro (100 mL) se le añadió gota a gota *t*-

butilhidroperóxido (15.4 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 horas. Después de este tiempo se evaporó el disolvente, el crudo de reacción se diluyó con agua y se extrajo con éter etílico. El residuo se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo 9:1 v/v), obteniéndose el producto **7-oxo-acetilCh** (3.2 g, 7.20 mmol, 57 %). Sus señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN coinciden con las descritas anteriormente en la literatura.¹³¹

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.70 (s, 3H), 0.88 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.22 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.01-2.60 (señal compleja, 26H), 4.73 (m, 1H), 5.72 (m, 1H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ = 12.0, 17.3, 18.9, 21.2, 21.3, 22.6, 22.8, 23.8, 26.3, 27.4, 28.0, 28.5, 35.7, 36.0, 36.2, 37.7, 38.3, 38.7, 39.5, 43.1, 45.4, 49.8, 50.0, 54.8, 72.2, 126.7, 163.8, 170.3, 202.0.

6.4.3. Síntesis de los dioles **7 β** y **7 α -OH-Ch**

A una disolución de **7-oxo-acetilCh** (2 g, 4.60 mmol) en THF anhidro (30 mL) se le añadió gota a gota *L*-selectride (15 mL). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora. El residuo se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (50 mL). La fase orgánica se lavó (10 % HCl, 10 % NaHCO_3 , salmuera), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (eluyente: éter etílico-hexano-acetato de etilo 80:15:5 v/v/v) para dar los dioles **7 β -OH-Ch** (0.42 g, 1.04 mmol, 23 %) y **7 α -OH-Ch** (0.78 g, 1.94 mmol, 42 %).¹³¹

7 β -OH-Ch. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.62 (s, 3H), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.98 (s,

3H), 0.91-2.30 (señal compleja, 28H), 3.48 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 5.22 (m, 1H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ = 11.8, 18.8, 19.2, 21.1, 22.6, 22.8, 23.8, 26.4, 28.0, 28.5, 31.6, 35.7, 36.2, 36.4, 36.9, 39.5, 39.6, 40.9, 41.7, 42.9, 48.3, 55.5, 56.0, 71.4, 73.4, 125.5, 143.5.

7 α -OH-Ch. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.70 (s, 3H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.05-2.41 (señal compleja, 28H), 3.61 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 5.62 (m, 1H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ = 11.6, 18.3, 18.7, 20.7, 22.6, 22.8, 23.7, 24.3, 28.0, 28.3, 31.4, 35.8, 36.2, 37.0, 37.4, 37.5, 39.2, 39.5, 42.0, 42.1, 42.3, 49.4, 55.9, 65.4, 71.4, 123.9, 146.2.

6.4.4. Síntesis de las diadas KP-7-acetilCh

6.4.4.1. Síntesis de 7 β y 7 α -OH-acetilCh

La reducción selectiva de **7-oxo-acetilCh** con *L*-selectride llevó a la formación de 7 α -hidroxi-3 β -acetoxi-5-colesteno (**7 α -OH-acetilCh**), mientras que la reducción con NaBH_4 dió lugar al 7 β -hidroxi-3 β -acetoxi-5-colesteno (**7 β -OH-acetilCh**).

El compuesto **7 α -OH-acetilCh** fue preparado usando *L*-selectride mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior para la formación de los dioles. Tras su purificación mediante columna cromatográfica (eluyente: hexano-acetato de etilo 70:30 v/v), el producto se obtuvo como un sólido blanco (0.68 g, 1.53 mmol, 33 %). Sus datos de ^1H y ^{13}C -RMN coinciden con los descritos en la literatura.¹³²

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.66 (s, 3H), 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.04-1.98 (señal compleja, 25H), 2.00 (s, 3H), 2.34 (m, 2H), 3.80 (m, 1H), 4.61 (m,

1H), 5.60 (m, 1H). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.6, 18.2, 18.7, 20.7, 21.4, 22.6, 22.8, 23.7, 24.3, 27.5, 28.0, 28.3, 30.9, 35.8, 36.2, 36.7, 37.5, 37.9, 39.1, 39.5, 42.1, 42.2, 49.4, 55.8, 65.2, 73.4, 124.8, 145.2, 170.4.

Por otra parte, el compuesto **7β-OH-acetilCh** se preparó utilizando NaBH₄, como se ha anticipado. Así, a una disolución de **7-oxo-acetilCh** (1 g, 2.30 mmol) y CeCl₃·7H₂O (0.88 g, 2.30 mmol) en una mezcla anhidra de THF y MeOH (1:1, 40 mL) se le añadió NaBH₄ (170 mg, 0.62 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El crudo de reacción se diluyó con agua (30 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución de HCl 5% y con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó obteniéndose **7β-OH-acetilCh** (0.65 g, 1.46 mmol, 64 %).¹³²

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.62 (s, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.94 – 1.95 (señal compleja, 25H), 1.96 (s, 3H), 2.29 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 5.24 (m, 1H). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.8, 18.8, 19.1, 21.0, 21.4, 22.5, 22.8, 23.8, 26.4, 27.7, 28.0, 28.5, 35.7, 36.2, 36.5, 36.7, 37.6, 39.5, 40.8, 42.9, 48.2, 55.5, 55.9, 73.2, 73.5, 126.4, 142.3, 170.5.

6.4.4.2. Síntesis de las diadas (*R*) y (*S*)-KP-7-α-acetilCh

A una disolución de (*S*) o (*R*)-KP (215 mg, 0.84 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC, 320 mg, 1.54 mmol) en pequeñas porciones, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron una solución de **7α-OH-acetilCh** (340 mg, 0.77 mmol) en CH₂Cl₂ (7 mL) y de 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 10

mg, 0.08 mmol), y la mezcla se mantuvo en agitación durante toda la noche a la misma temperatura. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de Celite®. El filtrado resultante se lavó con salmuera y agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de diclorometano-acetato de 90:5:5 v/v/v) obteniéndose (**R**)-**KP-7- α -acetilCh** (390 mg, 0.57 mmol, 74%) y (**S**)-**KP-7- α -acetilCh** (355 mg, 0.52 mmol, 68%).

Diada (R)-KP-7- α -acetilCh. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.55 (s, 3H), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.55 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.64-1.93 (señal compleja, 27 H), 2.05 (s, 3H), 2.37 (m, 2H), 3.78 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 5.59 (m, 1H), 7.41-7.83 (m, 9H). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.3, 17.5, 18.1, 18.6, 20.6, 21.4, 22.5, 22.8, 23.8, 24.0, 27.5, 27.8, 28.0, 35.6, 35.9, 36.0, 36.5, 37.3, 37.9, 39.0, 39.5, 42.0, 43.0, 45.6, 48.6, 53.4, 55.7, 68.7, 73.1, 120.7, 128.3, 128.4, 129.1, 129.6, 130.0, 131.4, 132.4, 137.6, 137.7, 141.5, 146.9, 170.4, 173.2, 196.1. HRMS (EI): encontrado m/z 681.4493, calculado para C₄₅H₆₁O₅ (M+H)⁺ 681.4514.

Diada (S)-KP-7- α -acetilCh. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.54 (s, 3H), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.91 (s, 3H), 1.49 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.98-1.94 (señal compleja, 24H), 1.96 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 3.74 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.48 (m, 1 H), 4.84 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 7.35-7.74 (m, 9H). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.4, 17.9, 18.1, 18.7, 20.7, 21.3, 22.5, 22.8, 24.0, 27.4, 28.0, 35.8, 35.9, 36.1, 36.6, 37.3, 37.8, 39.1, 39.5, 42.1, 43.2, 45.9, 49.1, 55.9, 68.9, 73.2, 120.3, 128.3, 129.1, 129.4, 130.0, 131.7, 132.3,

137.6, 140.8, 147.1, 170.3, 173.4, 196.3. HRMS (EI): encontrado m/z 681.4492, calculado para C₄₅H₆₁O₅ (M+H)⁺ 681.4514.

6.4.4.3. Síntesis de la diada (S)-KP-7-β-acetilCh

A partir del (S)-KP (215 mg, 0.84 mmol) y del 7β-OH-acetilCh (340 mg, 0.77 mmol) se preparó la diada (S)-KP-7-β-acetilCh (405 mg, 0.59 mmol, 77 %) de manera idéntica a las diadas descritas en el apartado anterior.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 0.59 (s, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.05 (s, 3H), 0.67-2.37 (señal compleja, 29H), 3.74 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 5.24 (m, 1H), 7.18-7.82 (m, 9H). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 11.7, 18.2, 18.6, 18.9, 21.1, 21.3, 22.5, 22.8, 23.8, 25.1, 27.6, 28.0, 29.7, 30.9, 31.2, 35.7, 36.1, 36.3, 36.4, 36.5, 37.6, 38.2, 39.3, 39.5, 42.7, 45.7, 48.2, 53.4, 55.4, 73.2, 122.0, 128.3, 128.4, 129.0, 129.7, 130.0, 131.8, 132.4, 137.6, 137.7, 140.6, 144.5, 170.3, 173.8, 196.4. HRMS (EI): encontrado m/z 681.4495, calculado para C₄₅H₆₁O₅ (M+H)⁺ 681.4514.

6.4.5. Medidas de fotólisis en estado estacionario

6.4.5.1. Fotólisis en estado estacionario de los dioles

Disoluciones de los dioles 7β y 7α-OH-Ch (50 mg, 0.12 mmol) y BZF (35 mg, 0.19 mmol) en acetonitrilo y diclorometano (60 mL) fueron irradiadas en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas en tubos de Pyrex en un fotorreactor multilámpara equipado con lámparas UVB (λ_{max} = 300 nm, distribución gaussiana). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se

purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano acetato de etilo-diclorometano de 95:2.5:2.5 v/v/v) para dar el fotoproducto de desproporción **7-oxo-Ch** con diferentes rendimientos según el sustrato de partida y el disolvente empleado (en acetonitrilo 44 % y 37 % a partir de **7 β -OH-Ch** y **7 α -OH-Ch**, respectivamente; en diclorometano 22 % y 18 % a partir de **7 β -OH-Ch** y **7 α -OH-Ch**, respectivamente).

7-oxo-Ch. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = 0.61 (s, 3H), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.92-2.47 (señal compleja, 27H), 3.60 (m, 1H), 5.62 (m, 1H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ = 12.0, 17.3, 18.9, 21.2, 22.6, 22.8, 23.8, 26.3, 28.0, 28.5, 31.2, 35.7, 36.2, 36.4, 38.3, 38.7, 39.5, 41.8, 43.1, 45.4, 49.9, 50.0, 54.8, 70.5, 126.1, 165.2, 202.4.

6.4.5.2. Fotólisis en estado estacionario de las diadas **KP-7-acetilCh**

Se irradiaron disoluciones de (**R**) y (**S**)-**KP-7- α -acetilCh** (100 mg, 0.15 mmol) en diclorometano anhidro (40 mL) durante 8 horas en tubos Pyrex con una lámpara de mercurio de media presión de 400 W. Transcurrido este tiempo, las mezclas de reacción se concentraron a presión reducida y se sometieron a cromatografía en columna de gel de sílice, usando hexano/ diclorometano/acetato de etilo (85:10:5 v/v/v) como eluyente, proporcionando los fotoproductos **6a** y **6b** a partir de las diadas (**R**) y (**S**)-**KP-7- α -acetilCh**, respectivamente. Ningún fotoproducto fue obtenido a partir de la diada (**S**)-**KP-7- β -acetilCh**.

Fotoproducto 6a. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ = -0.42 (m, 1H), 0.59 (s, 3H), 0.81 (d, J = 6.3 Hz, 6H), 0.85 (s, 3H), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 3H),

1.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.43-1.78 (señal compleja, 22H), 1.94 (s, 3H), 2.22 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 3.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.53 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 5.48 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 7.06 (m, 1H), 7.22-7.37 (m, 6H), 7.68 (m, 1H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 14.3, 17.9, 18.2, 19.9, 20.6, 21.3, 22.6, 22.7, 26.2, 27.5, 28.1, 30.8, 32.4, 35.3, 36.2, 36.3, 37.3, 37.8, 38.3, 39.4, 42.8, 43.7, 43.8, 44.0, 46.1, 55.9, 69.0, 73.1, 82.2, 120.8, 126.3, 126.7, 127.0, 127.2, 127.7, 128.0, 128.4, 141.7, 143.9, 146.5, 148.0, 170.4, 174.8$. HRMS (EI): encontrado m/z 681.4500, calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 681.4514.

Fotoproducto 6b. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) $\delta = -0.45$ (m, 1H), 0.60 (s, 3H), 0.81 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 0.84 (s, 3H), 1.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.46 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.42-1.90 (señal compleja, 22H), 1.95 (s, 3H), 2.22 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 3.70 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 5.47 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.22-7.39 (m, 6H), 7.71 (m, 1H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 14.2, 14.3, 17.9, 20.0, 20.6, 21.3, 22.7, 22.8, 26.2, 27.4, 28.1, 30.8, 32.5, 35.3, 36.3, 36.4, 37.2, 37.6, 38.4, 39.4, 42.9, 43.7, 43.9, 44.0, 45.7, 55.9, 69.1, 73.2, 82.1, 120.4, 122.7, 126.4, 126.8, 127.8, 128.1, 128.3, 128.4, 129.8, 130.0, 138.7, 143.2, 146.9, 148.1, 170.4, 175.6$. HRMS (EI): encontrado m/z 681.4518, calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 681.4514.

6.4.6. Medidas de fotólisis de destello láser (FDL)

Se realizaron estudios de FDL usando como fuente de excitación un láser Nd: YAG ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, aproximadamente 10 ns del pulso láser, 10 mJ / pulso). Las muestras se disolvieron en diclorometano para tener una

absorbancia *ca.* 0.30 a 355 nm, y las soluciones se purgaron por burbujeo de nitrógeno.

6.4.7 Estudios de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP).

Los experimentos de CIDNP se realizaron empleando disoluciones de (*R*)-**KP-7- α -acetilCh** y (*S*)-**KP-7- α -acetilCh** (0.01 M) en CD₂Cl₂, CDCl₃, CD₃CN y C₇D₈.

Capítulo 7. Instrumentación

7.1. Instrumentación general

Los espectros de **resonancia magnética nuclear (RMN)** monodimensionales de protón y carbono (^1H y ^{13}C -RMN) y bidimensionales (HSQC, NOESY) se realizaron en cloroformo deuterado (CDCl_3) en un espectrómetro Varian Bruker de 300 MHz. Los valores del desplazamiento químico son expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios (Hz). Los espectros NOEDIFF se realizaron en CDCl_3 en un espectrómetro Bruker Avance III-400 y Magnet System 400 Ascend/R.

La determinación de la **masa exacta** se realizó mediante un espectrómetro TripleTOF™ 5600 LC/MS/MS System, (AB SCIEX), equipado con una fuente de electrospray. Los datos obtenidos están expresados como relación masa/carga (m/z).

7.2. Instrumentación fotoquímica

Los espectros de **absorción ultravioleta-visible (UV-vis)** se registraron en un espectrofotómetro Cary 300 UV-Vis (UV0811M209, Varian).

Los experimentos de **fotólisis en estado estacionario** se han llevado a cabo utilizando un fotoreactor multilámpara equipado con 8 lámparas UVB ($\lambda_{\text{max}} = 300$ nm, distribución gaussiana) para las irradiaciones intermoleculares y una lámpara de mercurio de media presión de 400 W para las irradiaciones intramoleculares.

Para las irradiaciones con luz monocromática se empleó una lámpara de Xenón de 150 W, que permite el paso de la luz de λ seleccionada con un monocromador.

Para los experimentos de **fotólisis de destello láser (FDL)** a $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ se utilizó un láser pulsado Nd-YAG (L52137V LOTIS TII) con duración de pulso de 10 ns y energía 10 – 15 mJ/pulso. Se empleó una lámpara de Xenón Oriel Lo255 (Statford,CT) como fuente de luz para el análisis de las especies transitorias. El sistema de FDL consiste en un láser pulsado, una lámpara de Xe, un monocromador Oriel 77200, un sistema fotomultiplicador Oriel (PMT) formado por un tubo lateral 77348 PMT, una carcasa 70680 PMT, una fuente de potencia 70705 PMT y un osciloscopio Tektronik TDS-640A. La señal fue transferida a un ordenador personal donde los datos se trataron mediante el programa Onda.

Las medidas de fosforescencia de **oxígeno singlete** se realizaron detectando su luminiscencia (1270 nm) mediante un fotodiodo de germanio Oriel 71614 acoplado a una celda de láser fotólisis con una geometría de ángulo recto. Se utilizó un láser excímero (LEXTRA50 Lambda Physik) para la excitación a 308 nm (excitación láser a 5 energías de bajo pulso para cada molécula). Entre el diodo y la célula se colocaron un filtro de silicio de corte 1050 nm de 5 mm de espesor (5 cm de diámetro) y un filtro de interferencia de 1270 nm. La corriente de salida del fotodiodo se amplificó y se introdujo en un osciloscopio TDS-640A Tektronix a través de un amplificador Co-lineal 150 MHz, 20 dB.

La señal de salida desde el osciloscopio se transfirió a un ordenador personal para su estudio.

Los experimentos de **polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP)** se realizaron en el *Institute of Physical and Theoretical Chemistry* de la *Technical University of Graz* (Austria). Los espectros CIDNP se registraron en un espectrómetro Bruker Avance DPX de 200 MHz. La irradiación se llevó a cabo mediante el uso de un láser Quantel Nd-YAG Brilliant B (10 Hz, 355 nm, *ca.* 90 mJ por pulso, anchura de pulso *ca.* 6 ns). Se utilizó la siguiente secuencia de pulsos: presaturación – pulso del láser – detección del pulso de radiofrecuencia (4 μ s) – decaimiento de inducción libre. Los espectros en la oscuridad, registrados para asegurar la supresión efectiva de las señales de fondo de RMN, se realizaron con la misma secuencia de pulsos sin el destello láser.

Bibliografía

- (1) Boscá, F.; Miranda, M. A.; Morera, I. M.; Samadi, A. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 1.
- (2) Samadi, A.; Martínez, L. A.; Miranda, M. A.; Morera, I. M. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 359.
- (3) Boscá, F.; Miranda, M. A.; Carganico, G.; Mauleon, D. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 96.
- (4) Miranda, M. A.; Martínez, L. A.; Samadi, A.; Bosca, F.; Morera, I. M. *Chem. Commun.* **2002**, 280.
- (5) Agnez-Lima, L. F.; Melo, J. T. A.; Silva, A. E.; Oliveira, A. H. S.; Timoteo, A. R. S.; Lima-Bessa, K. M.; Martínez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Galhardo, R. S.; Menck, C. F. M. *Mutat. Res. Rev. Mutat.* **2012**, *751*, 15.
- (6) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1075.
- (7) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L. *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 9.
- (8) Shahidi, F.; Zhong, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4067.
- (9) Girotti, A. W. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *44*, 956.
- (10) Hawkins, C. L.; Morgan, P. E.; Davies, M. J. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *46*, 965.
- (11) Jensen, R. L.; Arnbjerg, J.; Ogilby, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9820.
- (12) Pattison, D. I.; Rahmanto, A. S.; Davies, M. J. *Photochem. Photobio. S.* **2012**, *11*, 38.
- (13) Miranda, M. A. *Phototoxicity of drug*, **1997**.

- (14) Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1998**, *43*, 1.
- (15) Przybilla, B.; Ring, J.; Schwab, U.; Galosi, A.; Dorn, M.; Braun-Falco, O. *Hautarzt* **1987**, *38*, 18.
- (16) Kurumaji, Y.; Ohshiro, Y.; Miyamoto, C.; Keong, C.-H.; Katoh, T.; Nishioka, K. *Contact Dermatitis* **1991**, *25*, 218.
- (17) Ophaswongse, S.; Maibach, H. *Contact Dermatitis* **1993**, *29*, 57.
- (18) Nabeya, R. T.; Kojima, T.; Fujita, M. *Contact Dermatitis* **1995**, *32*, 52.
- (19) Pigatto, P. D.; Mozzanica, N.; Bigardi, A. S.; Legori, A.; Valsecchi, R.; Cusano, F.; Tosti, A.; Guarrera, M.; Balato, N.; Sertoli, A. *Contact Dermatitis* **1993**, *29*, 39.
- (20) Le Coz, C. J.; Bottlaender, A.; Scrivener, J.-N.; Santinelli, F.; Cribier, B. J.; Edouard, E. H.; Grosshans, M. *Contact Dermatitis* **1998**, *38*, 245.
- (21) Gould, J. W.; Mercurio, M. G.; Elmetts, C. A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1995**, *33*, 551.
- (22) Diffey, B. L.; Daymond, T. J.; Fairgreaves, H. *Rheumatol.* **1983**, *22*, 239.
- (23) Gebhardt, M.; Wollina, U. *Z. Rheumatol.* **1995**, *54*, 405.
- (24) Adamski, H.; Benkalfate, L.; Delaval, Y.; Ollivier, I.; Le Jean, S.; Toubel, G.; Le Hir-Garreau, I.; Chevrant-Breton, J. *Contact Dermatitis* **1998**, *38*, 171.
- (25) Boscá, F.; Marín, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 637.

- (26) Encinas, M. V.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6393.
- (27) Marković, D. Z.; Durand, T.; Patterson, L. K. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 389.
- (28) Dorman, G.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661.
- (29) Prestwich, G. D.; Dormán, G.; Elliott, J. T.; Marecak, D. M.; Chaudhary, A. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 222.
- (30) Marciniak, B.; Hug, G. L.; Bobrowski, K.; Kozubek, H. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13560.
- (31) Artuso, T.; Bernadou, J.; Meunier, B.; Paillous, N. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 407.
- (32) Artuso, T.; Bernadou, J.; Meunier, B.; Piette, J.; Paillous, N. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 205.
- (33) Chouini-Lalanne, N.; Defais, M.; Paillous, N. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 441.
- (34) De Guidi, G.; Giuffrida, S.; Condorelli, G.; Costanzo, L. L.; Miano, P.; Sortino, S. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 455.
- (35) Marguery, M. C.; Chouini-Lalanne, N.; Ader, J. C.; Paillous, N. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 679.
- (36) Agapakis-Caussé, C.; Boscá, F.; Castell, J. V.; Hernández, D.; Marín, M. L.; Marrot, L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 499.
- (37) Starrs, S. M.; Davies, R. J. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 291.
- (38) Condorelli, G.; Costanzo, L. L.; Guidi, G. D.; Giuffrida, S.; Sortino, S. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 155.
- (39) Girotti, A. W. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1529.

- (40) Girotti, A. W. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 497.
- (41) Sevanian, A.; Ursini, F. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 306.
- (42) Montine, T. J.; Neely, M. D.; Quinn, J. F.; Beal, M. F.; Markesbery, W. R.; Roberts II, L. J.; Morrow, J. D. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *33*, 620.
- (43) Porter, N. A. In *Methods Enzymol.*; Academic Press, 1984.
- (44) Porter, N. A. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 262.
- (45) Velosa, A. C.; Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Mano, C. M.; Bechara, E. J. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1162.
- (46) Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J.; Grassa, C.; Martinez, L. A.; Miranda, M. A.; Tarrega, P. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 35.
- (47) Radschweit, A.; Rüttinger, H. H.; Nuhn, P.; Wohlrab, W.; Huschka, C. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 119.
- (48) Porter, N. A.; Wagner, C. R. *Adv. Free Radical Biol. Med.* **1986**, *2*, 283.
- (49) Fujita, H.; Matsuo, I. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1992**, *9*, 203.
- (50) Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jürgens, G. *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *13*, 341.
- (51) Brown, A. J.; Jessup, W. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 111.
- (52) Girotti, A. W. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2001**, *63*, 103.
- (53) Murphy, R. C.; Johnson, K. M. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15521.
- (54) Brown, A. J.; Jessup, W. *Atherosclerosis* **1999**, *142*, 1.
- (55) Fliesler, S. J.; Peachey, N. S.; Richards, M. J.; Nagel, B. A.; Vaughan, D. K. *Arch. Ophthalmol.* **2004**, *122*, 1190.

- (56) Richards, M. J.; Nagel, B. A.; Fliesler, S. J. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 538.
- (57) Vaughan, D. K.; Peachey, N. S.; Richards, M. J.; Buchan, B.; Fliesler, S. J. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82*, 496.
- (58) Rodríguez, I. R.; Larrayoz, I. M. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2847.
- (59) Rodriguez, I. R.; Fliesler, S. J. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1116.
- (60) Porter, F. D.; Scherrer, D. E.; Lanier, M. H.; Langmade, S. J.; Molugu, V.; Gale, S. E.; Olzeski, D.; Sidhu, R.; Dietzen, D. J.; Fu, R.; Wassif, C. A.; Yanjanin, N. M.; Marso, S. P.; House, J.; Vite, C.; Schaffer, J. E.; Ory, D. S. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, 56ra81.
- (61) N A Simonian, a.; Coyle, J. T. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 83.
- (62) Björkhem, I.; Cedazo-Minguez, A.; Leoni, V.; Meaney, S. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 171.
- (63) Schroepfer, G. J. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 361.
- (64) Gamba, P.; Testa, G.; Gargiulo, S.; Staurengi, E.; Poli, G.; Leonarduzzi, G. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*.
- (65) Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5944.
- (66) Miyoshi, N.; Iuliano, L.; Tomono, S.; Ohshima, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 702.
- (67) Girotti, A. W.; Korytowski, W. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1019*, 202.
- (68) Girotti, A. W.; Bachowski, G. J.; Jordan, J. E. *Lipids* **1987**, *22*, 401.

- (69) Ursini, F.; Maiorino, M.; Gregolin, C. *BBA – Gen. Subjects* **1985**, 839, 62.
- (70) Chang, Y. H.; Abdalla, D. S. P.; Sevanian, A. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 23, 202.
- (71) Smith, L. L. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, 44, 87.
- (72) Zielinski, Z. A. M.; Pratt, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 6932.
- (73) Kulig, M. J.; Smith, L. L. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 3639.
- (74) Girotti, A. W. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, 13, 105.
- (75) Nau, W. M.; Cozens, F. L.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2275.
- (76) Pischel, U.; Nau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9727.
- (77) Wagner, P. J.; Truman, R. J.; Puchalski, A. E.; Wake, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7727.
- (78) Leigh, W. J.; Lathioor, E. C.; St. Pierre, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12339.
- (79) Griller, D.; Howard, J. A.; Marriott, P. R.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 619.
- (80) Raumer, M. V.; Suppan, P.; Haselbach, E. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 719.
- (81) Pischel, U.; Zhang, X.; Hellrung, B.; Haselbach, E.; Muller, P.-A.; Nau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2027.
- (82) Gorman, A. A.; Parekh, C. T.; Rodgers, M. A. J.; Smith, P. G. *J. Photochem.* **1978**, 9, 11.
- (83) Parola, A. H.; Cohen, S. G. *J. Photochem.* **1980**, 12, 41.

- (84) Neshchadin, D.; Levinn, R.; Gescheidt, G.; Batchelor, S. N. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16*, 7008.
- (85) Andreu, I.; Neshchadin, D.; Rico, E.; Griesser, M.; Samadi, A.; Morera, I. M.; Gescheidt, G.; Miranda, M. A. *Chem.- Eur. J.* **2011**, *17*, 10089.
- (86) Pischel, U.; Abad, S.; Domingo, L. R.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2531.
- (87) Abad, S.; Boscá, F.; Domingo, L. R.; Gil, S.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7407.
- (88) Bosca, F.; Andreu, I.; Morera, I. M.; Samadi, A.; Miranda, M. A. *Chem. Commun.* **2003**, 1592.
- (89) Breslow, R. *Chem. Rec.* **2001**, *1*, 3.
- (90) Breslow, R.; Baldwin, S.; Flechtner, T.; Kalicky, P.; Liu, S.; Washburn, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3251.
- (91) Breslow, R. *J. Steroid Biochem.* **1979**, *11*, 19.
- (92) Breslow, R.; Corcoran, R. J.; Snider, B. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6791.
- (93) Andreu, I.; Boscá, F.; Sanchez, L.; Morera, I. M.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4597.
- (94) Andreu, I.; Morera, I. M.; Bosca, F.; Sanchez, L.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 860.
- (95) Goetz, M. *Concepts in Magnetic Res.* **1995**, *7*, 69.
- (96) Closs, G. L.; Miller, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1639.
- (97) Closs, G. L.; Miller, R. J.; Redwine, O. D. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 196.

- (98) Post, S. M.; Twisk, J.; van der Fits, L.; de Wit, E. C.; Hoekman, M. F.; Mager, W. H.; Princen, H. M. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 339.
- (99) Smith, L. L. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 47.
- (100) Lercker Giovanni, R.-E. T. *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*, CRC Press, **2002**.
- (101) Girotti, A. W.; Kriska, T. *Antioxid. Redox Sign.* **2004**, *6*, 301.
- (102) Foote, C. S. *Free Radicals In Biology*, William Prior Ed., **1976**.
- (103) Girotti, A. W.; Korytowski, W. In *Methods Enzymol.*; Academic Press: **2000**, *319*, 85.
- (104) Martínez, L. J.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11066.
- (105) Carmichael, I.; Hug, G. L. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*, 1.
- (106) Foerster, E. W.; Grellmann, K. H.; Linschitz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3108.
- (107) Gardner, H. W. *Free Radical Biol. Med.* **1989**, *7*, 65.
- (108) Scaiano, J. C.; McGimpsey, W. G.; Leigh, W. J.; Jakobs, S. J. *Org. Chem.* **1987**, *52*, 4540.
- (109) Noguchi, N.; Numano, R.; Kaneda, H.; Niki, E. *Free Radical Res.* **1998**, *29*, 43.
- (110) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- (111) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.
- (112) Kaptein, R.; Oosterhoff, L. J. *Chem. Phys. Lett.* **1969**, *4*, 214.
- (113) Gerson, F.; Huber, W. *Electron Spin Resonance Spectroscopy for Organic Chemists*; John Wiley & Sons, **2003**.

- (114) Andreu, I.; Palumbo, F.; Tilocca, F.; Morera, I. M.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4096.
- (115) Sun, Q.; Cai, S.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 567.
- (116) Freiberg, L. A. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2476.
- (117) Kan, C. C.; Yan, J.; Bittman, R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1866.
- (118) Schäfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829.
- (119) Neshchadin, D.; Palumbo, F.; Sinicropi, M. S.; Andreu, I.; Gescheidt, G.; Miranda, M. A. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1608.
- (120) Encinas, S.; Miranda, M. A.; Marconi, G.; Monti, S. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 633.
- (121) Encinas, S.; Miranda, M. A.; Marconi, G.; Monti, S. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 420.
- (122) Andreu, I.; Morera, I.; Palumbo, F.; Sastre, G.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4035.
- (123) Aloïse, S.; Ruckebusch, C.; Blanchet, L.; Réhault, J.; Buntinx, G.; Huvenne, J.-P. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 224.
- (124) Rodgers, M. A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6201.
- (125) Vever-Bizet, C.; Dellinger, M.; Brault, D.; Rougee, M.; Bensasson, R. V. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 321.
- (126) Yan, J. S.; Bittman, R. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 160.
- (127) Nonell, S.; González, M.; Trull, F. R. *Afinidad* **1993**, *50*, 445.
- (128) Buttari, B.; Segoni, L.; Profumo, E.; D'Arcangelo, D.; Rossi, S.; Facchiano, F.; Businaro, R.; Iuliano, L.; Riganò, R. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 130.
- (129) Poli, G.; Biasi, F.; Leonarduzzi, G. *Redox Biology* **2013**, *1*, 125.

- (130) Palumbo, F.; Bosca, F.; Morera, I. M.; Andreu, I.; Miranda, M. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1196.
- (131) Poza, J.; Rega, M.; Paz, V.; Alonso, B.; Rodríguez, J.; Salvador, N.; Fernández, A.; Jiménez, C. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4722.
- (132) Poza, J. J.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 3960.
- (133) Yurkovskaya, A.; Morozova, O.; Gescheidt, G. In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*; John Wiley & Sons, **2012**.

Conclusiones

Conclusiones

De la presente tesis doctoral, que estudia el proceso de abstracción de hidrógeno (AH) en derivados fotoactivos del colesterol (Ch), se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Sobre la influencia del disolvente en la abstracción de hidrógenos alílicos en el Ch, por el estado excitado triplete de la benzofenona (BZF):

1.1- En la versión intermolecular del proceso, la AH en la posición C-7 del Ch por el estado excitado triplete de la BZF muestra una significativa dependencia del disolvente. Concretamente, en diclorometano no se generan fotoproductos, mientras que en acetonitrilo se obtienen dos fotoproductos diastereoisoméricos.

1.2.- En la versión intramolecular, medidas cinéticas de sistemas en los que el Ch está unido covalentemente al ketoprofeno (KP) revelan importantes efectos del disolvente y una significativa estereodiferenciación en el proceso de AH.

2.- Sobre los factores topológicos implicados en el proceso de HA intramolecular en diadas conteniendo aminocolesteno (NH₂Ch) unido covalentemente al KP:

2.1- El estudio fotoquímico de las diadas (*S*) y (*R*)-KP-NHCh demuestra la formación de productos de acoplamiento C-C, a través de AH intramolecular a partir de los correspondientes birradicales. Además, se observa una importante estereodiferenciación en el proceso de AH intramolecular.

2.2- Las diadas muestran una diferente fotorreactividad; así, la diada (*R*)-KP-NHCh es más fotoestable que su diastereoisómero (*S*)-KP-NHCh.

- 2.3- Experimentos de polarización nuclear dinámica inducida químicamente (CIDNP) confirman la formación de birradicales mediante una transferencia de hidrógeno intramolecular muy eficiente entre el aminocolesteno y la benzofenona en las diadas (*S*)-KP-NHCh y (*R*)-KP-NHCh.
- 2.4- La orientación específica de los grupos reactivos es decisiva para la reacción de AH. Así, estos factores topológicos pueden jugar un papel importante en las membranas celulares, donde el Ch es más propenso a la oxidación que los ácidos grasos poliinsaturados circundantes.
- 3.- Sobre la influencia de la naturaleza electrónica (π, π^*) del estado excitado triplete del 2-benzotiofeno (BZT) en el proceso de AH en sistemas suprofeno-colesterol (SP-Ch):
- 3.1- Experimentos de fotólisis en estado estacionario de las diadas (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch revelan la fotogeneración de productos de acoplamiento C-C *via* AH en C-7. Aunque no es posible detectar los correspondientes birradicales mediante fotólisis de destello láser, su generación es demostrada por la formación de dichos fotoproductos.
- 3.2- Estudios de emisión en tiempo resuelto en el infrarrojo cercano indican que las diadas (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch son desactivadas por el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete.
- 3.3- Las diadas (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch son modelos adecuados para estudiar ambos tipos de oxidación del Ch (Tipo I y Tipo II) ya que se generan tanto birradicales tras un proceso de AH intramolecular como oxígeno singlete.

4. Sobre el proceso de AH en la posición C-4 del Ch en oxisteroles unidos covalentemente al KP a través del grupo OH de la posición 7 (α y β):

4.1- Estudios fotoquímicos de las diadas (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetilCh evidencian la oxidación del Ch en C-4 a través de un proceso de AH, obteniéndose dos fotoproductos de acoplamiento C-C en la posición 4. Por el contrario, la diada (*S*)-KP-7- β -acetilCh no da lugar a la formación de ningún fotoproducto.

4.2- Las diadas (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetilCh muestran una significativa estereodiferenciación en el proceso de AH intramolecular en la posición C-4 del Ch.

4.3- Experimentos de CIDNP demuestran la formación de los birradicales generados mediante AH en C-4 en las diadas (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetilCh.

4.4- En la versión intermolecular del proceso, se observa una significativa influencia del disolvente y una importante estereodiferenciación entre los oxisteroles 7β y 7α -OH-Ch en la fotogeneración del producto 7-oxo-Ch. Así, los rendimientos obtenidos para 7-oxo-Ch en acetonitrilo son más altos que en diclorometano. Además, el rendimiento de formación del fotoproducto 7-oxo-Ch es mayor a partir del oxisterol 7β -OH-Ch.

Conclusions

This Doctoral Thesis deals with the hydrogen abstraction (HA) for photoactive cholesterol (Ch) derivatives. The conclusions of each chapter can be summarized as follows:

1.- Related to the solvent effects on abstraction of the Ch C-7 allylic hydrogens by the triplet excited state of benzophenone (BZF):

1.1- In the intermolecular version of the process, HA from the C-7 position of Ch by BZF triplet excited state shows a significant dependence on the solvent. In particular, in dichloromethane no photoproducts are obtained, whereas in acetonitrile two diastereoisomeric products are isolated.

1.2- In the intramolecular version, kinetic measurements of systems where Ch is covalently linked to ketoprofen (KP) reveal important solvent effects and significant stereodifferentiation in the HA process.

2.- Related to topological factors involved in the intramolecular HA process in covalently linked benzophenone – aminocholestene dyads:

2.1- Photochemical studies of the dyads (*S*) and (*R*)-KP-NHCh demonstrate C-C coupling products formation from their corresponding biradicals *via* intramolecular HA. Moreover, a significant stereodifferentiation in the intramolecular HA process is observed.

2.2- The dyads show a different photoreactivity; thus, (*R*)-KP-NHCh is more photostable than its diastereoisomer (*S*)-KP-NHCh.

2.3- Chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP) experiments confirm biradicals formation by a very efficient

hydrogen atom transfer between the NH₂Ch and BZF moieties of dyads (*S*) and (*R*)-KP-NHCh.

2.4- The specific orientation of reactants is decisive for the HA reaction. Topological factors can play a significant role in cell membranes, where Ch is more prone to oxidation than the surrounding polyunsaturated fatty acids.

3.- Related to the influence of the electronic nature (π,π^*) of 2-benzoylthiophene triplet excited state in the HA process in suprofen – cholesterol (SP-Ch) systems:

3.1- Steady-state photolysis experiments of dyads (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch reveal C-C coupling products photogeneration by HA in C-7. Although it is not possible to detect the biradical species by means of laser flash photolysis, its generation is demonstrated by obtaining such photoproducts.

3.2- Time-resolved near infrared emission studies indicate that dyads (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch are quenched by molecular oxygen to generate singlet oxygen.

3.3- Dyads (*S*) y (*R*)-SP- α -Ch are suitable models to study both types (I and II) of Ch oxidation, since they are capable to photogenerate both biradicals and singlet oxygen.

4.- Related to HA process at position C-4 of Ch in oxysterols covalently linked to KP through the OH group at position 7 (α or β):

4.1- Photochemical studies of dyads (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetylCh prove Ch oxidation at C-4 through a HA process, by obtaining two C-C coupling photoproducts at position 4. Conversely, the dyad (*S*)-KP-7- β -acetylCh does not give rise to any photoproduct.

4.2- Dyads (*R*) and (*S*)-KP-7- α -acetylCh exhibit a significant stereodifferentiation in the intramolecular HA reaction from C-4.

4.3- CIDNP experiments demonstrate the formation of biradicals generated by C-4 HA in dyads (*R*) y (*S*)-KP-7- α -acetylCh.

4.4- In the intermolecular version of the process, a relevant influence of the solvent and an important stereodifferentiation between oxysterols 7β y 7α -OH-Ch in the photogeneration of the photoproduct 7-oxo-Ch is observed. Thus, in acetonitrile the obtained yields for 7-oxo-Ch are higher than in dichloromethane. Moreover, formation yield of the photoproduct 7-oxo is higher from 7β -OH-Ch oxysterol.

Resúmenes

Resumen en castellano

La peroxidación lipídica (PL) es un proceso mediante el cual diversas especies reactivas atacan los lípidos de la membrana celular, promoviendo su degradación oxidativa. En diferentes estudios se ha demostrado que la PL puede producirse por radiación ultravioleta de tipo A en combinación con agentes fotosensibilizantes, los cuales al absorber luz pueden inducir una alteración física o química en otra entidad molecular. Entre estos agentes se encuentran algunos fármacos fotoactivos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) del grupo de los ácidos 2-arilpropiónicos, tales como el ketoprofeno (KP), el ácido tiaprofénico (TPA) y el suprofeno (SP). Estos fármacos poseen un grupo cromóforo diarilcetónico y un centro estereogénico en la cadena carbonada. Así, el KP contiene el cromóforo benzofenona (BZF) y muestra un estado excitado triplete de más baja energía de tipo n,π^* , mientras que el TPA y SP incluyen el cromóforo 2-benzotiofeno (BZT) y poseen un estado excitado triplete de más baja energía de tipo π,π^* .

El colesterol (Ch) es un componente esencial de las membranas plasmáticas, ya que garantiza la fluidez y la correcta permeabilidad de la bicapa lipídica. La oxidación del Ch en las membranas celulares está asociada con enfermedades como la aterosclerosis y el Alzheimer. Este proceso se produce a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, generando diferentes oxisteroles que se usan como marcadores biológicos para el estrés oxidativo. Los mecanismos no enzimáticos de la oxidación del Ch se dividen en dos categorías: Tipo I (en el que el paso clave es la abstracción de un átomo de hidrógeno alílico por especies reactivas, tales como radicales hidroxilo, alcoxilo y

peroxilo o tripletes de compuestos carbonílicos) y Tipo II (mediada por oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$). El sitio preferido para la abstracción de hidrógeno (AH) en el Ch es la posición alílica en el carbono 7 donde el enlace C-H es relativamente débil. Sin embargo, muy recientemente, se ha demostrado que la AH, aunque en menor grado, puede afectar también a la posición alílica C-4.

Los estados excitados de los cromóforos BZF y BZT se han usado como modelos en reacciones de radicales libres biológicamente relevantes. Con estas premisas, en la presente tesis doctoral se estudia la influencia de distintos factores (efecto del disolvente, factores topológicos, naturaleza electrónica del estado excitado triplete) involucrados en el proceso de AH en el Ch por tripletes de arilcetonas. Además, se investiga la fotooxidación del Ch por AH en la posición C-4. Para lograr los objetivos propuestos, se han combinado estudios de fotólisis en estado estacionario, fotólisis de destello láser (FDL) y foto-polarización nuclear dinámica inducida químicamente (foto-CIDNP).

En primer lugar, se ha estudiado la influencia del disolvente en la abstracción de los hidrógenos alílicos en la posición C-7 del Ch por el estado excitado triplete de la BZF. En la versión intermolecular del proceso, esta AH ha mostrado una significativa dependencia del disolvente. Asimismo, en la versión intramolecular, medidas cinéticas de sistemas en los que el Ch está unido covalentemente al KP han revelado importantes efectos del disolvente y una significativa estereodiferenciación en el proceso de AH.

Posteriormente, se ha investigado la importancia de los factores topológicos implicados en la AH intramolecular en diadas conteniendo

aminocolesteno (NH₂Ch) unido covalentemente al KP. En particular, se ha demostrado la formación de productos de acoplamiento C-C, a través de AH intramolecular a partir de los correspondientes birradicales. Además, se ha observado también una importante estereodiferenciación y una diferente fotorreactividad de las diadas. Estudios de CIDNP han confirmado la formación de los birradicales y cálculos teóricos han permitido determinar la orientación específica de los grupos reactivos, que es decisiva para la reacción de AH. Así, los factores topológicos pueden jugar un papel importante en las membranas celulares, donde el Ch es más propenso a la oxidación que los ácidos grasos poliinsaturados circundantes.

Otro factor que puede influenciar el proceso de AH en el Ch es la naturaleza electrónica del estado excitado triplete implicado (n,π^* o π,π^*). En este sentido, se ha estudiado cómo influye el triplete del BZT de naturaleza π,π^* en el proceso de AH en sistemas SP-Ch. Una vez más, experimentos de fotólisis en estado estacionario han revelado la fotogeneración de productos de acoplamiento C-C *via* AH en C-7. Paralelamente, estudios de emisión en tiempo resuelto en el infrarrojo cercano indican que las diadas SP-Ch son desactivadas por el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete. Por lo expuesto anteriormente, estos sistemas son modelos adecuados para estudiar ambos tipos de oxidación del Ch (Tipo I y Tipo II) ya que son capaces de generar tanto birradicales tras un proceso de AH intramolecular como oxígeno singlete.

Por último, se ha investigado el proceso de AH en la posición C-4 del Ch en oxiesteroles unidos covalentemente al KP a través del grupo OH de la posición 7 (α y β). Así, la oxidación del Ch en C-4 a través de

un proceso de AH, ha sido demostrada mediante la obtención de dos fotoproductos de acoplamiento C-C en dicha posición. La formación de los birradicales correspondientes ha sido confirmada mediante experimentos de CIDNP. En la versión intermolecular del proceso, se ha observado una significativa influencia del disolvente y una importante estereodiferenciación entre los oxisteroles 7-OH-Ch en la fotogeneración del producto 7-oxo-Ch.

Resum en valencià

La peroxidació lipídica (PL) és un procés per mitjà del qual diverses espècies reactives ataquen els lípids de la membrana cel·lular, promovent la seua degradació oxidativa. En diferents estudis s'ha demostrat que la PL pot produir-se per radiació ultravioleta de tipus A en combinació amb agents fotosensibilitzants, els quals a l'absorbir llum poden induir una alteració física o química en una altra entitat molecular. Entre estos agents es troben alguns fàrmacs fotoactius com els antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) del grup dels àcids 2-arilpropionics, com el ketoprofèn (KP), l'àcid tiaprofènic (TPA) i el suprofèn (SP). Estos fàrmacs posseïxen un grup cromòfor diarilcetònic i un centre estereogènic en la cadena carbonada. Així, el KP conté el cromòfor benzofenona (BZF) i mostra un estat excitat triplete de més baixa energia de tipus n,π^* , mentres que el TPA i el SP inclouen el cromòfor 2-benzoiltiofeno (BZT) i tenen un estat excitat triplet de més baixa energia de tipus π,π^* .

El colesterol (Ch) és un component essencial de les membranes plasmàtiques, ja que garanteix la fluïdesa i la correcta permeabilitat de la bicapa lipídica. L'oxidació del Ch en les membranes cel·lulars està associada amb malalties com l'ateroesclerosi i l'Alzheimer. Aquest procés es produït a través de mecanismes enzimàtics i no enzimàtics, generant diferents oxisterols que s'usen com a marcadors biològics per a l'estrés oxidatiu. Els mecanismes no enzimàtics de l'oxidació del Ch es divideixen en dos categories: Tipus I (en el que el pas clau és l'abstracció d'un àtom d'hidrogen al·lílic per espècies reactives, com son els radicals hidroxil, alquilo, alcoxilo i peroxilo o tripletes de compostos carbonílics)

i Tipus II (mediada per l'oxigen singlet, $^1\text{O}_2$). El lloc preferit per a l'abstracció d'hidrogen (AH) en el Ch és la posició al·lílica en el carboni 7 on l'enllaç CH és relativament dèbil. No obstant això, molt recentment, s'ha demostrat que l'AH, encara que en menor grau, pot afectar també la posició al·lílica C-4.

Els estats excitats dels cromòfors BZF i BZT s'usen com a models en reaccions de radicals lliures biològicament rellevants en les que està implicat el procés d'AH. Amb aquestes premisses, en la present tesi doctoral s'estudia la influència de diversos factors (efecte del dissolvent, factors topològics, naturalesa electrònica de l'estat excitat triplet) involucrats en el procés d'AH en el Ch per triplets d'arilcetones. A més, s'investiga la fotooxidació del Ch per AH en la posició C-4. Per aconseguir els objectius proposats, s'han combinat estudis de fotòlisi en estat estacionari, fotòlisi de flaix làser i foto-polarització nuclear dinàmica induïda químicament (foto-CIDNP).

En primer lloc, s'ha estudiat la influència del dissolvent en l'abstracció dels hidrògens al·lílics en la posició C-7 del Ch per l'estat excitat triplet de la BZF. En la versió intermolecular del procés, esta AH ha mostrat una significativa dependència del dissolvent. Així mateix, en la versió intramolecular, mesures cinètiques de sistemes en què el Ch està unit covalentment al KP han revelat importants efectes del dissolvent i una significativa estereodiferenciació en el procés d'AH.

Posteriorment, s'ha investigat la importància dels factors topològics implicats en la AH intramolecular en diades contenint aminocolesteno unit covalentment al KP. En particular, s'ha demostrat la formació de productes d'acoblament C-C, a través d'AH intramolecular a

partir dels corresponents biradicals. A més, s'ha observat també una important estereodiferenciació i una diferent fotoreactivitat de les diades. Estudis de CIDNP han confirmat la formació dels biradicals i càlculs teòrics han permès determinar l'orientació específica dels grups reactius, que és decisiva per a la reacció d'AH. Així, els factors topològics poden jugar un paper important en les membranes cel·lulars, on el Ch és més propens a l'oxidació que els àcids grassos poliinsaturats circumdants.

Un altre factor que pot influenciar el procés d'AH en el Ch és la naturalesa electrònica de l'estat excitat triplet implicat (n,π^* o π,π^*). En aquest sentit, s'ha estudiat com influeix el triplet del BZT de naturalesa π,π^* en el procés d'AH en sistemes SP-Ch. Una vegada més, experiments de fotòlisi en estat estacionari han revelat la fotogeneració de productes d'acoblament C-C via AH en C-7. Paral·lelament, estudis d'emissió en temps resolt en l'infraroig pròxim indiquen que les diades SP-Ch són desactivades per l'oxigen molecular per a generar 1O_2 . Pel que exposa anteriorment, estos sistemes són models adequats per a estudiar ambdós tipus d'oxidació del Ch (Tipus I i Tipus II) ja que són capaços de generar tant biradicals després d'un procés d'AH intramolecular com 1O_2 .

Finalment, s'ha investigat el procés d'AH en la posició C-4 del Ch en oxisterols units covalentment al KP a través del grup OH de la posició 7 (α i β). Així, l'oxidació del Ch en C-4 a través d'un procés d'AH, ha sigut demostrada per mitjà de l'obtenció de dos fotoproductes d'acoblament C-C en la dita posició. La formació dels biradicals corresponents ha sigut confirmada per mitjà d'experiments de CIDNP. En la versió intermolecular del procés, s'ha observat una significativa

influència del dissolvent i una important estereodiferenciació entre els oxisterols 7-OH-Ch en la fotogeneració del producte 7-oxo-Ch.

Summary

Lipid peroxidation (LP) is a process by which a variety of reactive species attack membrane cell lipids, promoting their oxidative degradation. In several studies, it has been demonstrated that LP can be produced by type A ultraviolet radiation in combination with photosensitizing agents, which can induce a physical or chemical alteration in another molecular entity upon light absorption. Among these agents there are some photoactive drugs like nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) of the 2-arylpropionic acids group, such as ketoprofen (KP), tiaprofenic acid (TPA) and suprofen (SP). These drugs have a diarylketone chromophore and a chiral center in the carbon chain. Thus, KP contains the benzophenone (BZF) chromophore and displays a n,π^* triplet excited state, whereas TPA and SP include the 2-benzoylthiophene (BZT) chromophore and have a π,π^* lowest-lying triplet excited state.

Cholesterol (Ch) is an essential structural component of cell membranes, where it is required to achieve proper permeability and fluidity. Ch oxidation in cell membranes is associated with diseases such as atherosclerosis and Alzheimer's. This process occurs by enzymatic and non-enzymatic mechanisms, generating different oxysterols used as biological markers for oxidative stress. Non-enzymatic Ch oxidation mechanisms can be classified into two major groups: Type I (in which the key step is an allylic hydrogen atom abstraction by reactive species such as hydroxyl, alkyl, alkoxy or peroxy radicals, and carbonyl triplets) and Type II (mediated by singlet oxygen, 1O_2). The preferred site for hydrogen abstraction (HA) in Ch is at carbon C7, where the C–H

bond is relatively weak. However, quite recently, it has been demonstrated that HA may also affect to a lesser extent the allylic C-4 position.

Photoexcited BZF and BZT are often used as appropriate models for biologically relevant free radicals in reactions where HA is involved. With this background, in this thesis the influence of different factors (solvent effect, topological factors, electronic nature of the triplet excited state) involved in the HA process of Ch by aryl ketone triplets has been studied. Moreover, Ch photooxidation by HA is investigated in the C-4 position. The proposed objectives were achieved by combining steady-state photolysis, laser flash photolysis and photo-chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP) experiments.

First, the solvent effects on abstraction of the Ch C-7 allylic hydrogens by the triplet excited state of BZF have been studied. In the intermolecular version of the process, HA in the C-7 position of Ch from BZF triplet excited state showed a significant dependence on the solvent. Also, in the intramolecular version, kinetic measurements of systems where Ch is covalently linked to KP revealed important solvent effects and a significant stereodifferentiation in the HA process.

Subsequently, the importance of topological factors involved in intramolecular HA in covalently linked benzophenone – aminocholestene dyads has been investigated. In this regard, the formation of C-C coupling products from their corresponding biradicals *via* intramolecular HA has been demonstrated. Furthermore, an important stereodifferentiation and a different photoreactivity of dyads are also observed. CIDNP experiments have confirmed biradicals generation, and

theoretical calculations have allowed to determine the specific orientation of the two moieties of the dyads, which resulted decisive for the HA reaction. Thus, topological factors can play a significant role in cell membranes, where Ch is more prone to oxidation than the surrounding polyunsaturated fatty acids.

The HA process can also be influenced by the electronic nature of the involved triplet excited state (n,π^* or π,π^*). In this regard, it has been studied how the electronic nature (π,π^*) of the BZT triplet excited state affects the HA process in SP-Ch systems. Again, steady-state photolysis experiments revealed the photogeneration of C-C coupling products *via* HA at C-7. In parallel, time-resolved near infrared emission studies indicated that dyads SP-Ch are quenched by molecular oxygen to generate $^1\text{O}_2$. For these reasons, these systems are suitable models for studying both types (I and II) of Ch oxidation, since they are capable to photogenerate both biradicals and $^1\text{O}_2$.

Finally, HA at position C-4 of Ch in oxysterols covalently linked to KP through the OH group at position 7 (α or β) has been studied. Thus, C-4 Ch oxidation *via* HA has been demonstrated by obtaining C-C coupling photoproducts in this position. CIDNP experiments demonstrated the formation of the corresponding biradicals. Otherwise, in the intermolecular version of the process, a significant solvent effect and a higher stereodifferentiation between oxysterols 7-OH-Ch have been observed.

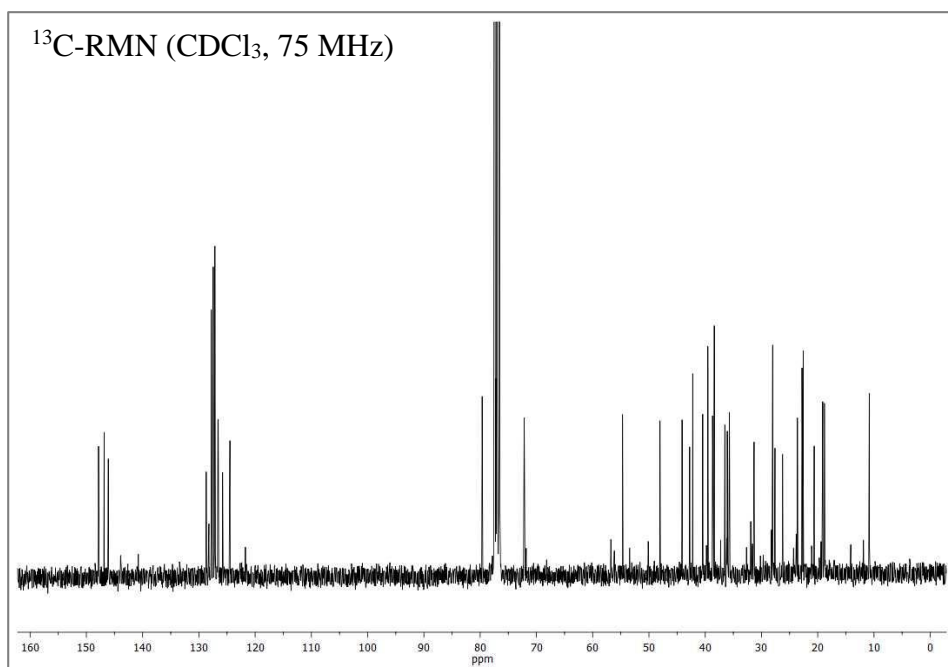
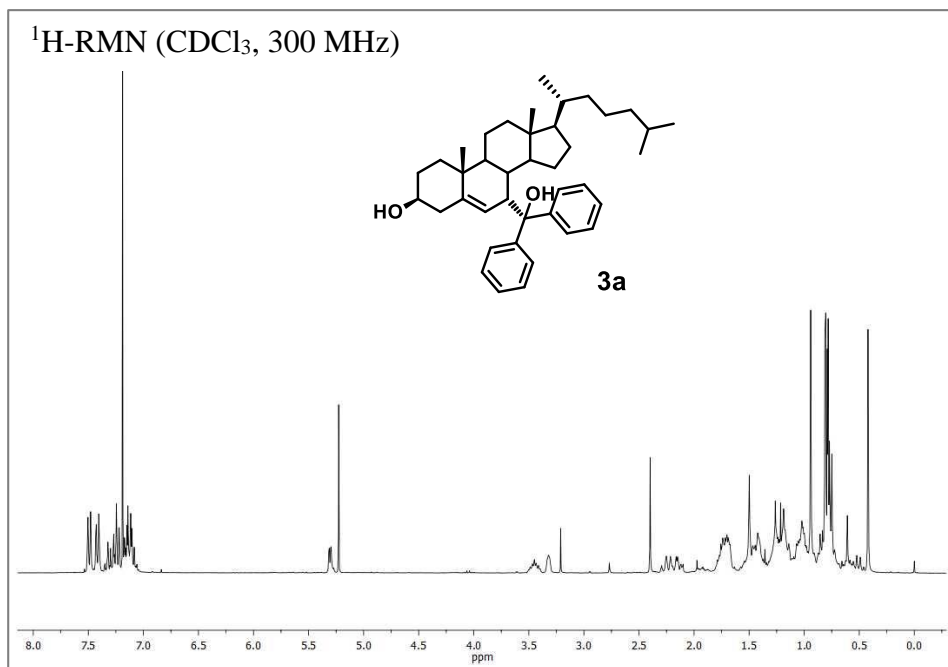
Anexo I

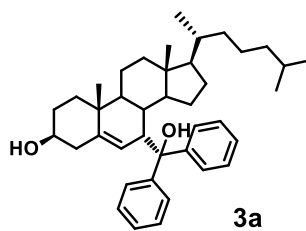
Espectros de RMN mono y bidimensionales

Índice Anexo I:

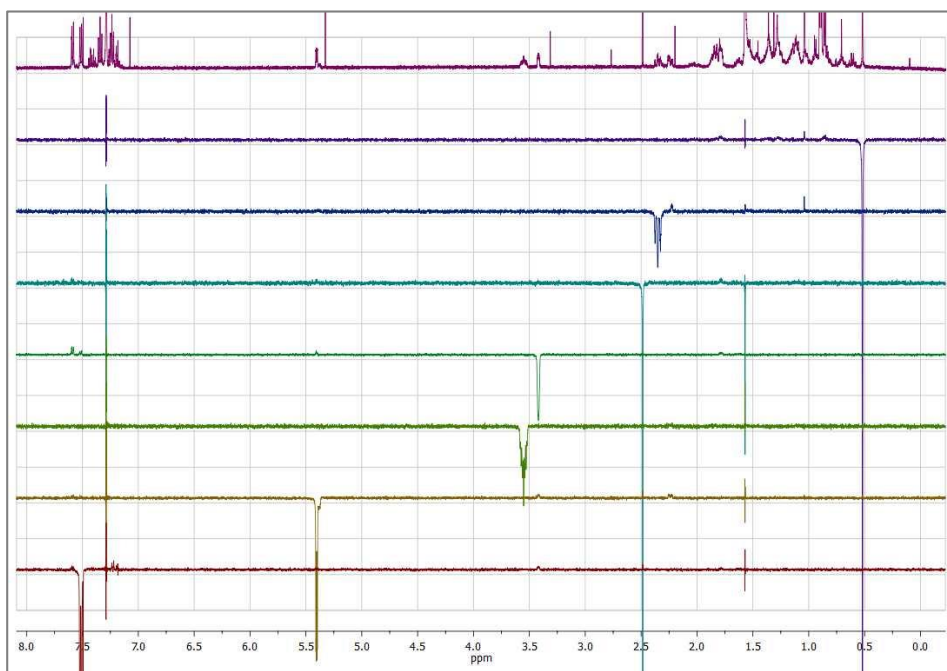
¹H y ¹³C-RMN de 3a.....	175
NOEDIFF de 3a.....	176
¹H y ¹³C-RMN de 3b.....	177
NOEDIFF de 3b.....	178
¹H-RMN de MsCh.....	179
¹H-RMN de N₃Ch.....	179
¹H y ¹³C-RMN de NH₂Ch.....	180
¹H y ¹³C-RMN de (S)-KP-NHCh.....	181
¹H y ¹³C-RMN de (R)-KP-NHCh.....	182
¹H y ¹³C-RMN de 4a.....	183
¹H y ¹³C-RMN de 4b.....	184
¹H y ¹³C-RMN de 4c.....	185
¹H y ¹³C-RMN de 4d.....	186
¹H-RMN de α-Ch.....	187
¹H y ¹³C-RMN de (S)-SP-α-Ch.....	188
¹H y ¹³C-RMN de (R)-SP-α-Ch.....	189
¹H y ¹³C-RMN de (S)-SP-β-Ch.....	190
¹H y ¹³C-RMN de 5a.....	191
DEPT y HSQC de 5a.....	192
NOEDIFF de 5a.....	193
¹H y ¹³C-RMN de 5b.....	194
DEPT y HSQC de 5b.....	195
NOEDIFF de 5b.....	196
¹H y ¹³C-RMN de 7-oxo-acetilCh.....	197

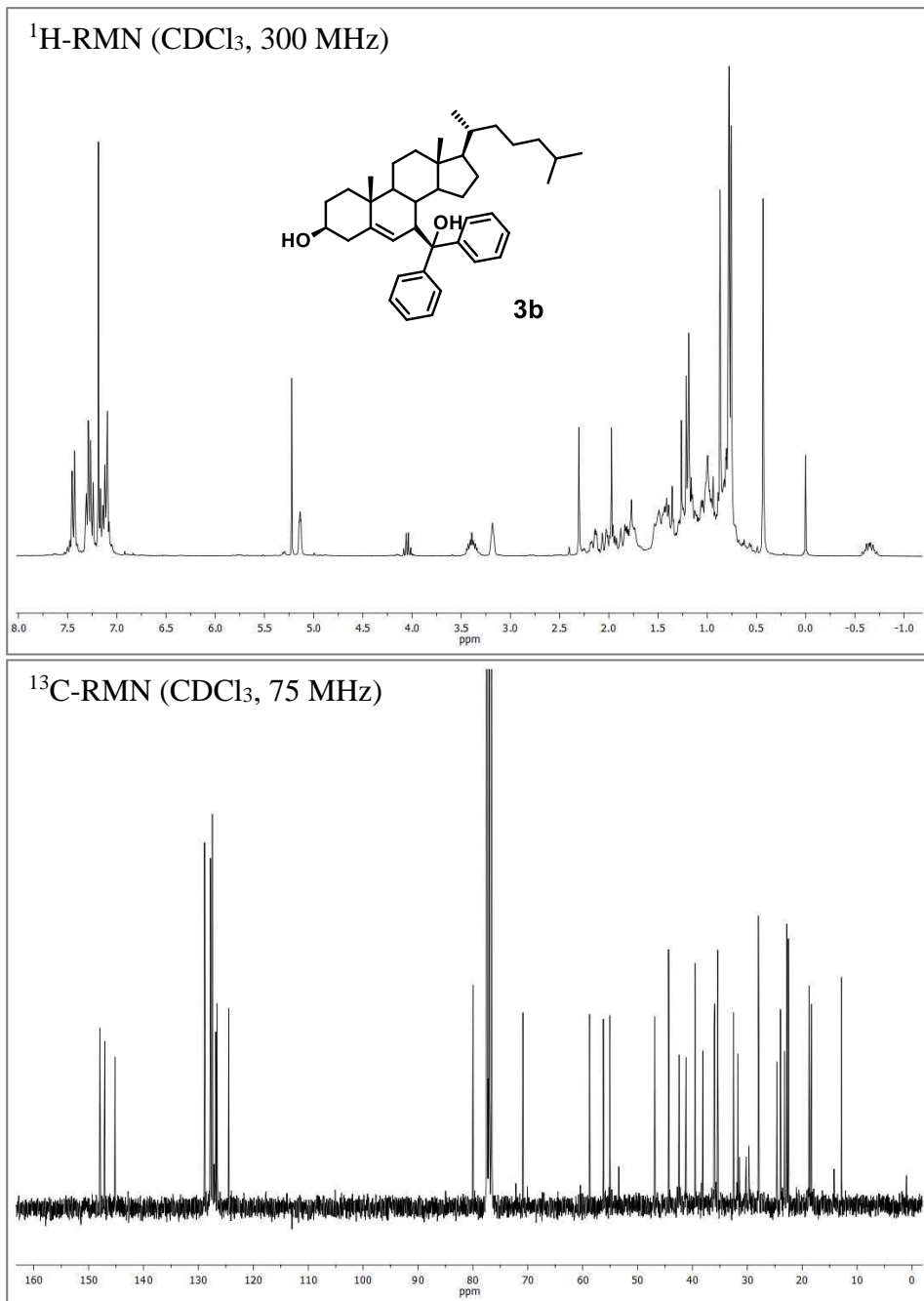
^1H y ^{13}C -RMN de 7β -OH-Ch.....	198
^1H y ^{13}C -RMN de 7α -OH-Ch.....	199
^1H y ^{13}C -RMN de 7α -OH-acetilCh.....	200
^1H y ^{13}C -RMN de 7β -OH-acetilCh.....	201
^1H y ^{13}C -RMN de (<i>R</i>)-KP- 7α -acetilCh.....	202
DEPT de (<i>R</i>)-KP- 7α -acetilCh.....	203
^1H y ^{13}C -RMN de (<i>S</i>)-KP- 7α -acetilCh.....	204
DEPT de (<i>S</i>)-KP- 7α -acetilCh.....	205
^1H y ^{13}C -RMN de (<i>S</i>)-KP- 7β -acetilCh.....	206
DEPT de (<i>S</i>)-KP- 7β -acetilCh.....	207
^1H y ^{13}C -RMN de 7-oxo-Ch.....	208
DEPT de 7-oxo-Ch.....	209
^1H y ^{13}C -RMN de 6a.....	210
DEPT y HSQC de 6a.....	211
NOESY de 6a.....	212
^1H y ^{13}C -RMN de 6b.....	213
DEPT y HSQC de 6b.....	214
NOESY de 6b.....	215

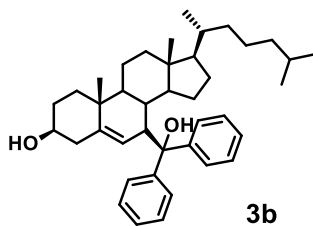




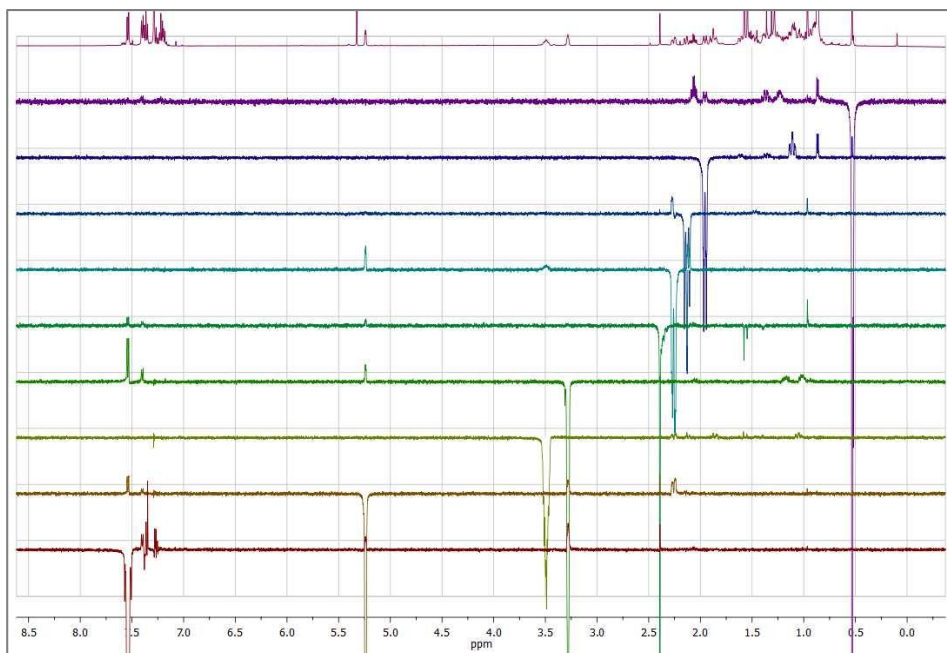
NOEDIFF (CDCl₃)

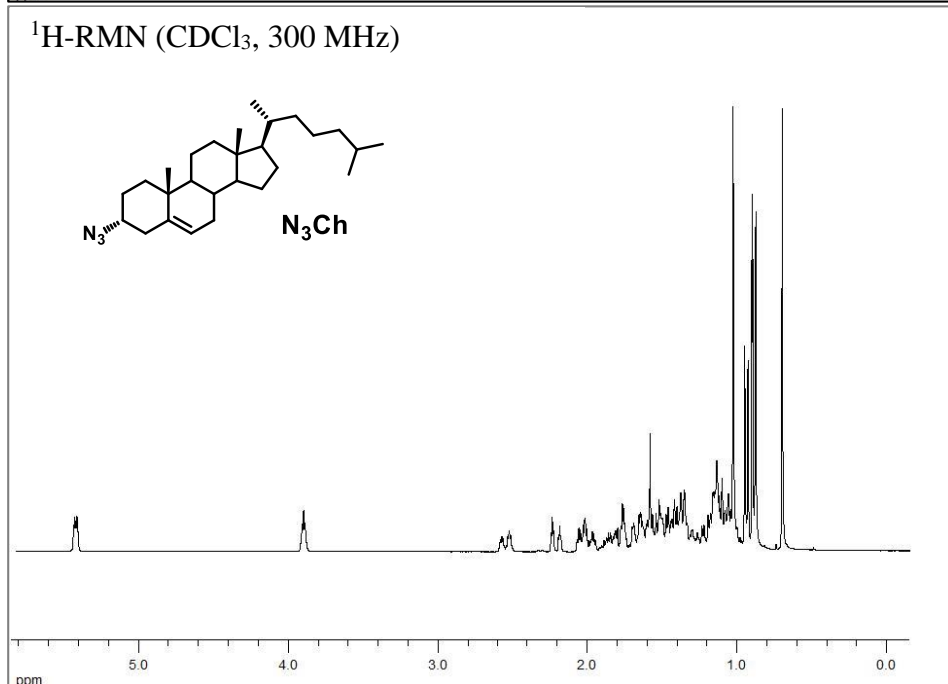
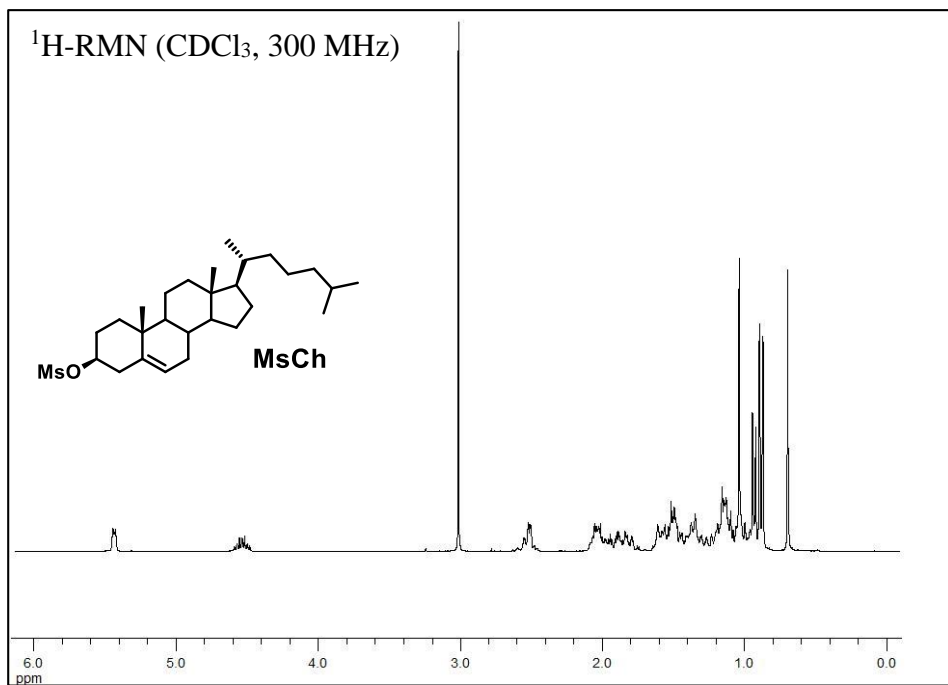


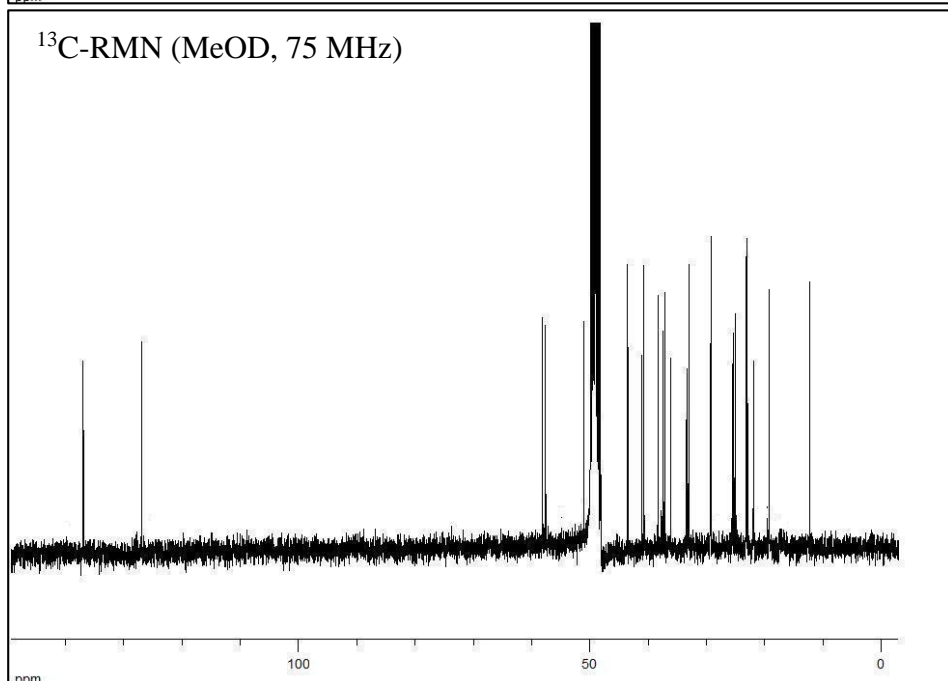
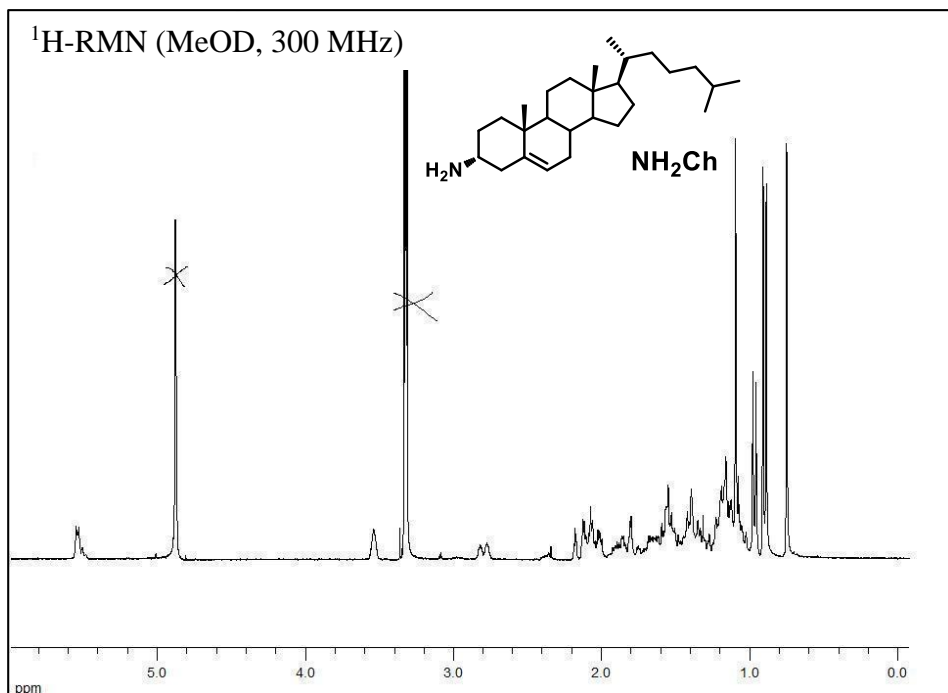


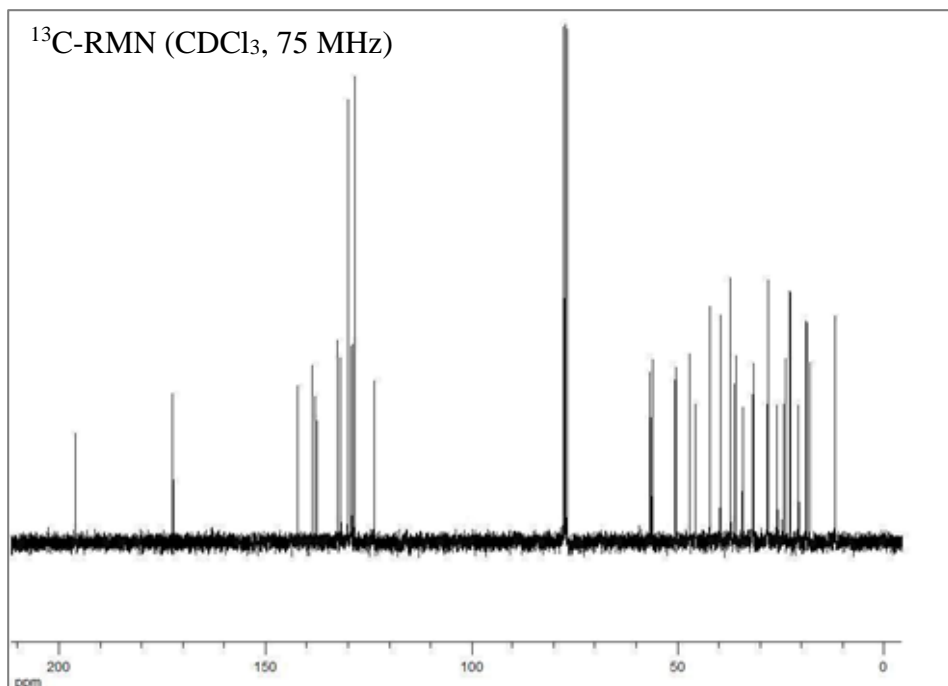
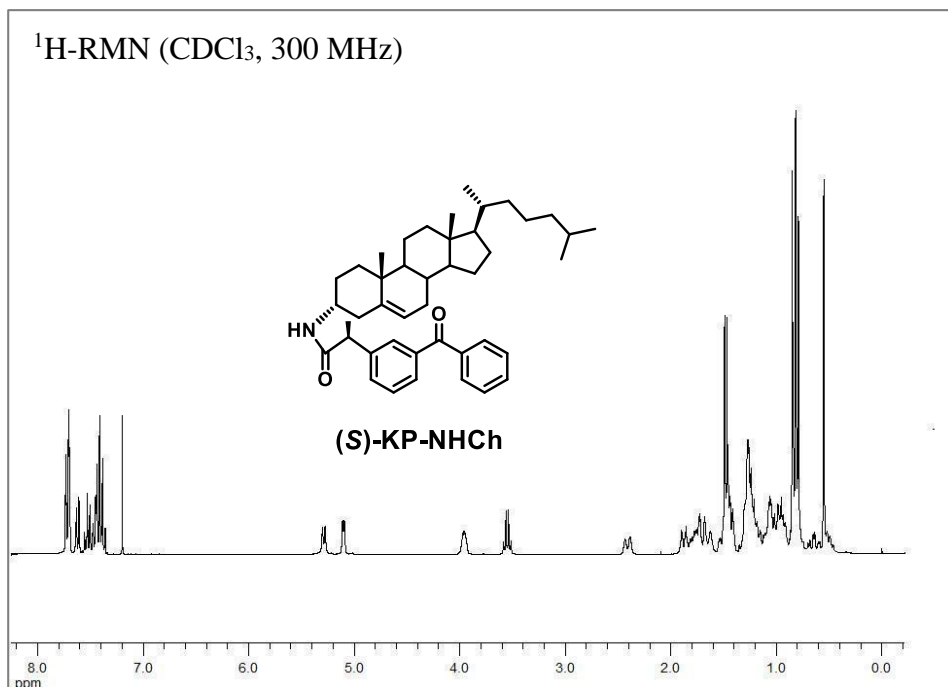


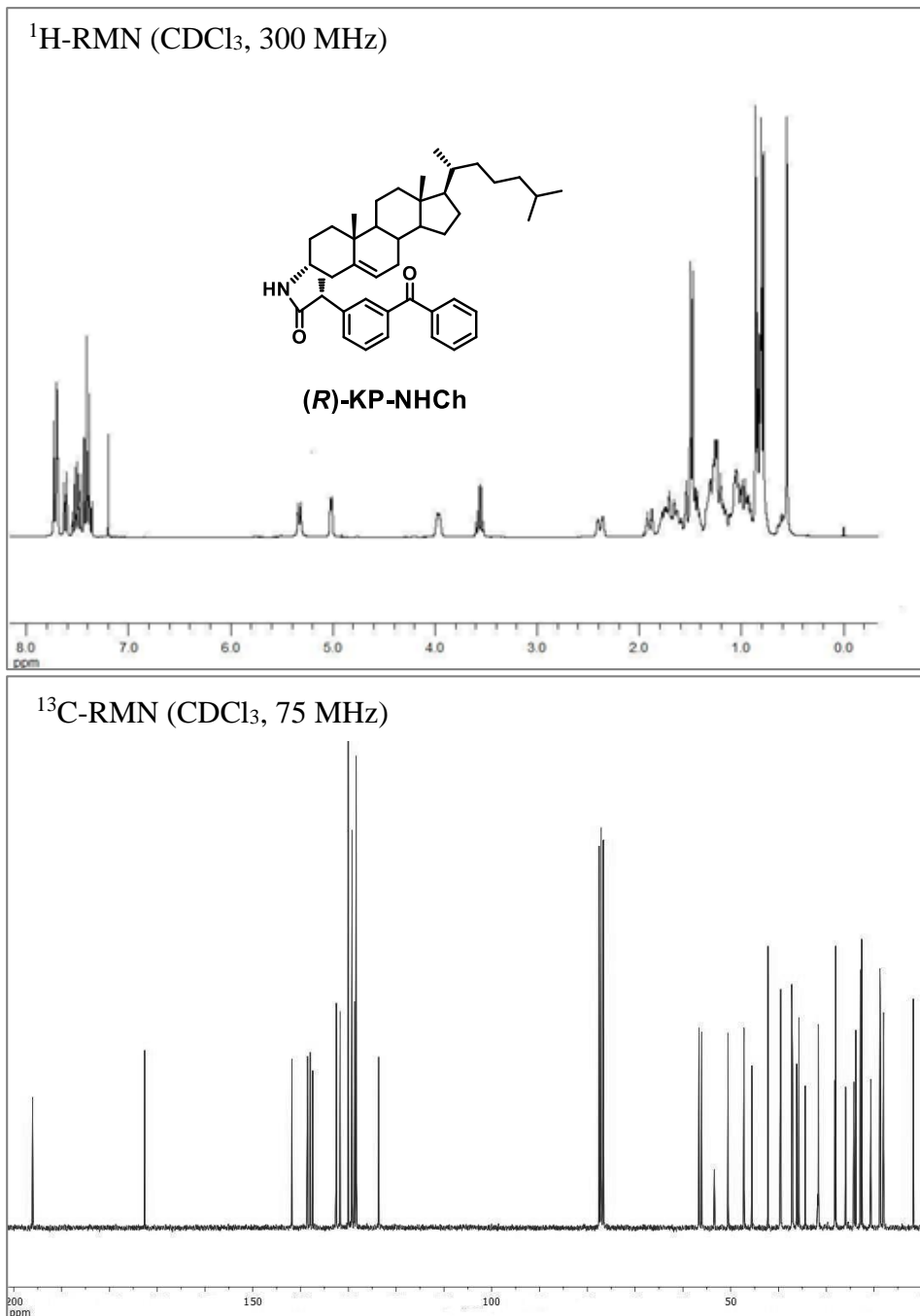
NOEDIFF (CDCl₃)

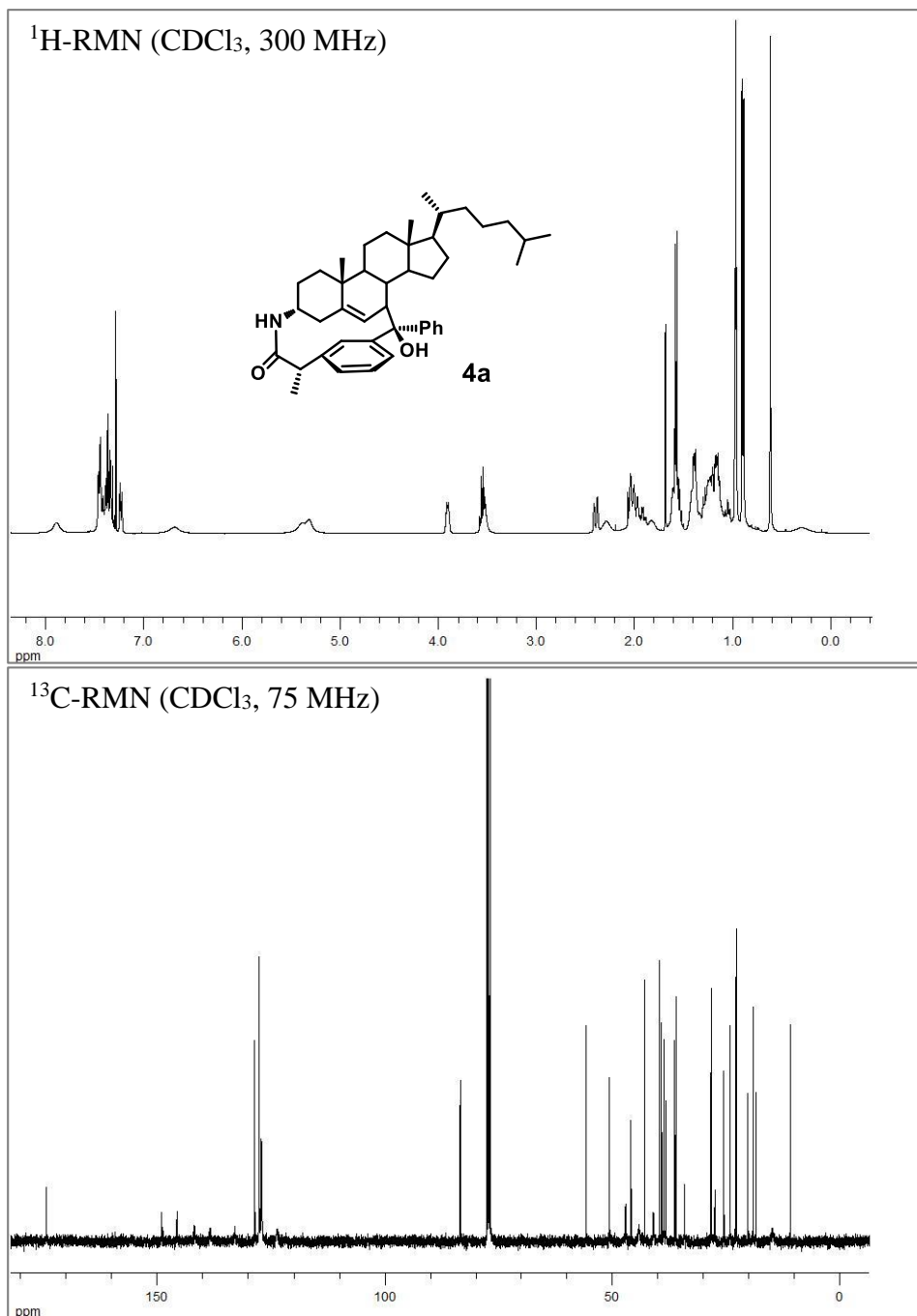


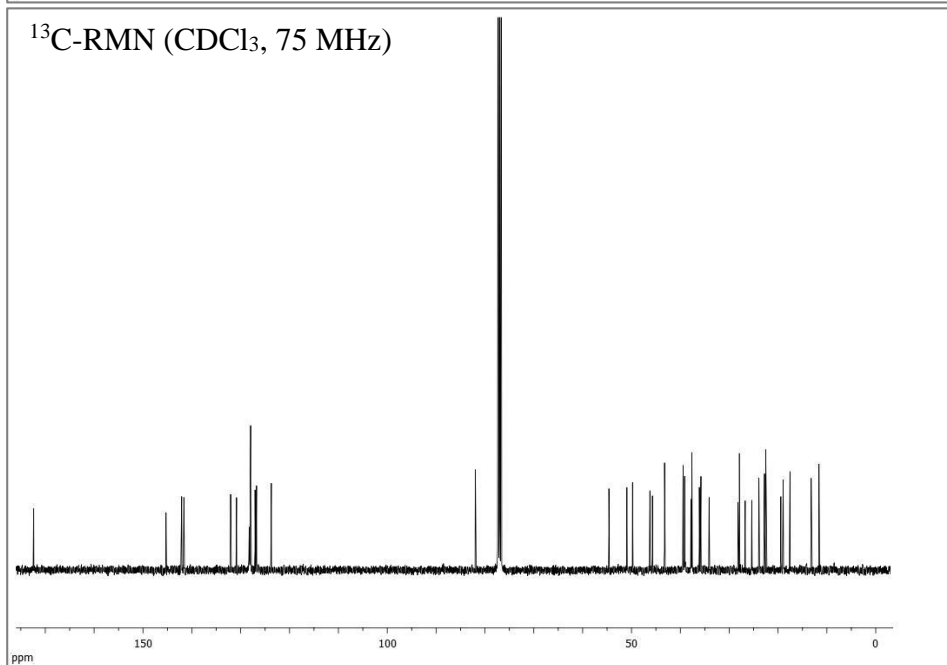
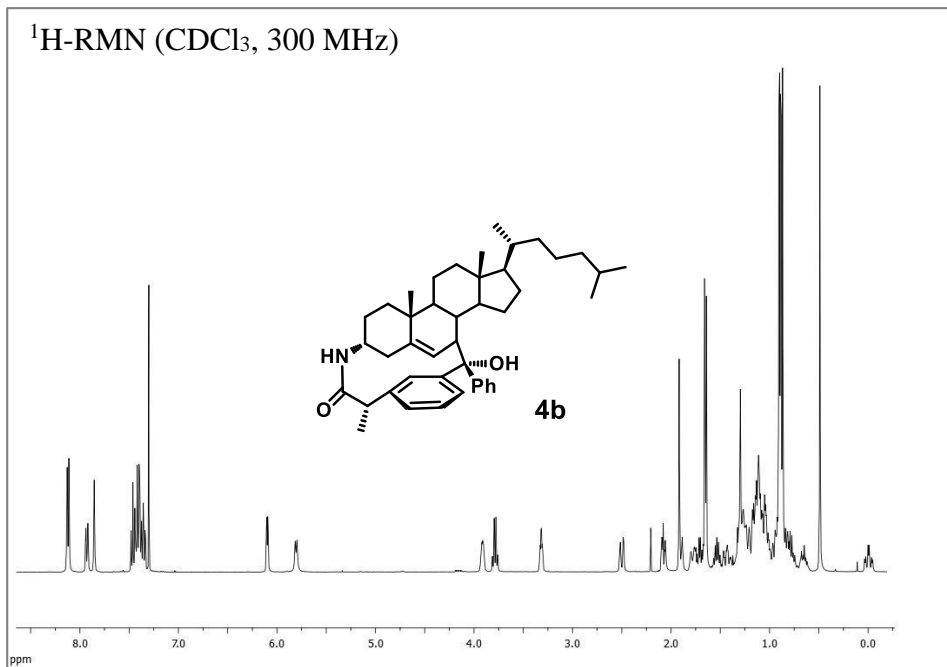


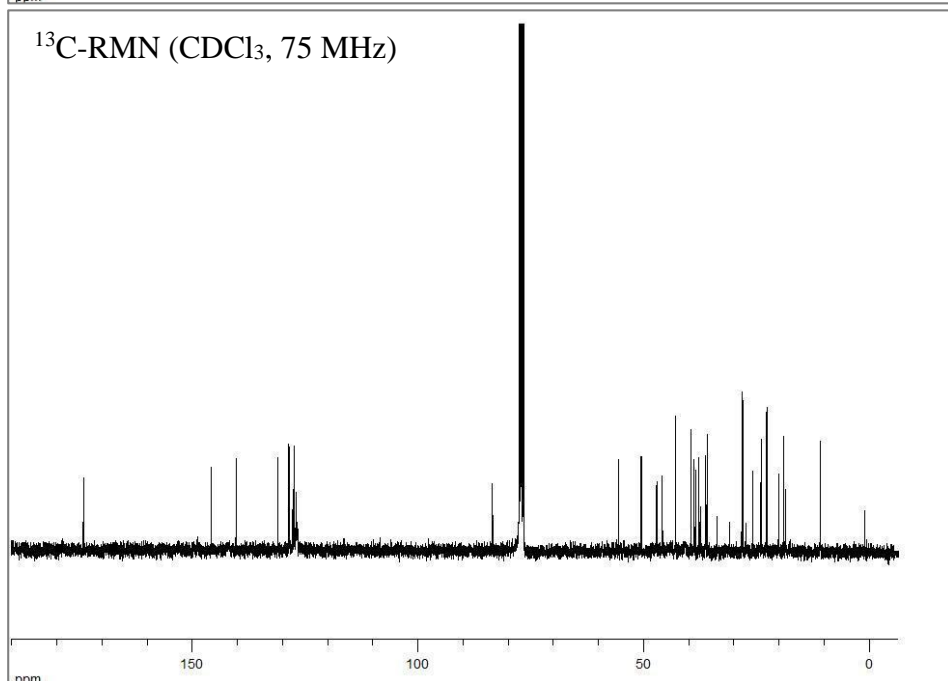
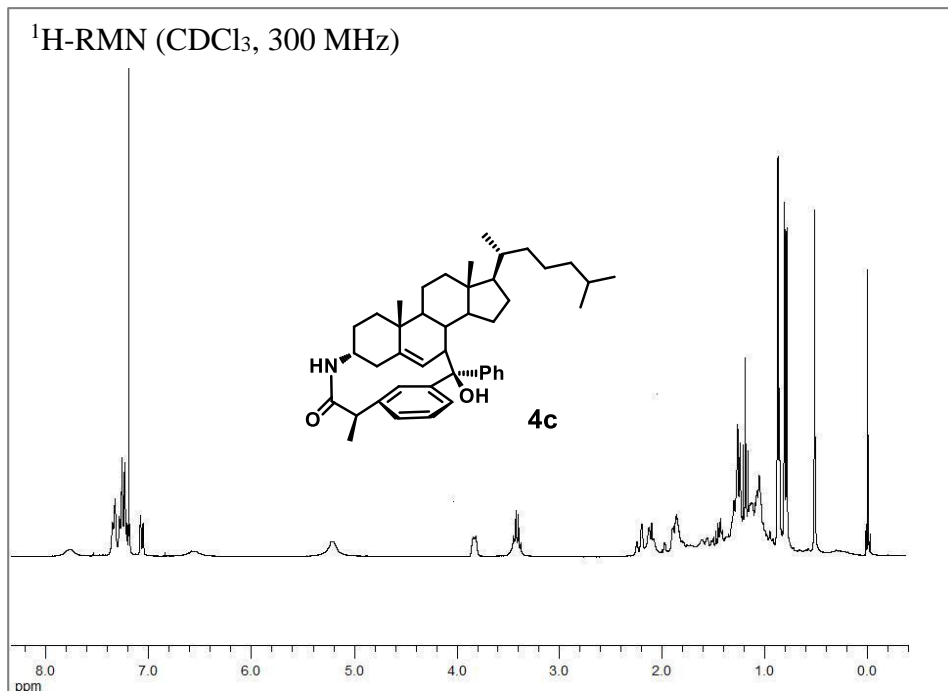


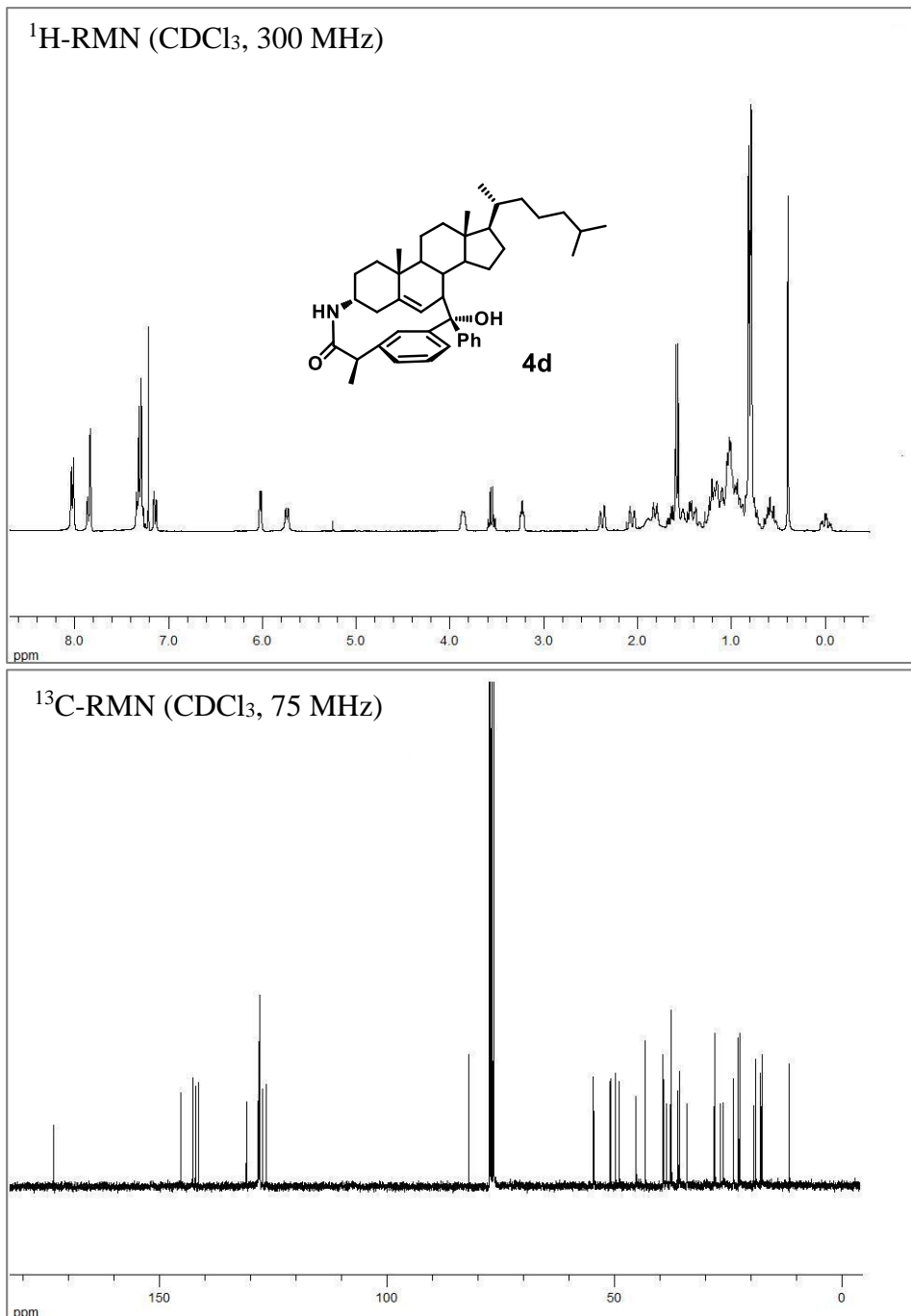


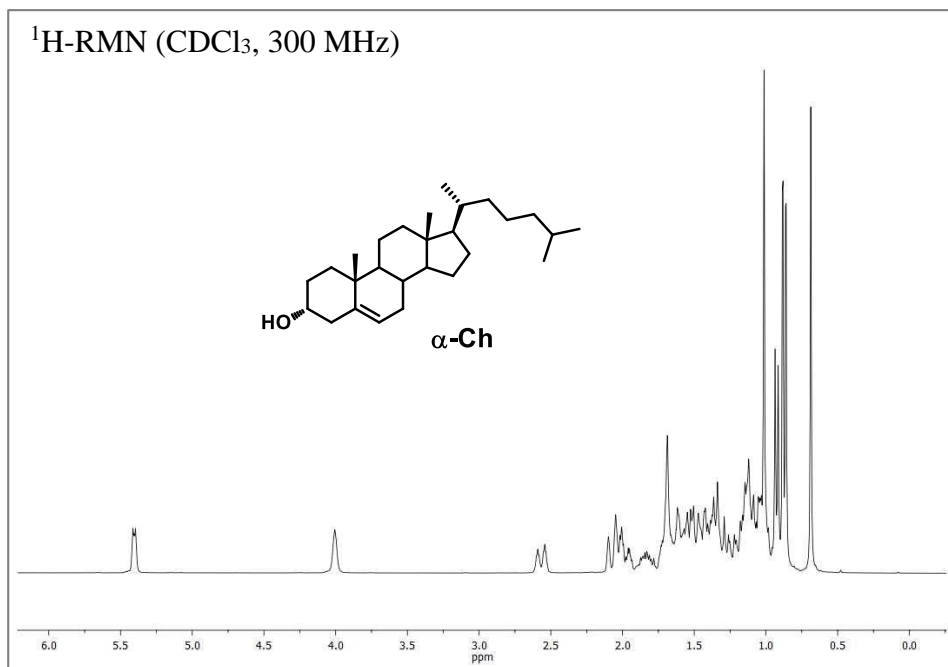


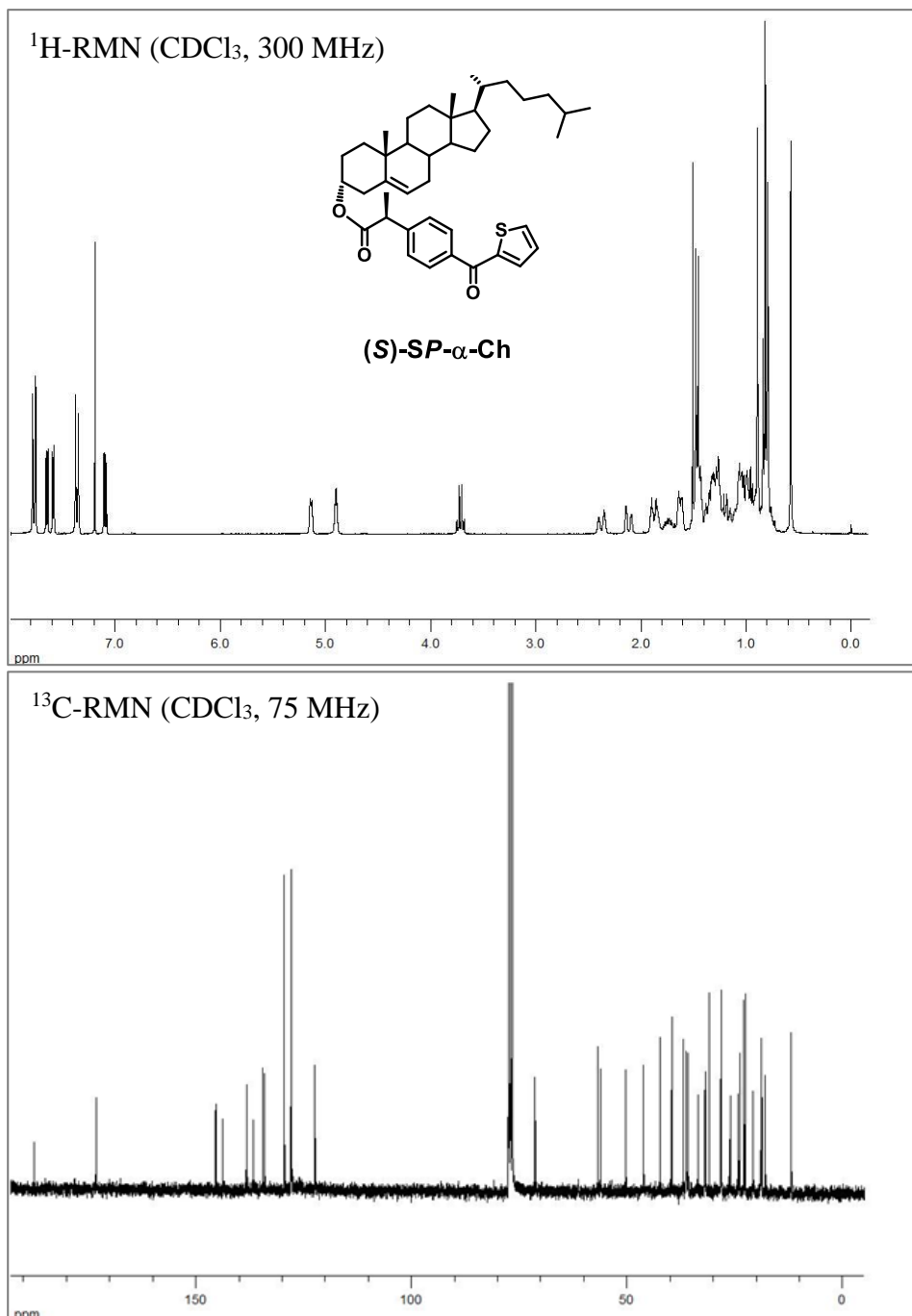


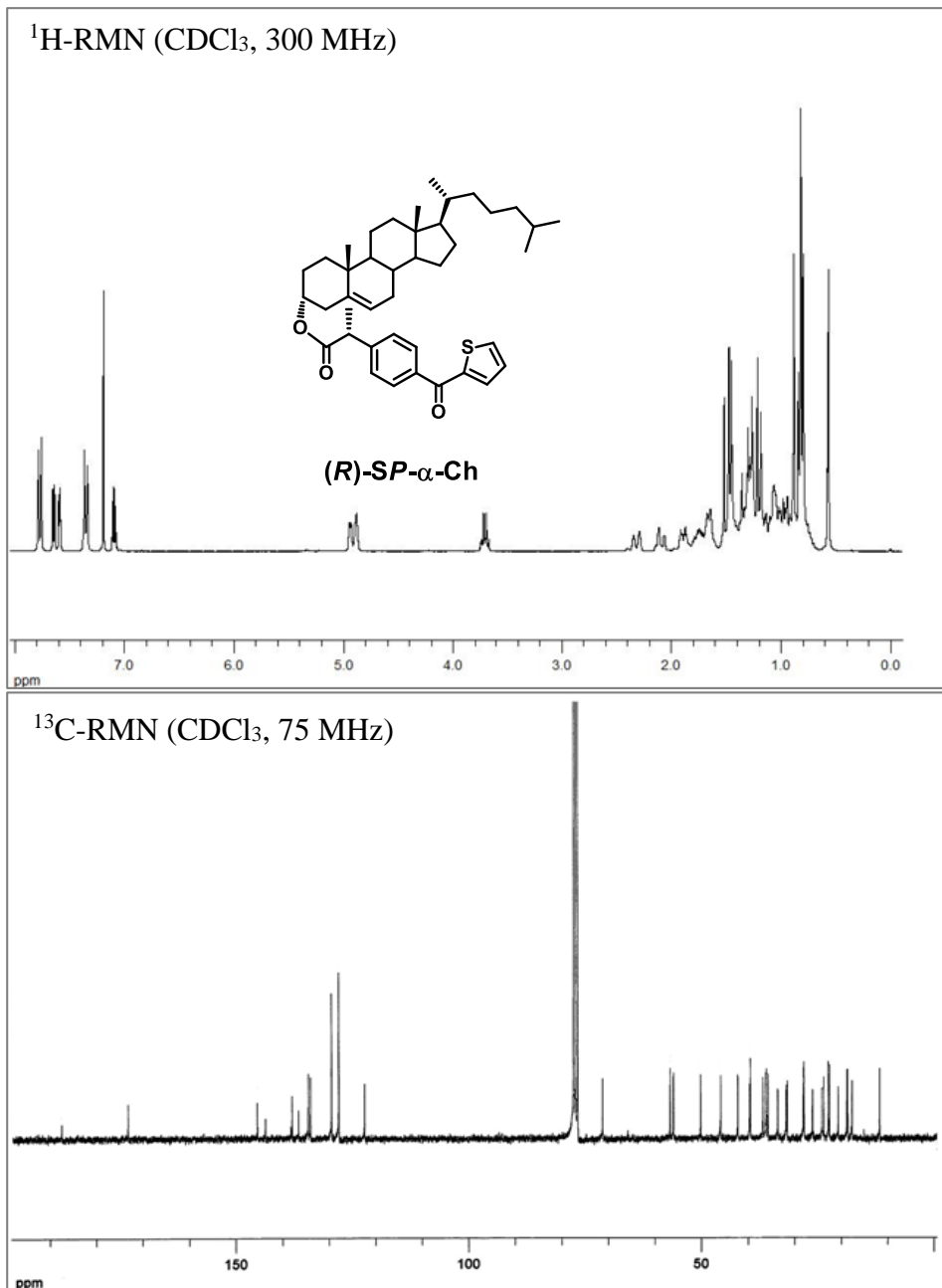


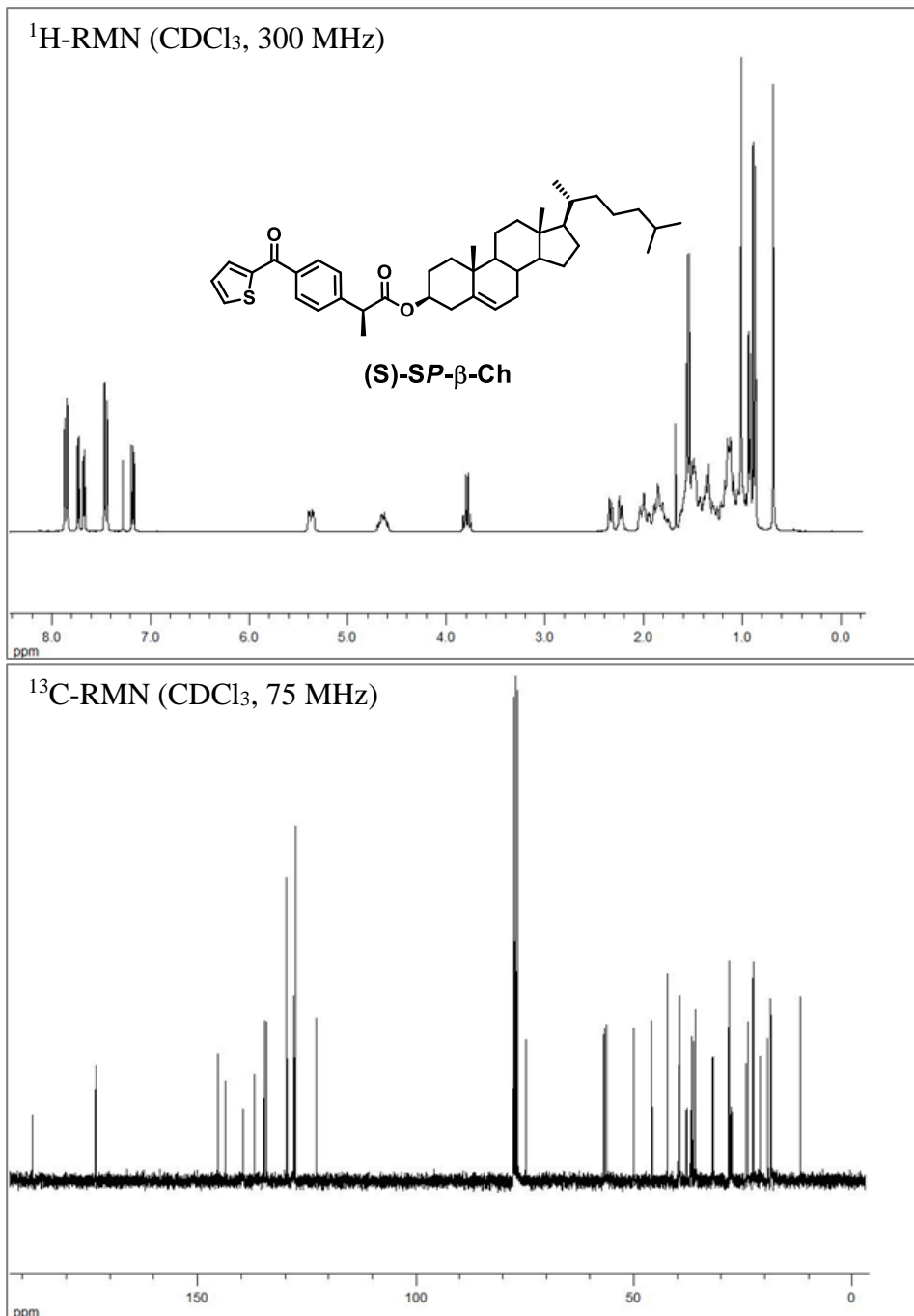


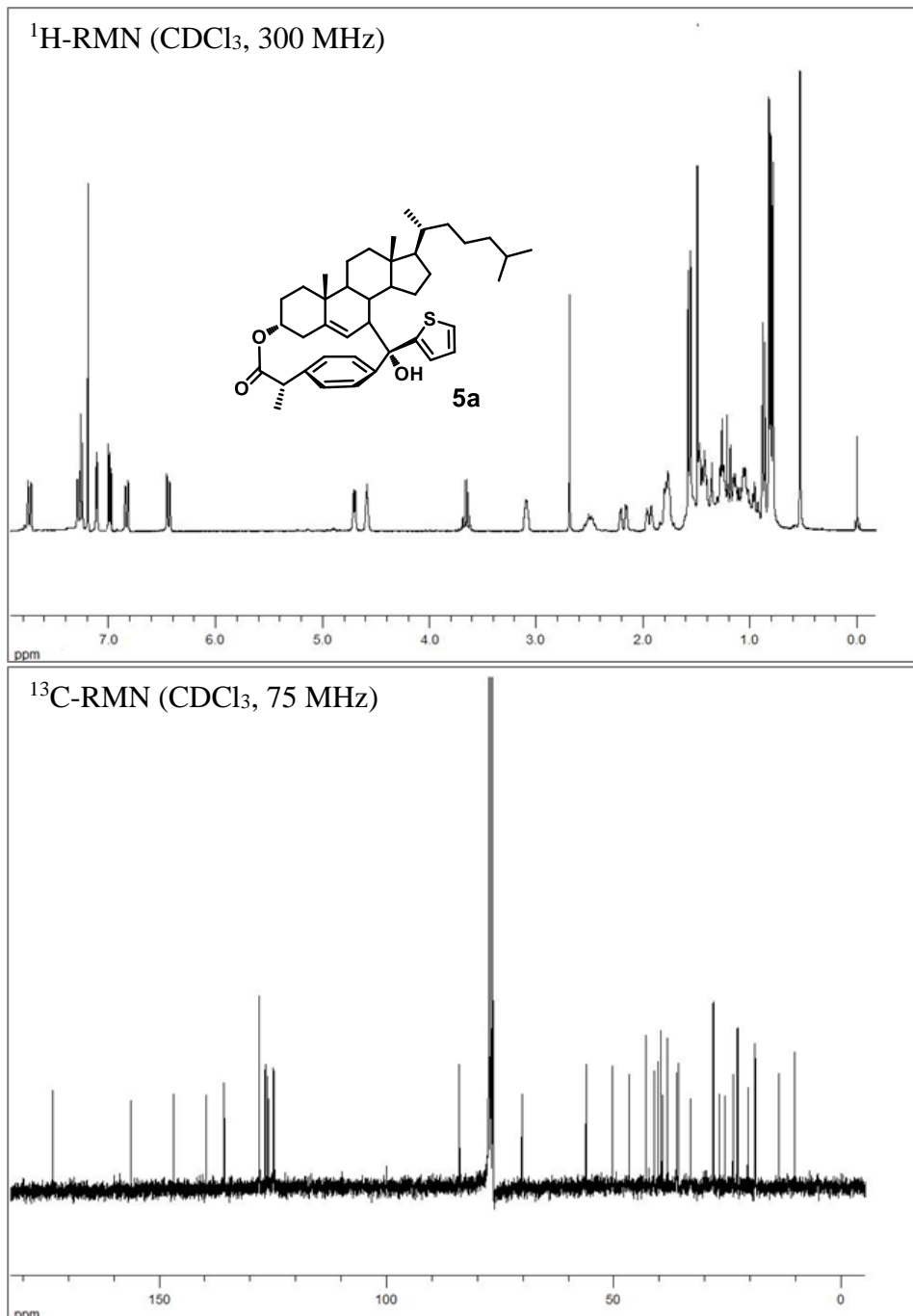


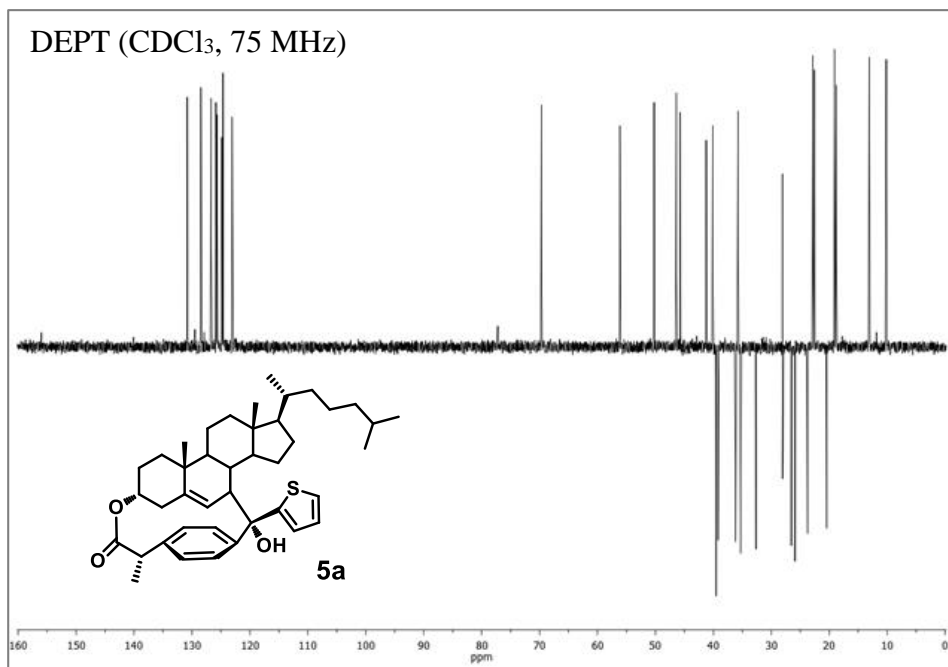




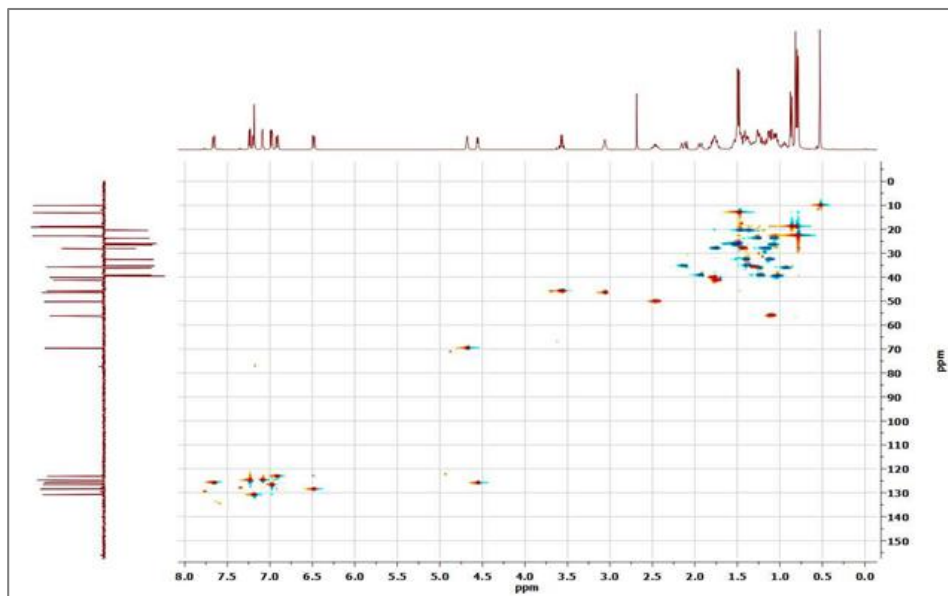


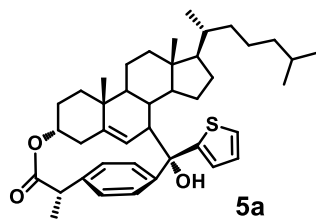




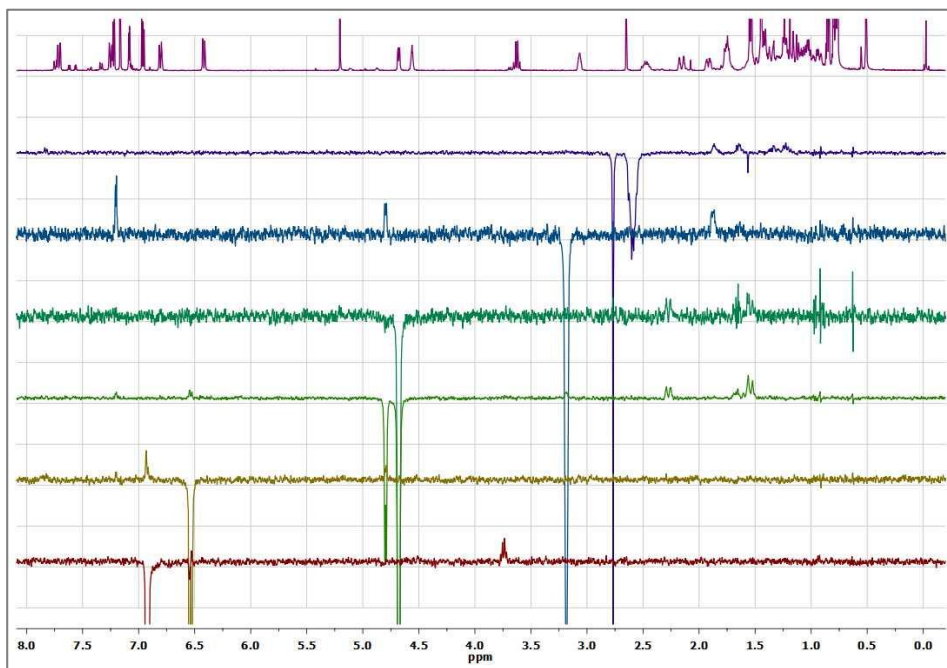


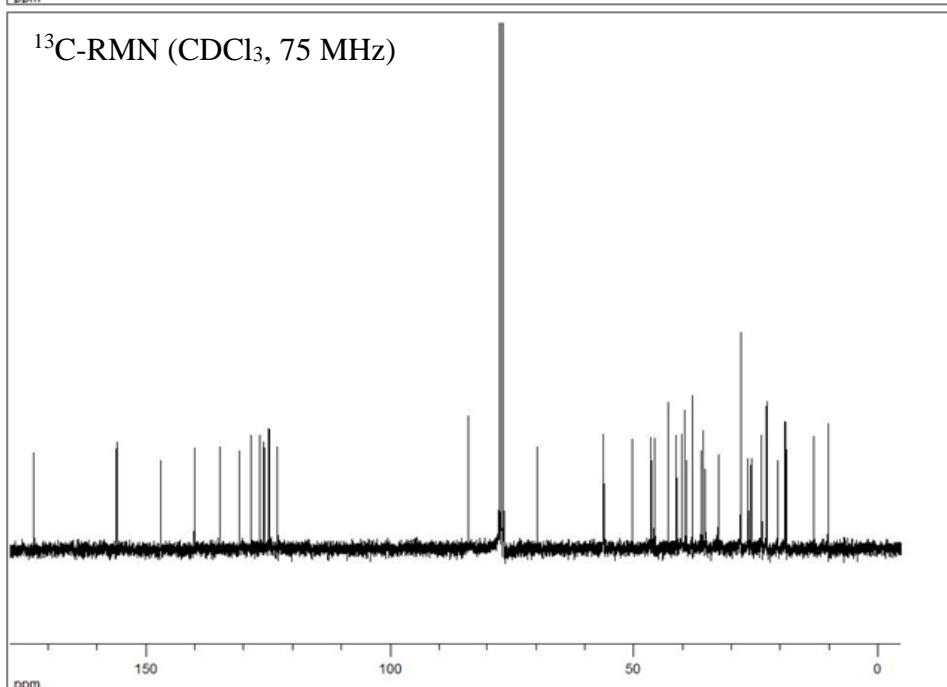
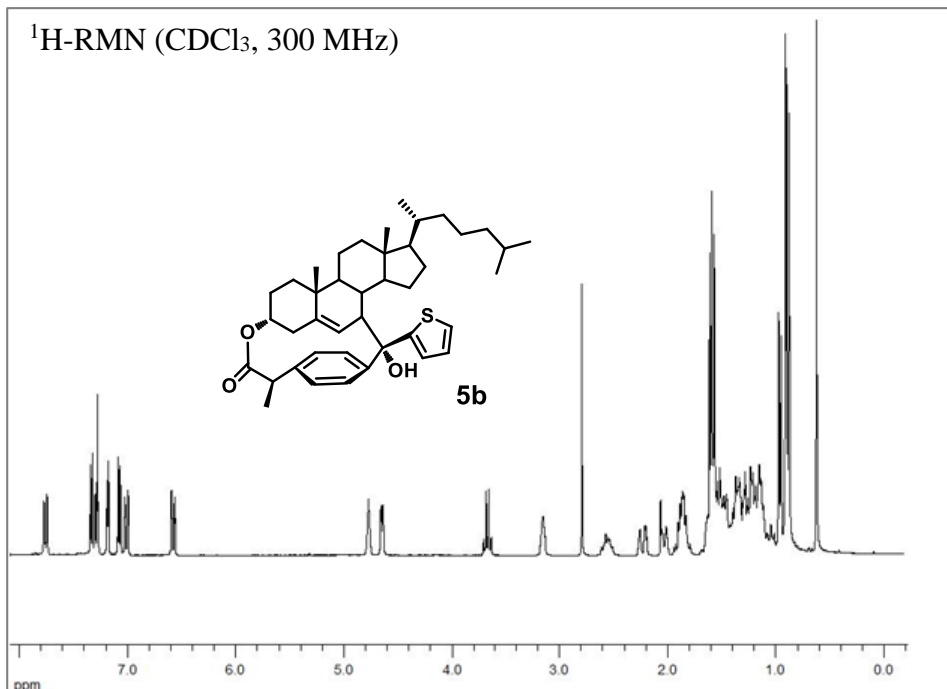
HSQC (CDCl₃)

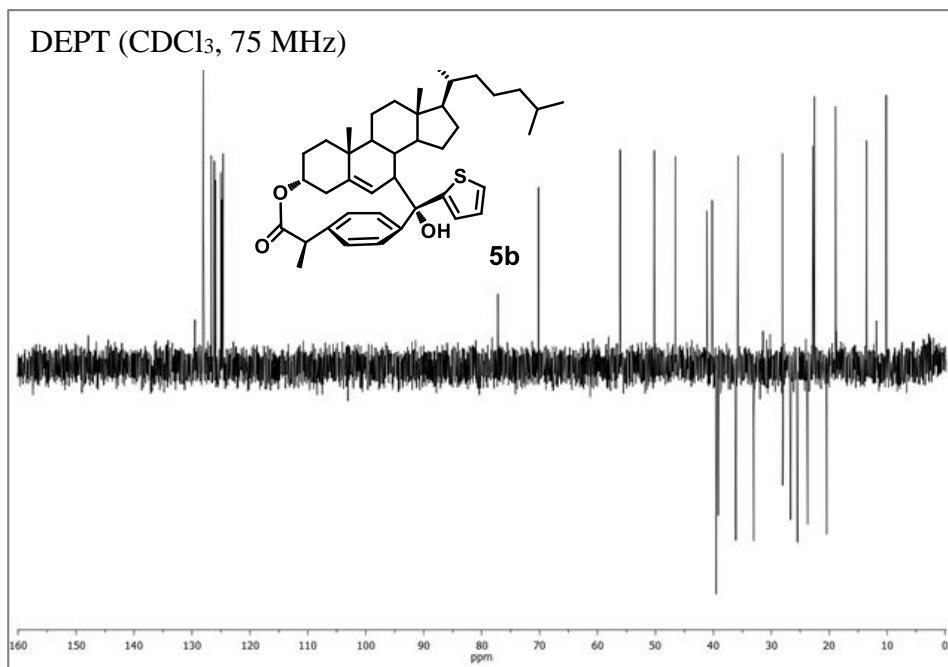




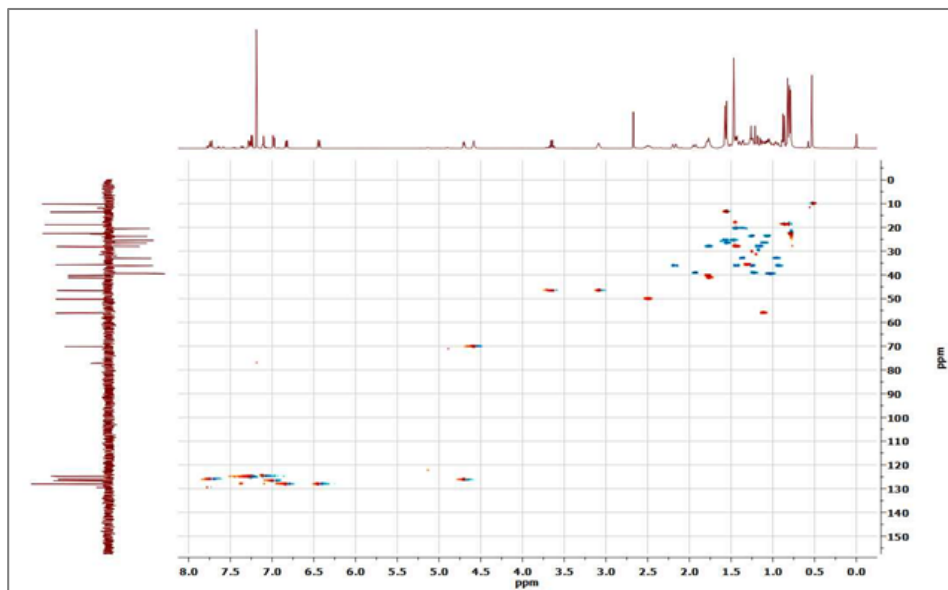
NOEDIFF (CDCl₃)

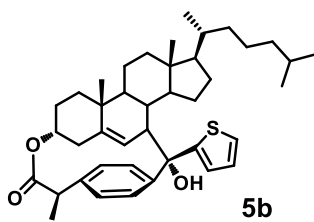




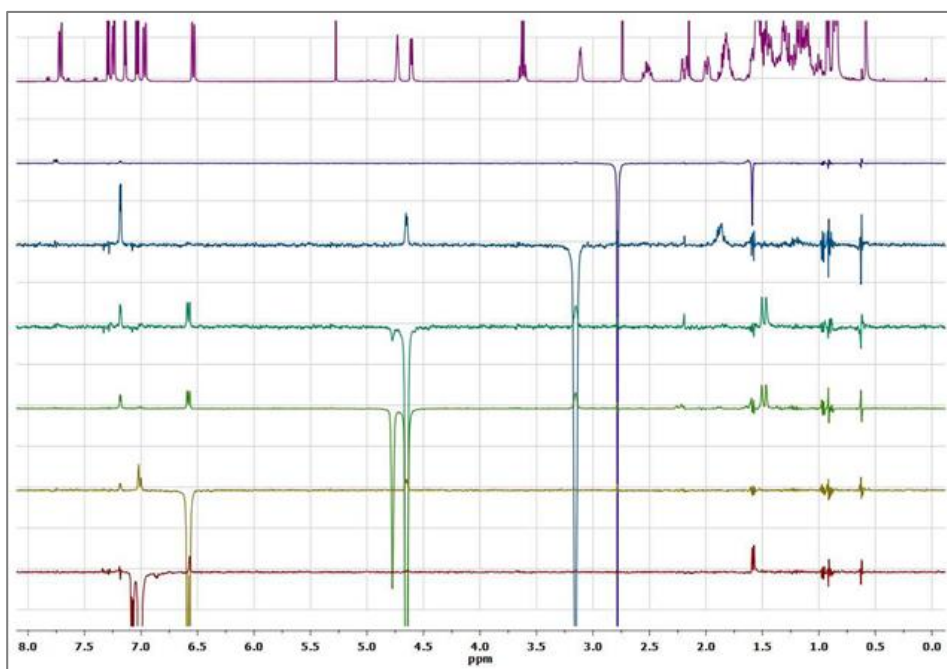


HSQC (CDCl₃)

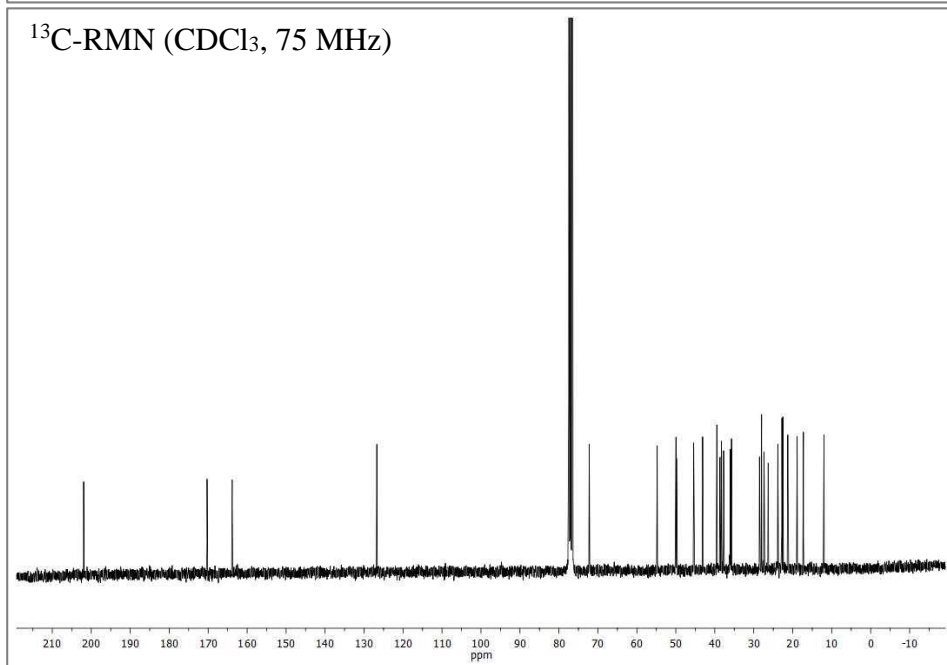
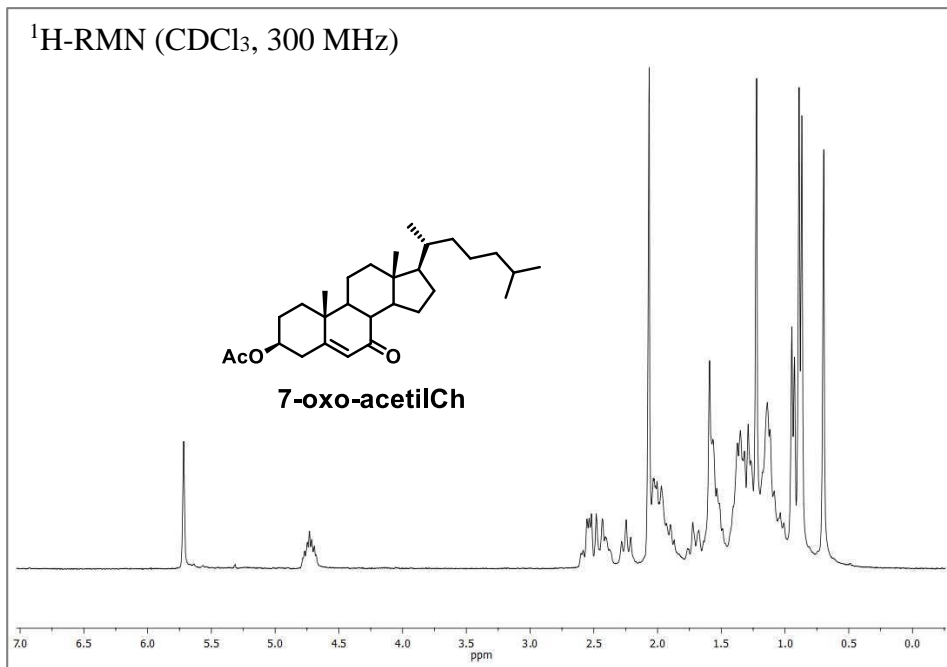




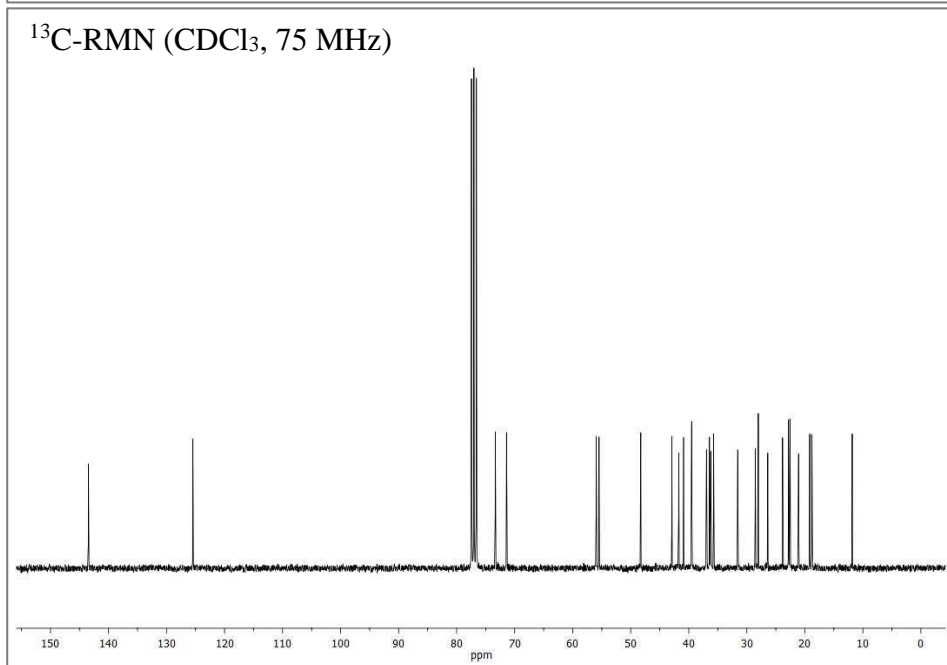
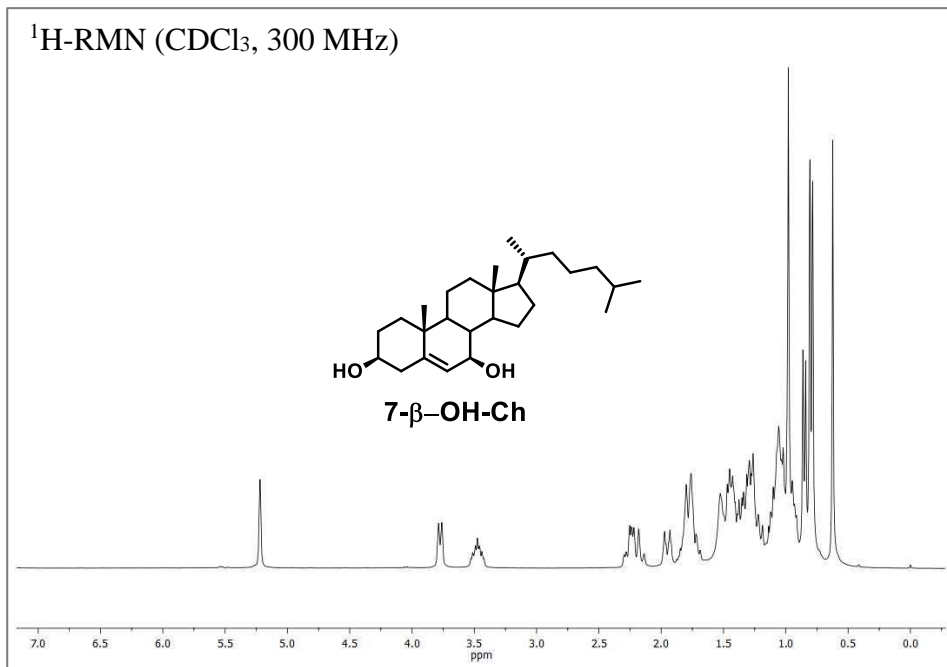
NOEDIFF (CDCl₃)

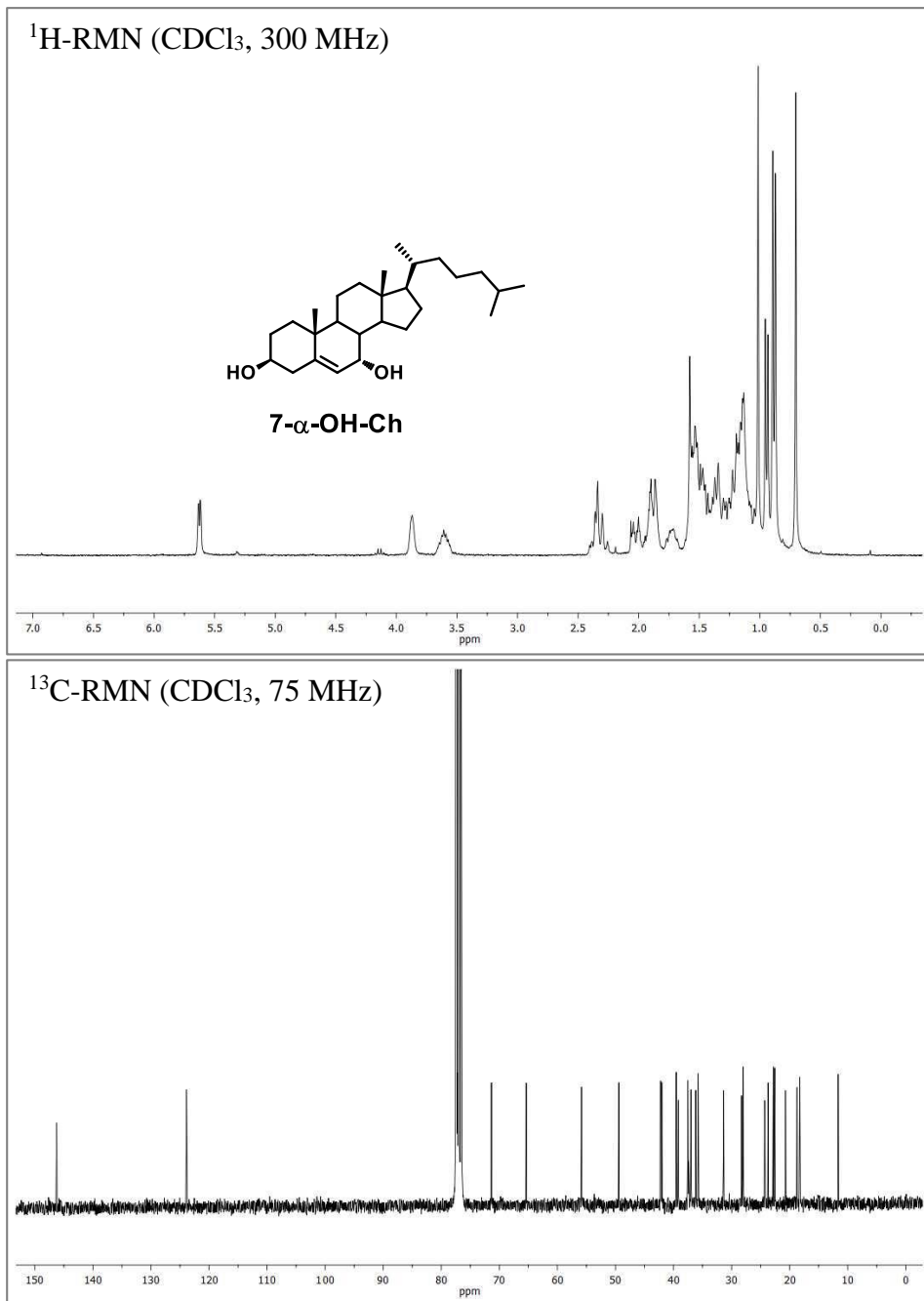


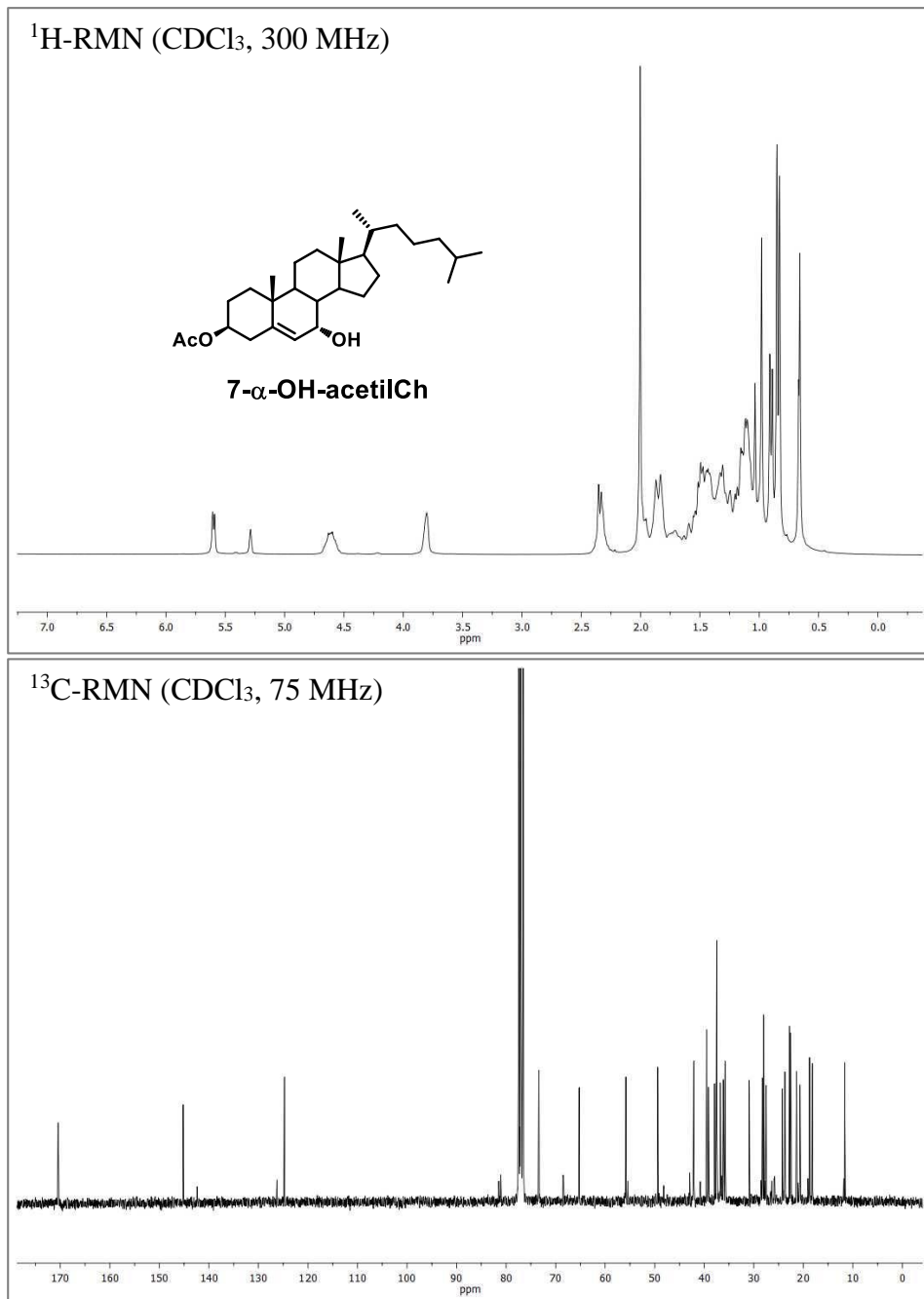
Anexo I. Espectros de RMN

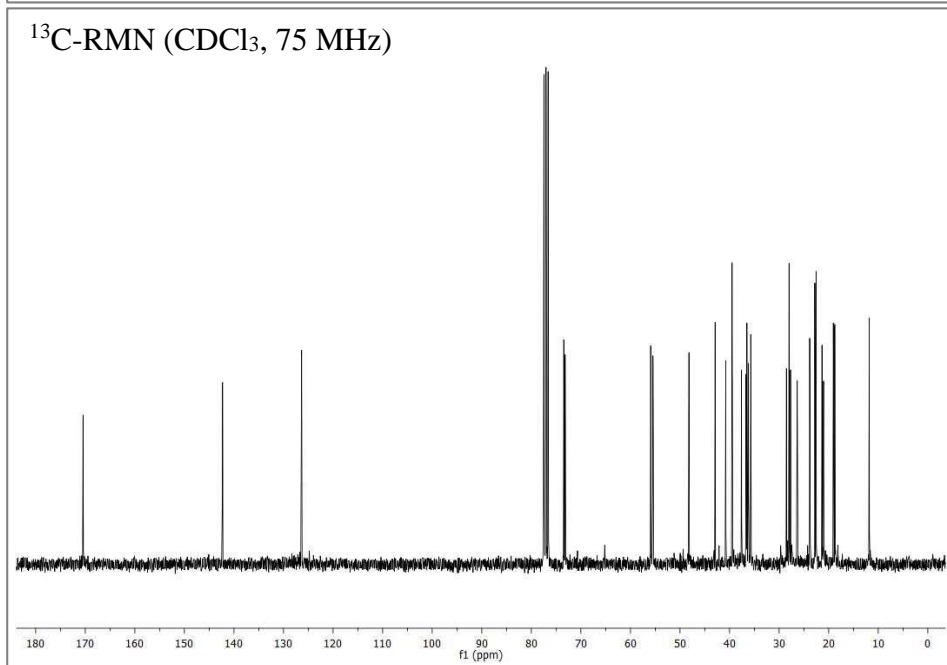
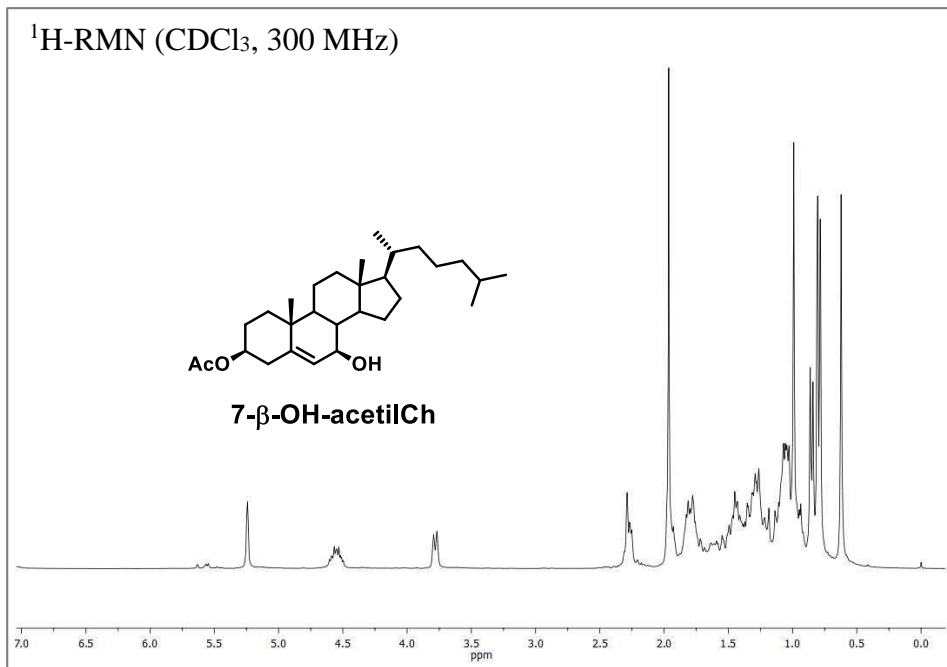


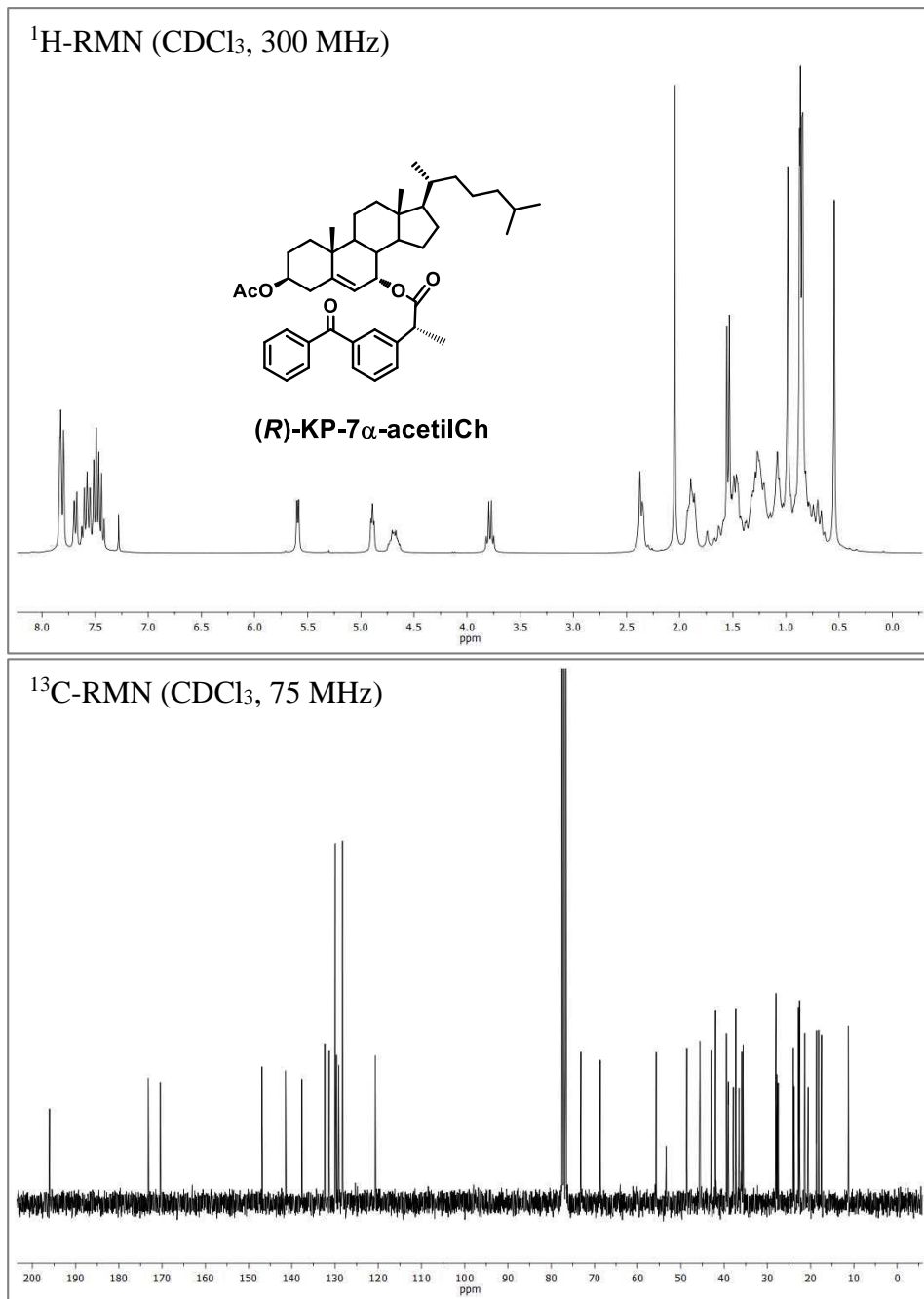
Anexo I. Espectros de RMN

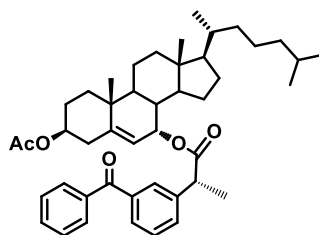




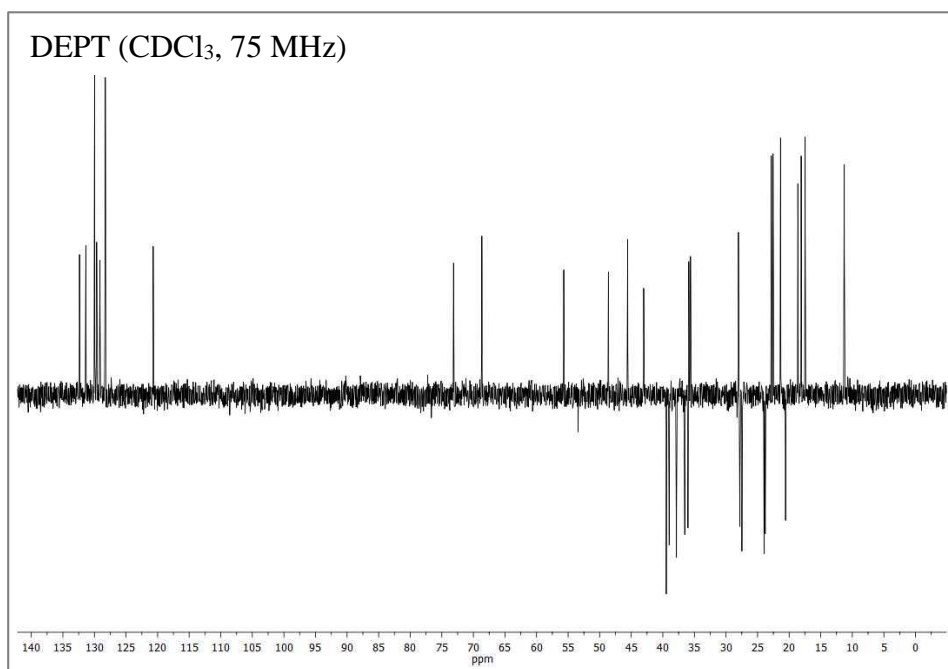


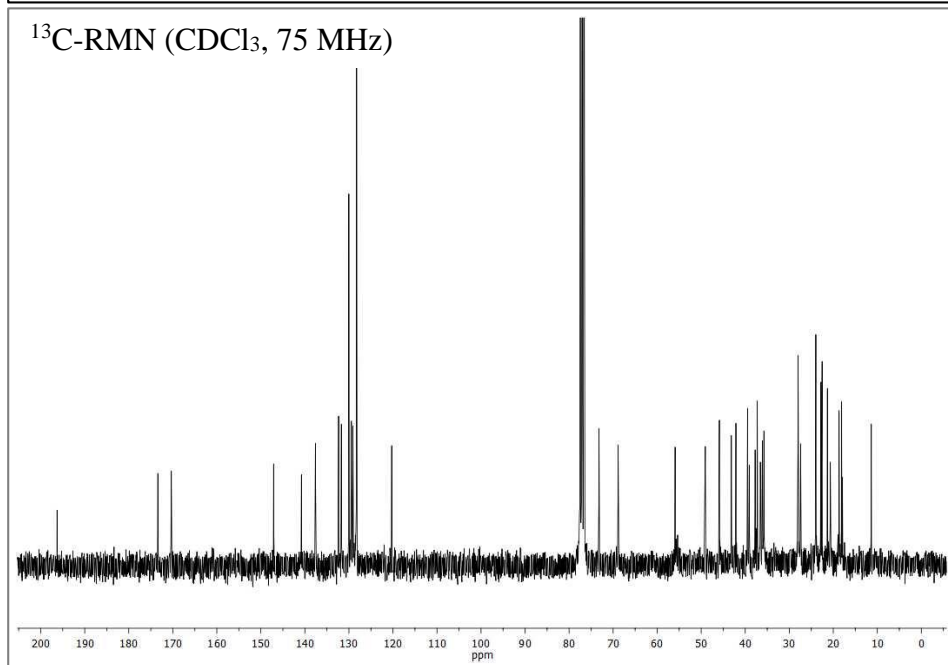
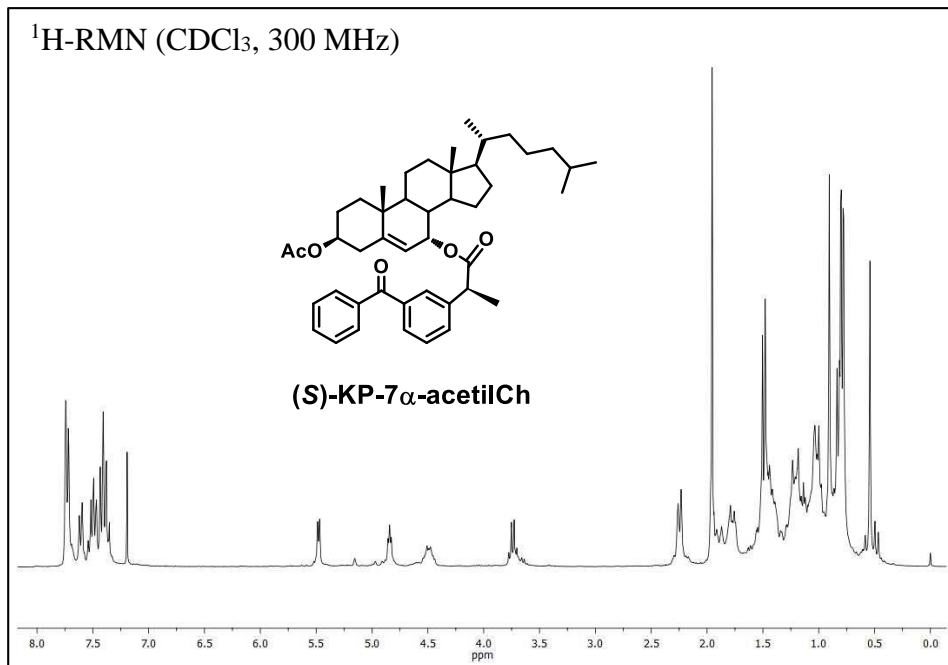


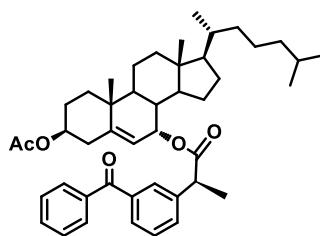




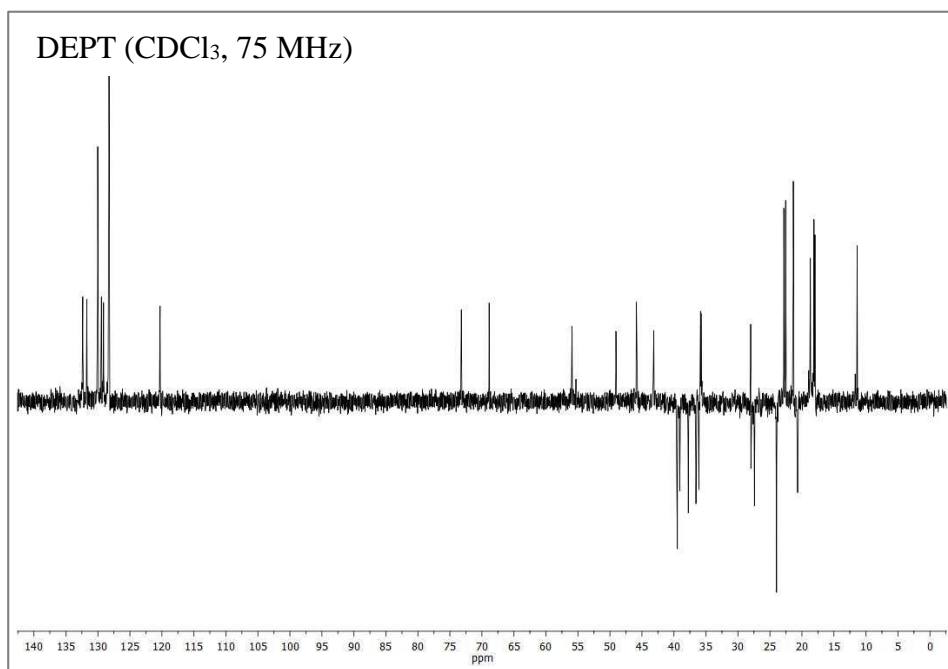
(R)-KP-7 α -acetilCh

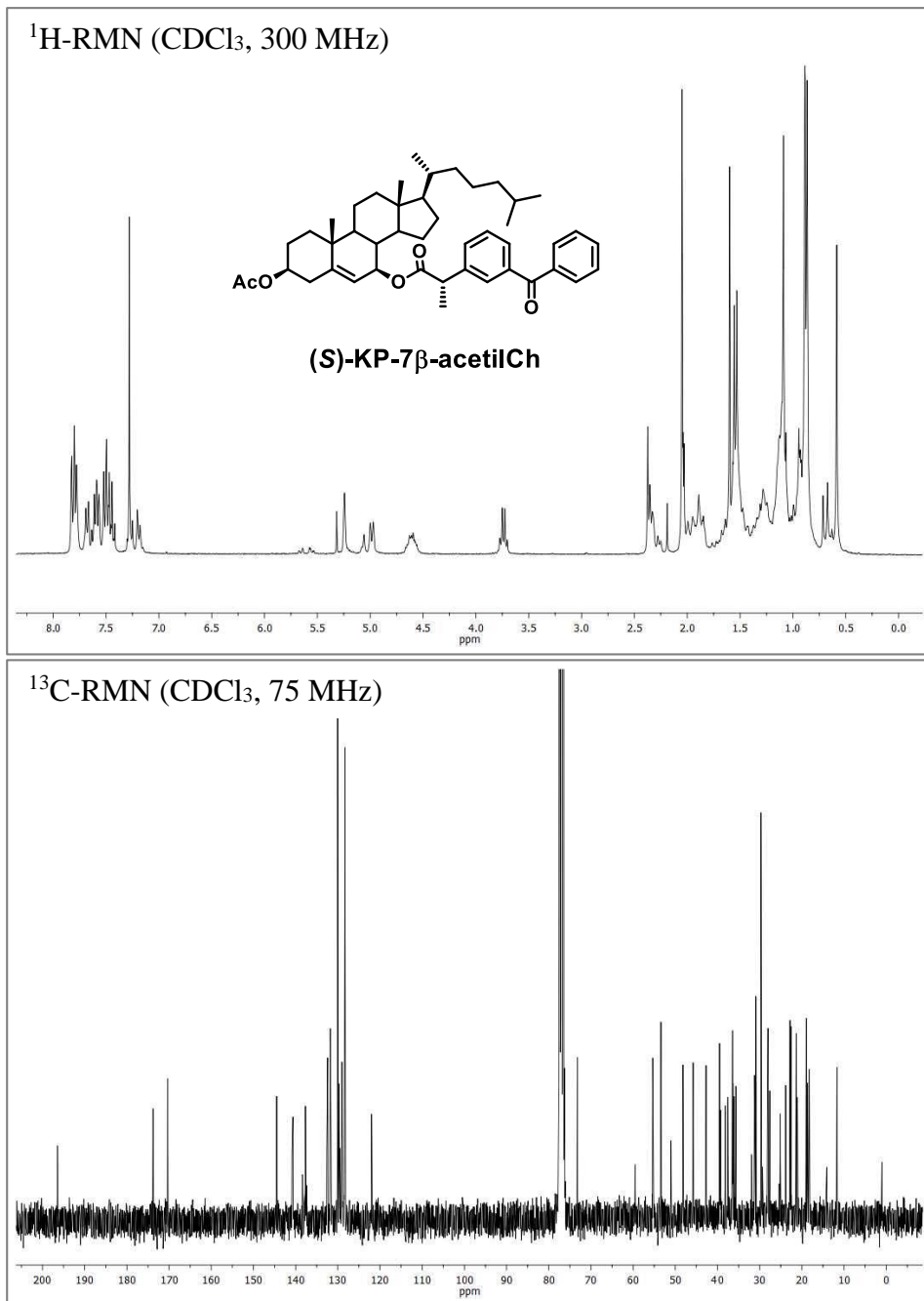


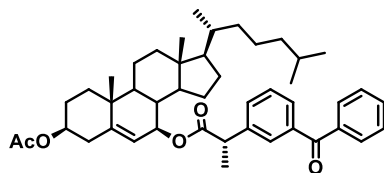




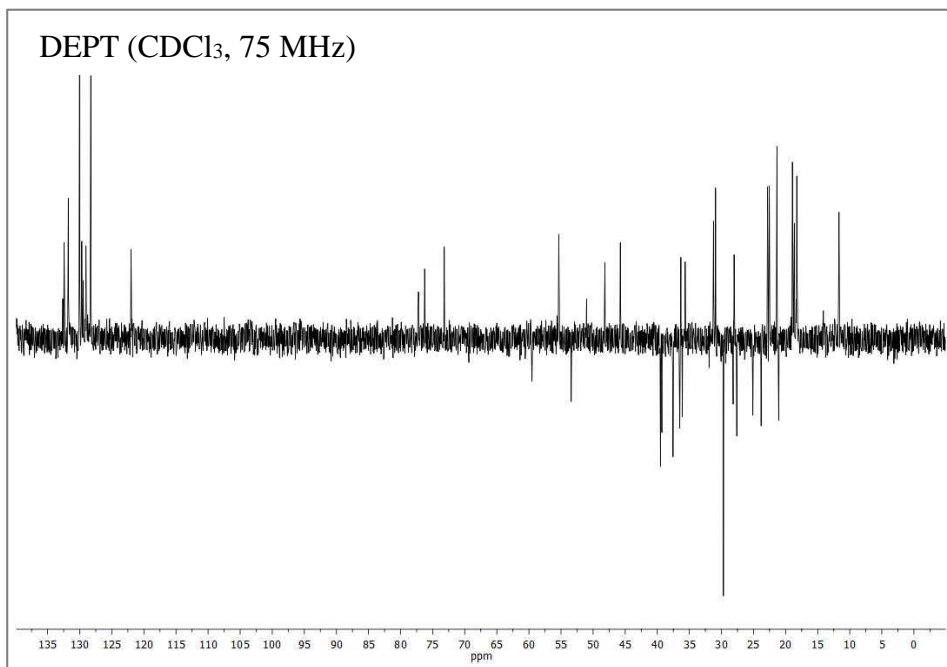
(S)-KP-7 α -acetilCh

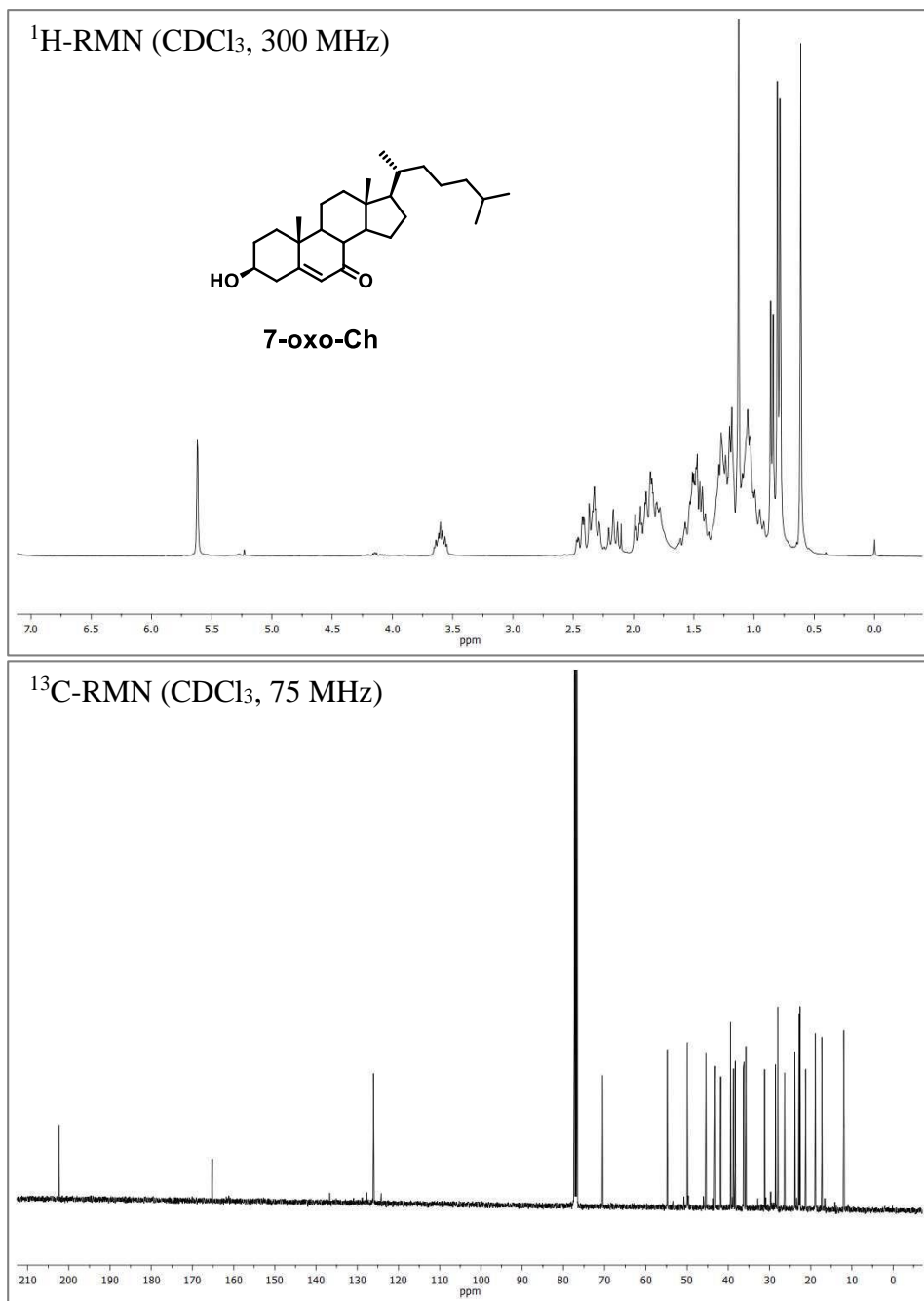


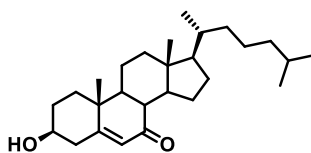




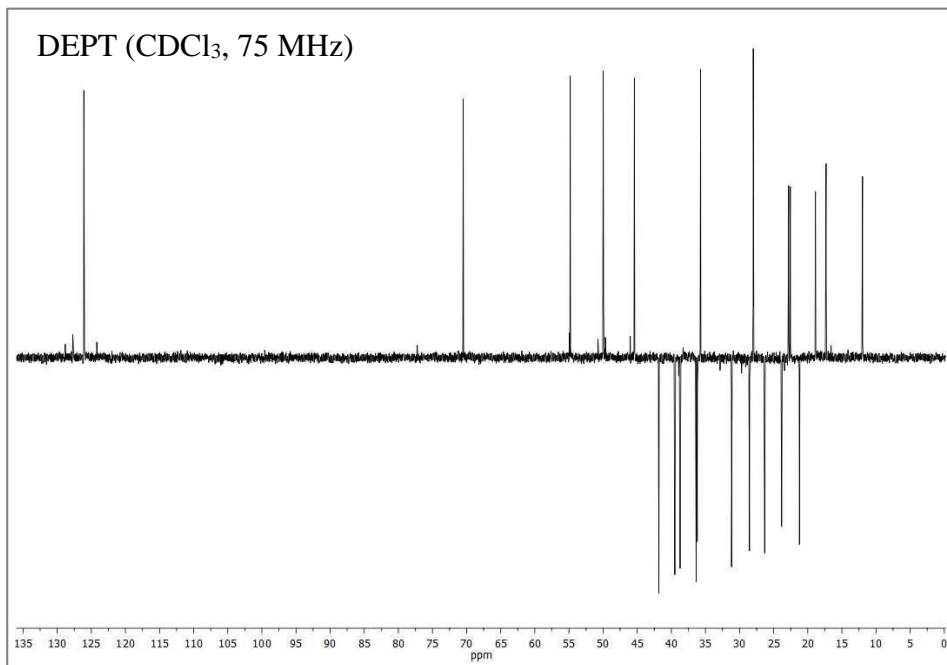
(S)-KP-7β-acetylch

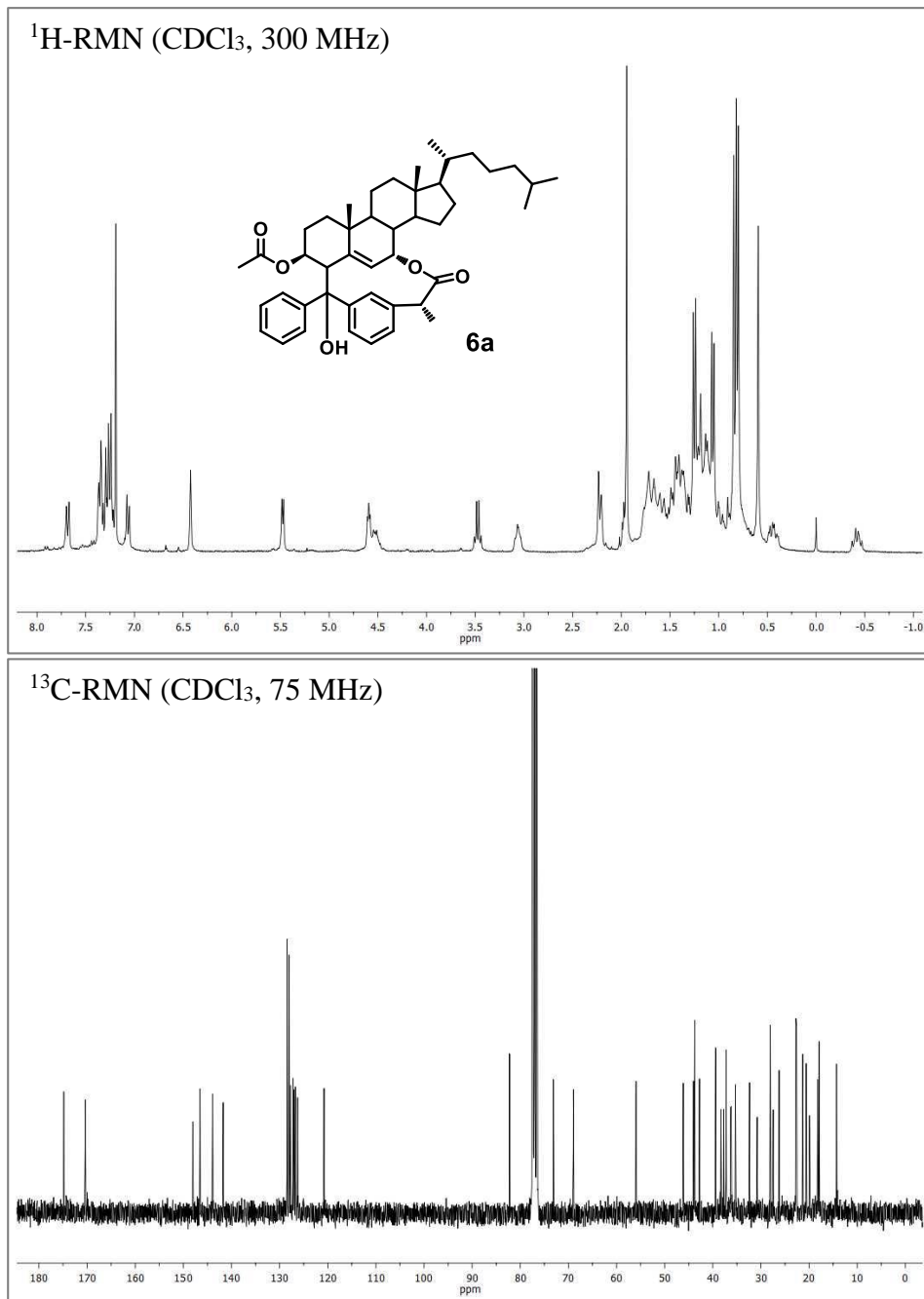


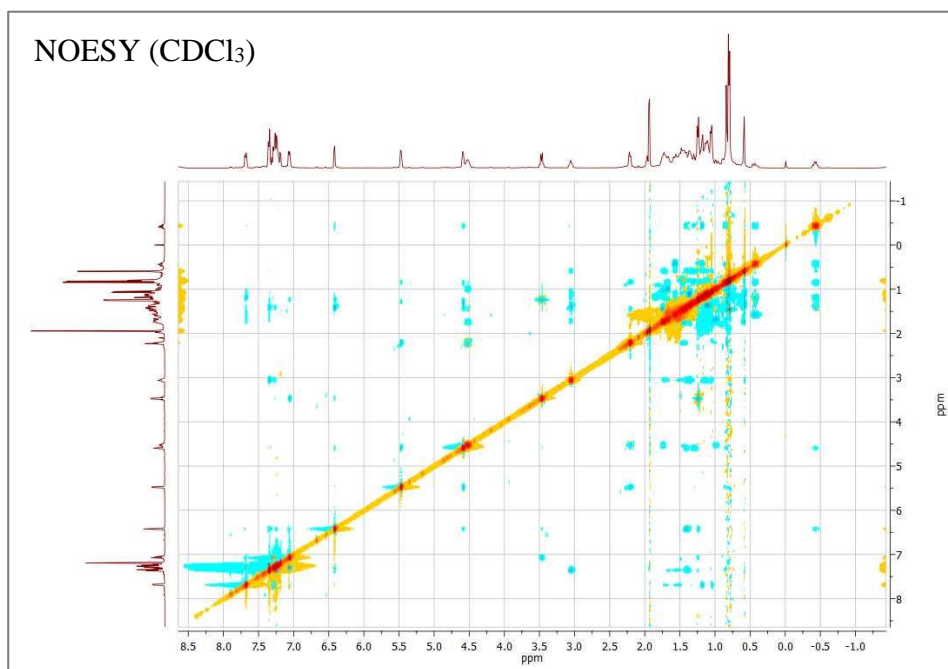
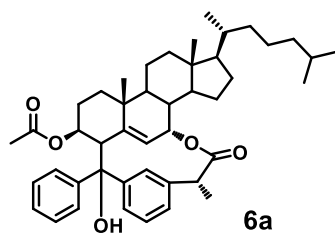


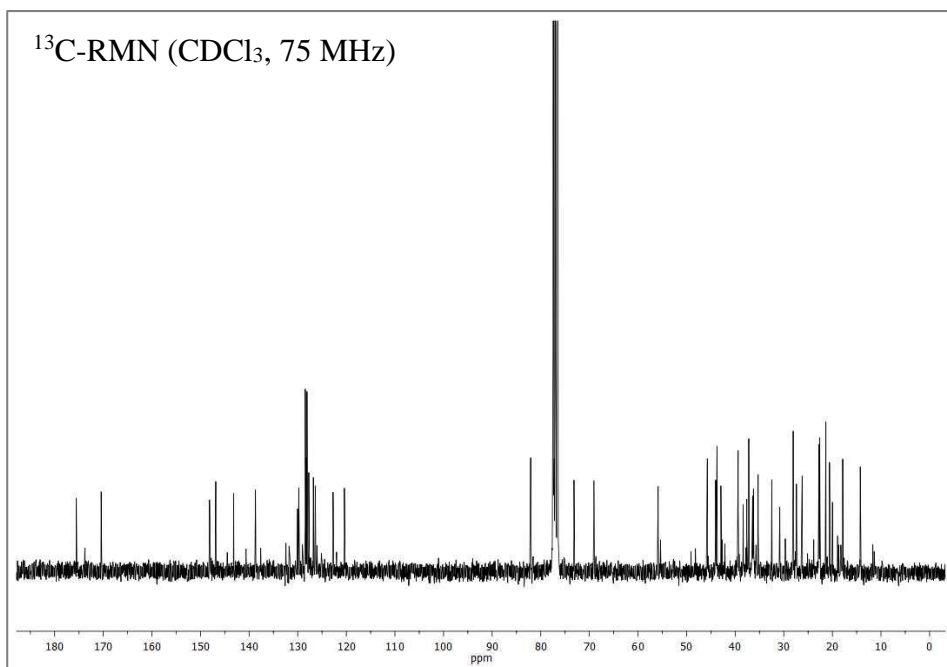
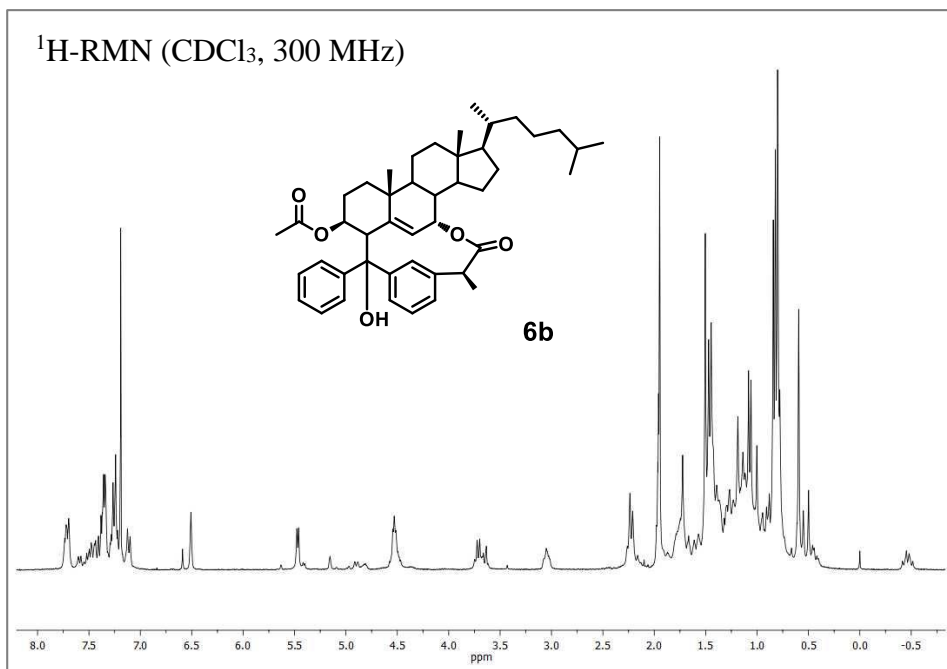


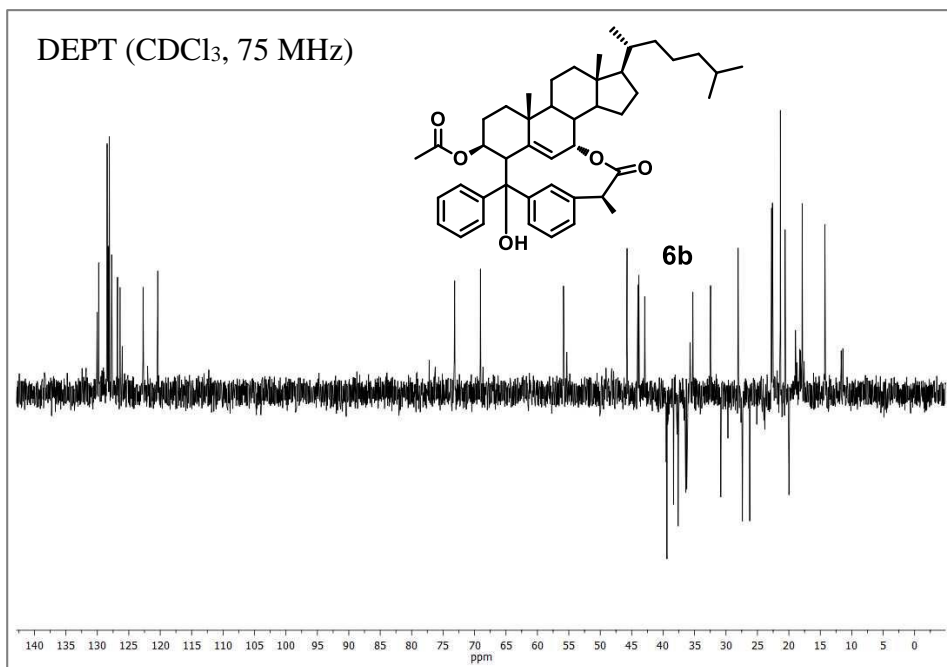
7-oxo-Ch



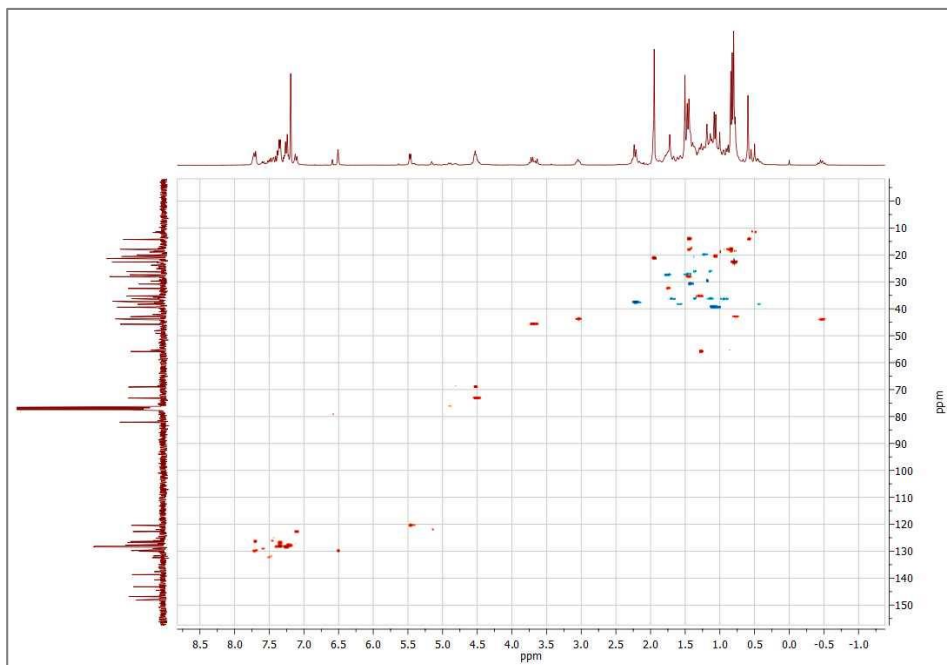


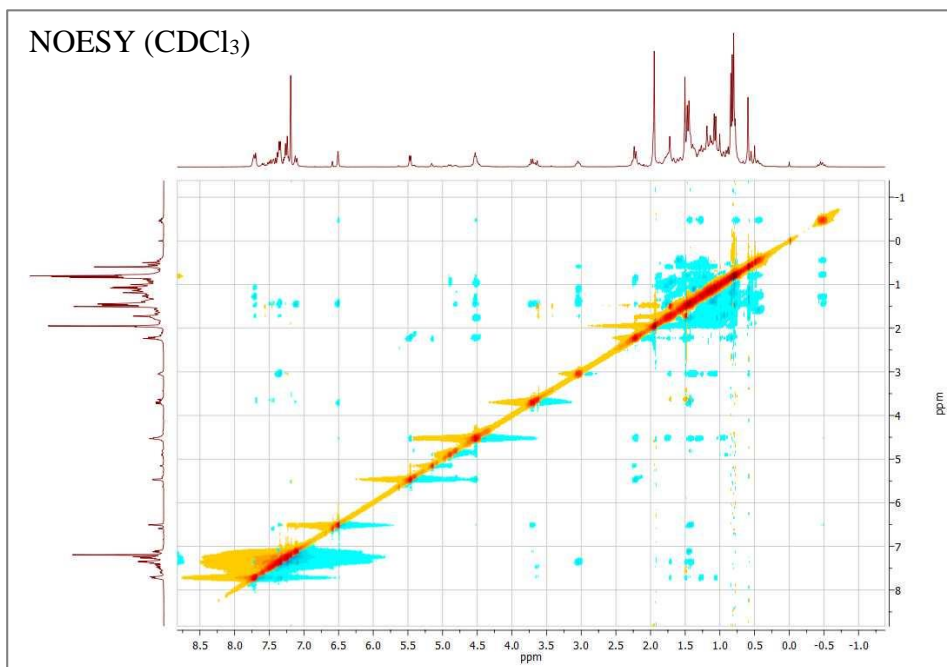
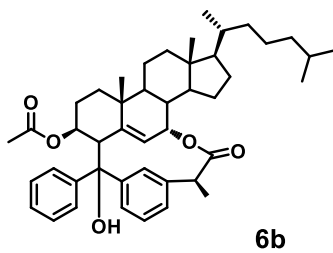






HSQC (CDCl₃)





Anexo II

Polarización Nuclear Dinámica Inducida Químicamente (CIDNP)

Mecanismo del par de radicales

El efecto de CIDNP se produce por la interacción de tres procesos fundamentales:

1. formación de un par de radicales en un estado electrónico definido de espín.
2. cruce intersistemas selectivo del espín nuclear del par generado.
3. reacciones posteriores diferentes de los pares en estados triplete y singlete.

Por tanto, todos los experimentos CIDNP pueden ser descritos esencialmente mediante el mismo esquema de reacción que se ilustra en la Figura 1.

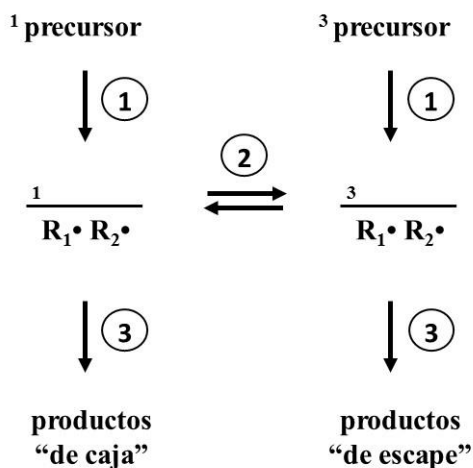


Figura 1. Esquema de reacción para todos los experimentos de CIDNP. Los números en los círculos se refieren a los tres procesos fundamentales implicados.

Generación de los pares de radicales

Un par de radicales consiste en dos entidades químicas (radicales libres) que se encuentran a una distancia muy corta entre sí. Puede originarse mediante una reacción química, como la ruptura de un enlace covalente, la transferencia electrónica o la transferencia de un átomo o de un grupo (por ejemplo la abstracción de hidrógeno). En todas estas reacciones, la multiplicidad de espín electrónico se conserva.

Cuando dos radicales constituyen un par, cada electrón desapareado nota la presencia del otro, y sus estados de espín no pueden considerarse independientemente. Así, entre los electrones desapareados de los dos radicales del par, existe una interacción de intercambio cuyo origen es la repulsión coulombica de dichos electrones. La integral de intercambio, J , depende en gran medida de la distancia. Cuando dos electrones desapareados de dos radicales interactúan con un campo magnético, sus espines con un determinado movimiento de precesión se pueden combinar de cuatro maneras posibles: un estado singlete (S), en el que poseen una orientación antiparalela, y tres estados triplete (T_0 , T_+ , T_-), en los que tienen orientación paralela. Con el incremento de la distancia entre los radicales, la interacción de intercambio se reduce hasta alcanzar un valor despreciable cuando los radicales están bien separados entre sí. En esta situación, los radicales existen como dos dobles (D) (Figura 2).

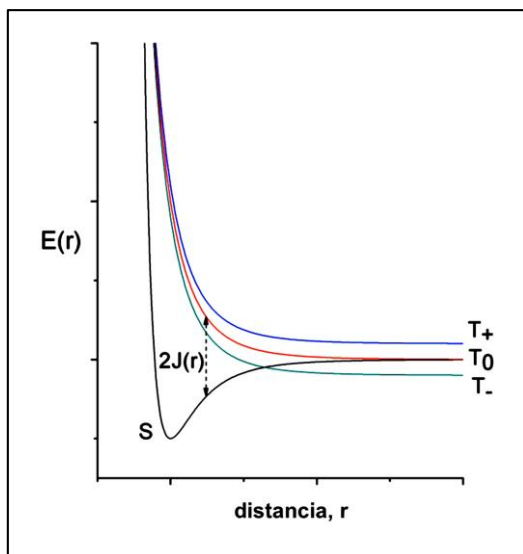


Figura 2. Energía potencial de un par de radicales en un campo magnético en función de la distancia interradicaria r .

Los estados electrónicos de espín pueden visualizarse mediante el uso de diagramas vectoriales (Figura 3), donde la componente z es determinada por el eje de cuantización de espín resultante del campo magnético del espectrómetro.

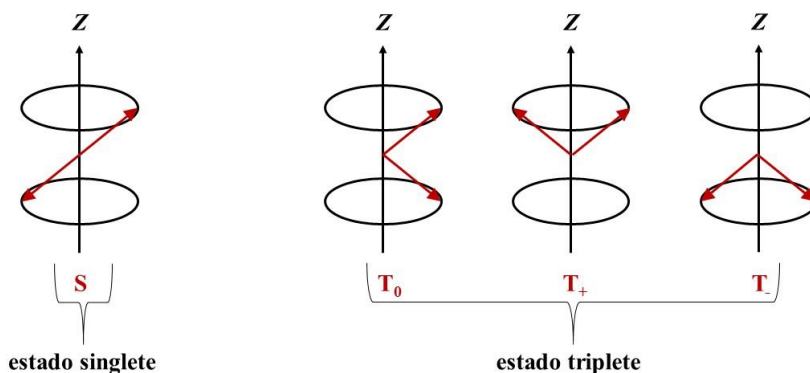


Figura 3. Representación vectorial de los estados electrónicos de espín de singlete y triplete.

Como se ha mencionado anteriormente, el estado singlete S se caracteriza por una orientación antiparalela de los espines electrónicos (espín total 0) y, por el contrario, en el triplete los espines poseen una orientación paralela existiendo tres posibilidades para la componente z: ambos vectores orientados hacia arriba (T_+ , espín total = +1) o hacia abajo (T_- , espín total = -1), y un vector orientado hacia arriba y el otro hacia abajo (T_0 , espín total = 0). De los tres estados triplete, sólo T_0 , entre los tres estados triplete, puede evolucionar hacia el estado singlete mediante cruce intersistemas.

Cruce intersistemas en los pares de radicales

Un par de radicales no queda unido para mucho tiempo porque los radicales que lo constituyen difundirán en el disolvente por separado. Dentro del par, los espines de los dos radicales no están obligados a preservar su orientación relativa, ya que cada uno de ellos se caracteriza por su propio movimiento de precesión en el campo magnético del espectrómetro. Por supuesto, si los dos radicales son diferentes, sus frecuencias de Larmor también serán diferentes. Por tanto, después de un intervalo de tiempo t , el sistema oscila entre el estado T_0 puro y el estado S_0 puro y los dos vectores están desfasados (Figura 4). A dicho cambio de multiplicidad se le llama cruce intersistemas.

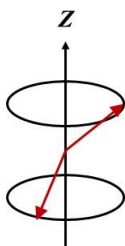


Figura 4. Superposición de los estados singlete y triplete en el cruce intersistemas.

Este proceso depende de las distintas frecuencias de Larmor y, a través de la interacción hiperfina, de los espines nucleares de los radicales.

Reacciones de los pares de radicales

Con la espectroscopía de RMN no se pueden detectar especies paramagnéticas; sólo se pueden observar productos diamagnéticos. Afortunadamente, los radicales son intermedios reactivos capaces de formar especies diamagnéticas en un tiempo corto.

La reactividad química de las moléculas en los estados singlete y triplete es diferente. Con algunas excepciones, un par de radicales en el estado triplete no reacciona, ya que el producto se generaría en un estado excitado, un estado triplete. Estas limitaciones no existen para el estado singlete.

Cualquier reacción que ocurra entre los dos radicales de un par constituye una reacción de “recombinación de caja” y los productos formados son productos “de caja” o “de jaula”. Un típico producto de “recombinación de caja” podría ser el compuesto de partida regenerado mediante la reacción opuesta a la de formación del par. Sin embargo, podría ser también un producto obtenido por una reacción de desproporción. Los

pares triplete no pueden reaccionar y entonces se separan. Este proceso se llama de “escape de caja”. Reacciones posteriores de los radicales libres “escapados” podrán dar lugar a productos diamagnéticos “de escape” que suelen ser diferentes de los productos “de caja” (Figura 5).

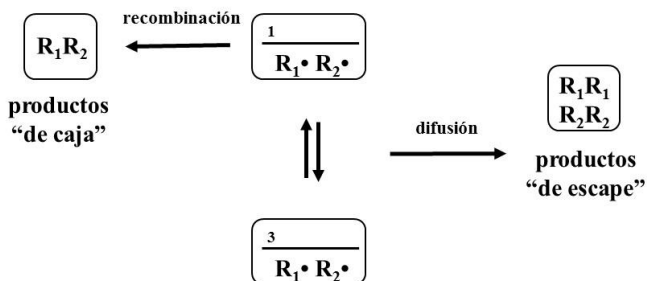


Figura 5. Reacciones de los pares en los estados electrónicos de espín triplete y singlete.

Los productos de caja son formados en una escala de tiempo de nanosegundos, mientras que los radicales que escapan de la caja pueden vivir microsegundos, o incluso milisegundos, antes de dar lugar a productos diamagnéticos.¹³³

Reglas de Kaptein

Al registrar el espectro de RMN de un determinado sistema en reacción, la formación de radicales libres puede ser detectada al observar una polarización en dirección positiva (absorción) o negativa (emisión) de algunas señales.¹¹² Se puede distinguir entre dos tipos de polarizaciones (Figura 6):

a) efecto neto, cuando en la señal se observa sólo una de las dos polarizaciones posibles: absorción (A) o emisión (E)

b) efecto multiplete, en el que absorción y emisión se producen dentro de la misma señal. Cuando la absorción se observa a campo más bajo respecto a la emisión, la polarización es de absorción/emisión (A/E). En el caso contrario, es emisión/absorción (E/A).

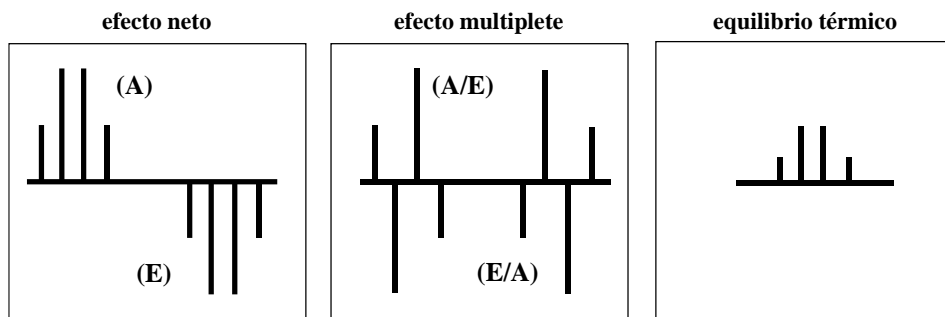


Figura 6. Polarizaciones CIDNP.

En el caso del efecto neto, la dirección de la polarización (A o E) se puede predecir aplicando la siguiente ecuación:

$$\Gamma_n = \mu \varepsilon \Delta g a$$

donde Γ_n es el signo de la polarización CIDNP, a representa el signo del acoplamiento hiperfino entre el electrón y el núcleo que se está observando, Δg la diferencia entre los factores g de los dos radicales que constituyen el par, μ la multiplicidad del precursor (“+” para un par de radicales formado en el estado triplete, “-” para el estado singlete) y ε el tipo de reacción que ocurre a partir del par radicalario (“+” para reacciones “de caja” y “-” para los “de escape”).

Por otra parte, si lo que se espera es un efecto multiplete (A/E o E/A), hay que tener en consideración más parámetros y la ecuación en este caso sería:

$$\Gamma_m = \mu \varepsilon a_i a_j J_{ij} \sigma$$

donde a_i y a_j representan el signo de los acoplamientos hiperfinos correspondientes a los protones considerados (i y j), J_{ij} la constante de acoplamiento entre los protones i y j . Finalmente, el signo de σ es positivo si los núcleos i y j se encuentran en el mismo radical, y negativo si están en radicales separados.

Anexo III

Contribuciones a congresos

- 1.- F. Palumbo; I. Andreu; M.S. Sinicropi; M.A. Miranda. **“Laser Flash Photolysis Studies on Ketoprofen Conjugates of α -Amino-Cholesterol”**. IX CONGRESO DE FOTOQUIMICA, Septiembre **2009**, Leioa (España), Póster.

- 2.- I. Andreu; F. Palumbo; D. Hernández; M.D. Coloma; J.V. Castell; M.A. Miranda. **“Photogenotoxicity induced by reactive chlorpromazine metabolites”**. 15TH CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY, Septiembre **2013**, Liège (Bélgica), Póster.

- 3.- I. Andreu; F. Palumbo; E.Nuin; M. Gómez-Mendoza; M.L. Marin; M.A. Miranda. **“New cholesterol-derived probes for solubilization and C-7 radical oxidation studies”**. 15TH CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY, Septiembre **2013**, Liège (Bélgica), Comunicación oral.

- 4.- D. Limones-Herrero; R. Pérez-Ruiz; F. Palumbo; I. Andreu; M.C. Jiménez; M. A. Miranda. **“Transient absorption spectroscopy study of chlorpromazine metabolites binding to human serum albumin”**. 4[’] JIF - JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA, Junio **2014**, Lisboa (Portugal), Póster.

- 5.- F. Palumbo; M.D. Coloma; J.V. Castell; I. Andreu; M.A. Miranda. **“Photosensitized DNA damage by reactive chlorpromazine metabolites”**. ESP PHOTOBIOLOGY SCHOOL, Junio **2014**, Bressanone (Italia), Póster.

- 6.- I. Andreu; F. Palumbo; D. Neshchadin; G. Gescheidt; M.A. Miranda. **“Hydrogen Abstraction for Cholesterol in Model Dyads”**. INTERNATIONAL CONFERENCE OF HYDROGEN ATOM TRANSFER, Junio **2014**, Roma (Italia), Póster.
- 7.- F. Palumbo; M.D. Coloma; J.V. Castell; I. Andreu; M.A. Miranda. **“Photodamage to isolated and cellular DNA promoted by N-dealkylated biotransformation products of chlopromazine”**. 16TH CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY, Septiembre **2015**, Aveiro (Portugal), Póster.
- 8 - I. Andreu, F. Palumbo; I.M. Morera; F. Bosca; M.A. Miranda. **“Steric shielding vs σ - π orbital interactions in triplet-triplet energy transfer”**. SISOC XI – 11TH SPANISH–ITALIAN SYMPOSIUM ON ORGANIC CHEMISTRY, Julio **2016**, San Sebastián (España), Póster.
- 9.- F. Palumbo; I.M. Morera; F. Bosca; I. Andreu; M.A. Miranda. **“Hydrogen abstraction for photoactive cholesterol derivatives”**. SISOC XI – 11TH SPANISH–ITALIAN SYMPOSIUM ON ORGANIC CHEMISTRY, Julio **2016**, San Sebastián (España), Comunicación oral.

Anexo IV

Publicaciones

Publicaciones directamente derivadas de la presente tesis

- 1.- I. Andreu; F. Palumbo; F. Tilocca; I. M. Morera; F. Boscá; M.A. Miranda. **“Solvent Effects in Hydrogen Abstraction from Cholesterol by Benzophenone Triplet Excited State”**. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 4096.

- 2.- D. Neshchadin; F. Palumbo; M.S. Sinicropi; I. Andreu; G. Gescheidt; M.A. Miranda. **“Topological control in radical reactions of cholesterol in model dyads”**. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 1608.

- 3.- F. Palumbo; F. Boscá, I.M. Morera, I. Andreu; M.A. Miranda. **“Biradical vs singlet oxygen photogeneration in suprofen-cholesterol systems”**. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2016**, *12*, 1196.

- 4.- F. Palumbo *et al.* **“Photoinduced intramolecular hydrogen abstraction from the C-4 position of cholesterol ”**. In preparation to be submitted to *Chem. Sci.*

Otras publicaciones relacionadas

5.- I. Andreu; I.M. Morera; F. Palumbo; G. Sastre; F. Boscá, M.A. Miranda. “**Steric shielding vs σ - π orbital interactions in triplet-triplet energy transfer**”. *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 4035.

6.- F. Palumbo; G. Garcia-Lainez; D. Limones-Herrero, M.D. Coloma; J. Escobar; M.C. Jiménez; M.A. Miranda; I. Andreu. “**Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites**”. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2016**, 313, 131.

Solvent Effects in Hydrogen Abstraction from Cholesterol by Benzophenone Triplet Excited State

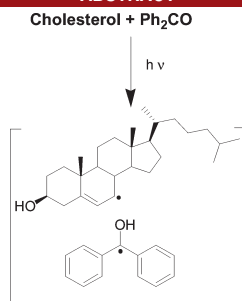
Inmaculada Andreu, Fabrizio Palumbo, Fedele Tilocca, Isabel M. Morera, Francisco Boscá,* and Miguel A. Miranda*

Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. de Los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain

fbosca@itq.upv.es; mmiranda@gim.upv.es

Received June 15, 2011

ABSTRACT



Hydrogen abstraction from the C-7 position of cholesterol (Ch) by triplet excited benzophenone (BZP) exhibits remarkable solvent-dependence in product studies. Kinetic measurements on the intramolecular version of the process in dyads containing covalently linked Ch and BZP units reveal important solvent effects and significant stereodifferentiation.

Oxidative activation of cholesterol (Ch) at the C-7 position is a process of considerable chemical and biological interest. Thus, the major pathway for the synthesis of bile acids from Ch is initiated by C-7 hydroxylation, which is achieved by the 7α -hydroxylase (CYP7A1), a member of the P450 family of metabolic enzymes.¹ It has also been claimed that C-7 oxidation is involved in the interception of blood and plasma oxidants by Ch, which thereby may act as an effective *in vivo* antioxidant.² In addition, Ch is a

major target for oxidative damage.^{3,4} This process can occur by a Type I mechanism (*via* free radicals) through abstraction of an allylic hydrogen from Ch by photosensitizing agents upon UVA light activation.⁵

Despite the importance of Type I Ch photooxidation, the key hydrogen abstraction step has not been previously subjected to mechanistic studies. In this context, we wish now to report on the photoreaction between the benzophenone (BZP) triplet excited state and Ch, a paradigmatic process of general interest.

Cholesterol is an essential structural component of cell membranes, where it is required to achieve proper permeability and fluidity. In the body, Ch can also be found in the liver or intestines, as well as in the bloodstream, where it is transported within lipoproteins. In addition, Ch is present

(1) Post, S. M.; Twisk, J.; Van Der Fits, L.; De Wit, E. C. M.; Hoekman, F. M.; Mager, W. H.; Princen, H. M. G. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 339–346.

(2) Smith, L. L. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 47–61.

(3) Lercker, G.; Rodriguez-Estrada, T. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, 2002; Chapter 1, pp 1–25.

(4) (a) Girotti, A. W. *Antioxid. Redox Signal* **2004**, *6*, 301–310. (b) Girotti, A. W. *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *13*, 105–118. (c) Foote, C. S. *Free Radicals in Biology*; Academic Press: New York, 1976; Vol. 2, pp 85–134. (d) Girotti, A. W.; Korytowski, W. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 85–100.

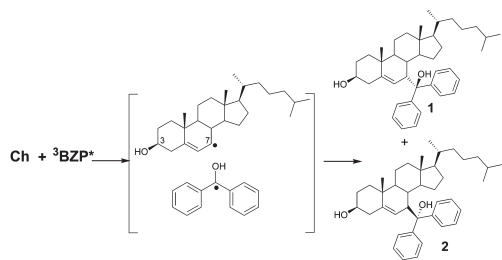
(5) (a) Andreu, I.; Boscá, F.; Sanchez, L.; Morera, I. M.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4597–4600. (b) Andreu, I.; Morera, I. M.; Boscá, F.; Sanchez, L.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 860–867.

in all foods containing animal fat. Hence, it makes sense to investigate the generation of Ch-derived radicals in lipophilic media of different characteristics. In this connection, a recent discussion has arisen on whether hydrogen abstraction from carbon is subjected to significant solvent effects. Specifically, controversial results have been reported on the solvent-dependence of H-abstraction reactivity from C–H donors such as 1,4-dienes by cumyloxy radical.⁶

With this background, the present work deals with the solvent effects on abstraction of the Ch C-7 allylic hydrogens by the triplet excited state of BZP. This issue has been addressed by performing both steady-state and time-resolved studies in different organic solvents.

To investigate photoproducts formation, steady-state photolysis of BZP/Ch mixtures (1.5:1 molar ratio) was performed under anaerobic conditions, in dichloromethane and acetonitrile, using a multilamp photoreactor equipped with UVB-lamps ($\lambda_{\text{max}} = 300$ nm, Gaussian distribution). In dichloromethane, no Ch-derived product was obtained, whereas in acetonitrile two diastereomeric photoproducts **1** and **2** were isolated.

Scheme 1. Formation of Photoproducts **1** and **2** upon Photolysis of Ch and BZP in Acetonitrile



As shown in Scheme 1, formation of **1** and **2** has to be explained by intermolecular hydrogen abstraction from the C-7 position of Ch, followed by C–C coupling of the generated radical pair. The structures of the photoproducts were unambiguously assigned on the basis of their NMR spectroscopic data (¹H, ¹³C). The stereochemistry of the new chiral center was determined by NOE experiments; the most significant interactions were observed between the phenyl groups and the protons of the convex β -face in photoproduct **2**. The details are given in the Supporting Information.

The reaction kinetics was studied by laser flash photolysis experiments at 355 nm. Thus, when the reciprocal triplet lifetime was plotted against Ch concentration a linear relationship was found in dichloromethane as solvent

(6) (a) Koner, A. L.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2899–2902. (b) Bietti, M.; Salamone, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3654–3657. (c) El-Sheshtawy, H. S.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2694–2697. (d) Salamone, M.; Giannarioli, I.; Bietti, M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4645–4651.

(see Figure 1, insert). The quenching rate constant was found to be $2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. However, under these conditions extensive H-abstraction from the solvent was observed. This is clear from the comparison of the long-lived component in the kinetic traces at 545 nm (ascribed to the ketyl radical formed by hydrogen abstraction from the solvent) obtained in the presence and in the absence of Ch (Figure 1). In acetonitrile quenching was faster, but the kinetic parameters could not be accurately determined due to solubility limitations; nonetheless, the rate constant, estimated from the initial slope of the nonlinear plot (not shown), was *ca.* 1 order of magnitude higher. Similar solubility problems were found in other organic solvents such as methanol or dioxane, which in addition are better hydrogen donors than acetonitrile. Thus, the major difficulties in obtaining reliable data for the intermolecular photoreaction between Ch and BZP are related to the low solubility of Ch and the possibility of hydrogen abstraction from the solvent by triplet BZP. To circumvent these problems, a possible strategy could be to examine the intramolecular version of the process, using covalently linked Ch and BZP units. This would prevent the need for high quencher concentrations and should result in a dramatic decrease of the triplet lifetimes, minimizing hydrogen abstraction from the solvent. Moreover, the covalent link between the Ch and BZP units would completely block radical cage escape, favoring C–C coupling.

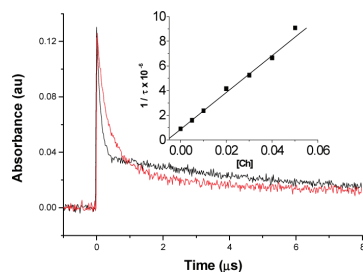


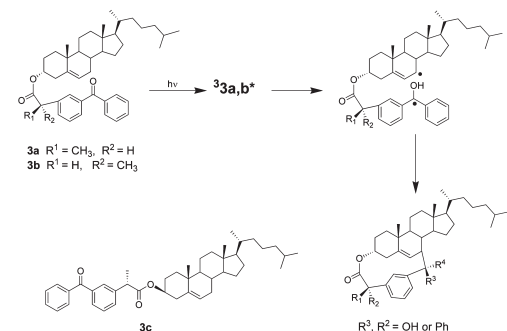
Figure 1. Trace obtained at 545 nm upon laser excitation of BZP in dichloromethane solutions in the absence (red) and in the presence of Ch (black, 0.02 M). Inset: Stern–Volmer plot showing the effect of Ch addition on the rates of BZP triplet decay at 610 nm.

Following this idea, diastereomeric dyads, **3a** and **3b** (Scheme 2), were submitted to laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm) under a variety of conditions, in order to determine the kinetic parameters and the quantum yields of the relevant processes.

We have previously demonstrated that the transient absorption spectra of **3a** and **3b** in dichloromethane do not correspond to the triplet excited states but instead to the corresponding biradicals, generated by intramolecular hydrogen abstraction. Subsequent cyclization gives rise to C–C coupling photoproducts in a diastereoselective

manner.⁵ Here, the transient absorption spectra of **3a,b** were recorded in different solvents (dichloromethane, acetonitrile, dioxane, methanol, and octanol) 50 ns after the 355 nm laser pulse. In all cases, the transients displayed similar spectral features.

Scheme 2. Structures of **3a–c** and Products Resulting from Irradiation of Dyads **3a** and **3b**



As an example, Figure 2 shows the spectrum of dyad **3a** in methanol (top), which corresponds essentially to the biradical, with a lifetime in the submicrosecond time scale. For comparison, the results obtained for **3c**, which also contains the Ch and BZP units but cannot adopt the folded conformation due to its 3β configuration, are shown in Figure 2 (bottom). In the latter, the typical BZP triplet–triplet absorption was initially observed; the ketyl radical formed by intermolecular H-abstraction from methanol was found to develop at a later stage and did not decay within several microseconds.

As a consequence of the spectral overlap of triplets and biradicals and because of the short triplet lifetimes, it was not possible to achieve direct observation of the T–T absorption of dyads **3a** and **3b** in different media for reliable kinetic measurements. Hence, further experiments were performed to obtain accurate values for the triplet lifetimes (τ_T) by the well-established energy transfer method, using naphthalene as the acceptor (see Supporting Information).^{7,8} From these data the intramolecular quenching rate constants (k_{iq}) were determined; the values (ranging between 2.3×10^7 and $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) are given in Table 1.

Direct kinetic analysis of the decay traces at 545 nm led to determination of biradical lifetimes (τ_{BR}). The quantum yields of biradical formation (ϕ_{BR}) were estimated by the comparative method,⁹ from the short-lived component of

the transient absorbance at 545 nm immediately after the laser pulse. This was achieved using BZP as standard and assuming the same molar absorption coefficient for the biradicals and for the longer-lived BZP ketyl radical formed by intermolecular hydrogen abstraction from the solvent. It is interesting to note that, even in good hydrogen-donating solvents (dioxane, methanol), the intramolecular process ($\phi_{\text{BR}} = 0.65\text{--}0.73$) was by far more efficient than its intermolecular counterpart ($\phi_{\text{KR}} = 0.05\text{--}0.14$). As expected, all radicals arising from hydrogen abstraction reactions were quenched by oxygen with rate constants in the range of $(1.5\text{--}5.0) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

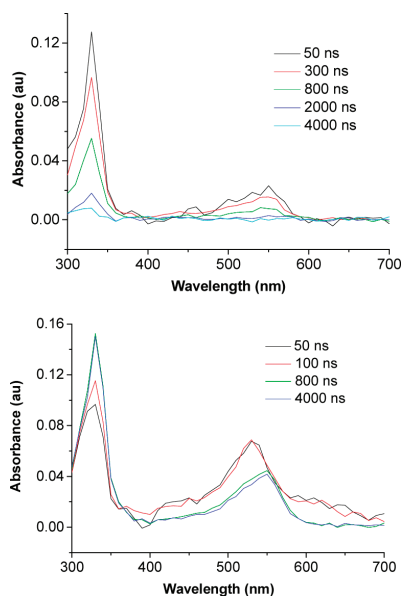


Figure 2. Transient absorption spectrum of dyad **3a** (top) and **3c** (bottom) under N_2 in methanol at different times after the laser pulse ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$).

After establishing the values of k_{iq} and ϕ_{BR} , the rate constants for intramolecular hydrogen abstraction (k_{H}) and physical quenching (k_{T}) were determined in all solvents taking into account that $k_{\text{H}} = k_{\text{iq}} \times \phi_{\text{BR}}$ and $k_{\text{iq}} = k_{\text{H}} + k_{\text{T}}$. The obtained results are summarized in Table 1. Although deriving clear-cut correlations between the k_{H} values and the solvent properties was not straightforward, important solvent effects and significant stereodifferentiation were indeed noticed. The observed trends serve as examples for the presently debated existence of solvent effects on CH hydrogen abstractions. Thus, a much faster process (*ca.* 4 \times) occurred in dichloromethane than in dioxane or methanol, whereas an intermediate situation was found for acetonitrile. In most solvents, a significant stereodifferentiation was also observed, with higher k_{H} values for **3b** than for **3a**.

(7) Martínez, L. J.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11066–11070.

(8) (a) Miranda, M. A.; Martínez, L. A.; Samadi, A.; Boscá, F.; Morera, I. M. *Chem. Commun.* **2002**, 280–281. (b) Boscá, F.; Andreu, I.; Morera, I. M.; Samadi, A.; Miranda, M. A. *Chem. Commun.* **2003**, 1592–1593.

(9) Carmichael, I.; Gordon, L. H. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*, 1–250.

Table 1. Photophysical and Photochemical Parameters of Triplet Excited States of Dyads **3a** and **3b** in Different Solvents^a

		τ_T (μs)	$k_{\text{iq}}/10^6$ (s^{-1}) ^c	$k_{\text{H}}/10^6$ (s^{-1}) ^d	$k_{\pi}/10^6$ (s^{-1}) ^d	ϕ_{BR} ^e	τ_{BR} ^d (μs)	ϕ_{KR} ^e	ϕ_{PR} ^f
3a	CH_2Cl_2 ^b	0.010	100	80	20	0.80	0.28	0.00	0.30
3a	CH_3CN	0.025	33	26	7	0.80	0.60	0.00	0.70
3a	Dioxane	0.030	23	19	4	0.70	0.66	0.14	0.76
3a	CH_3OH	0.030	28	20	8	0.69	0.80	0.05	0.76
3b	CH_2Cl_2 ^b	0.010	100	80	20	0.80	0.22	0.00	0.47
3b	CH_3CN	0.020	50	37	13	0.75	0.56	0.00	0.70
3b	Dioxane	0.020	39	33	6	0.73	0.62	0.13	0.76
3b	CH_3OH	0.020	45	31	14	0.65	1.10	0.05	0.64

^a Relative errors lower than 5% of the stated values. ^b Data reported in part in ref 5. ^c The intramolecular quenching rate constants were obtained by using the equation $k_{\text{iq}} = 1/\tau_i - 1/\tau_0$, where τ_i are the triplet lifetimes of compounds **3a** and **3b** and τ_0 is the BZP triplet lifetime in the different solvents. ^d The rate constants for hydrogen abstraction and physical quenching by the π system were obtained using the following equations: $k_{\text{H}} = k_{\text{iq}} \times \phi_{\text{BR}}$ and $k_{\text{iq}} = k_{\text{H}} + k_{\pi}$. ^e The biradical quantum yields were determined by the comparative method, using BZP as standard and assuming the same molar absorption for the biradicals and the BZP ketyl radical. ^f Photodegradation quantum yield was determined using *N*-methylidiphenylamine as actinometer.¹⁰

To investigate the influence of solvents on the overall photoreduction process, solutions of dyads **3a** and **3b** in dichloromethane, acetonitrile, dioxane, and methanol were photolyzed under identical conditions, and the disappearance of the carbonyl chromophore with irradiation time was monitored by the progressive decrease of the 254 nm absorption band. Some representative results are shown in Figure 3. The photoreduction quantum yields were determined using *N*-methylidiphenylamine as actinometer¹⁰ (see Table 1). Again, important solvent effects and significant stereodifferentiation were observed. Noteworthy, the less efficient photoreaction was found for dichloromethane, in spite of the fact that the highest k_{iq} , ϕ_{BR} , and k_{H} values were measured in this solvent. Actually, biradical formation does not necessarily lead to the C–C coupling products. This is because biradicals can also follow alternative decay pathways, for instance back oxygen-to-carbon hydrogen transfer to regenerate the starting materials, a process that would be retarded by stabilization of the 1-hydroxy-biradicals *via* hydrogen bonding to the solvents.

In summary, hydrogen abstraction from the C-7 position of Ch by triplet excited BZP is a process of considerable chemical and biological interest, which exhibits a remarkable solvent-dependence. In the intermolecular version, a striking difference is observed in product studies between dichloromethane and acetonitrile, although kinetic effects are difficult to evaluate due to solubility limitations. By contrast, covalent linking of the Ch and BZP units in dyads **3a** and **3b** has made it possible to obtain a complete set of kinetic measurements under different

(10) Förster, E. W.; Grellman, K. H.; Linschitz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3108–3115.

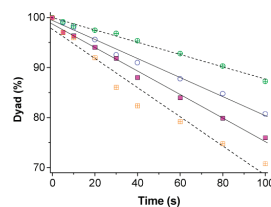


Figure 3. Photoreduction of dyads **3a** and **3b** in different deaerated media as a function of the irradiation time. The percentage of unreacted compound was monitored by UV-absorption spectroscopy at 254 nm. Green: **3a** in CH_2Cl_2 . Blue: **3b** in CH_2Cl_2 . Orange: **3a** in MeOH. Magenta: **3b** in MeOH.

conditions. This has revealed important solvent effects and significant stereodifferentiation in most of the involved processes and particularly in the rate constant of intramolecular hydrogen abstraction.

Acknowledgment. Financial support from the MICINN (Grants CTQ2009-13699 and CTQ2010-19909), from the Generalitat Valenciana (GV/2009/104) and from Carlos III Institute of Health (Grant RIRAAF, RETICS program) is gratefully acknowledged. Dedicated to Prof. Dr. Carmen Nájera on the occasion of her 60th birthday.

Supporting Information Available. Spectroscopic data and experimental details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Topological control in radical reactions of cholesterol in model dyad†

Cite this: *Chem. Sci.*, 2013, 4, 1608Dmytro Neshchadin,^{*a} Fabrizio Palumbo,^b M. Stefania Sinicropi,^c
Inmaculada Andreu,^d Georg Gescheidt^a and Miguel A. Miranda^{*b}

Cholesterol is one of the most important building blocks of cell membranes. It is also one of the main targets for oxidation via Type I hydrogen abstraction (HA), which leads to a variety of physiological consequences in the human body. To provide a deeper understanding of the oxidation mechanism, steady-state ¹H CIDNP, steady-state and laser-flash photolysis in combination with quantum mechanical calculations were applied to study HA in three model systems. The experiments involved photoinduced reactions in a cholesterol–benzophenone mixture and two derivatives, in which aminocholestene and benzophenone are covalently coupled yielding a dyad. It has been found, that a specific orientation of the benzophenone moiety toward the allylic hydrogens of cholesterol/aminocholestene is crucial for the efficient HA. Such a confined topology may play an important role for the particular oxidation of cholesterol in cell membranes.

Received 29th November 2012
Accepted 22nd January 2013

DOI: 10.1039/c3sc22109a

www.rsc.org/chemicalscience

Introduction

Cholesterol (Ch, **1a**) is one of the most important components of cell membranes. Its oxidation in cells via enzymatic and non-enzymatic mechanisms has well-known physiological consequences from inflammation to cardiovascular and Alzheimer diseases.¹ Non-enzymatic oxidation mechanisms can be classified into two major groups. Type I oxidation involves hydrogen abstraction (HA) from Ch by reactive species such as hydroxyl, alkyl, alkoxy or peroxy radicals, and carbonyl triplets.² By contrast, Type II oxidation is mediated by singlet oxygen. The preferred site for HA in Ch is at carbon C₇, where the C–H bond is relatively weak. Primary HA leads to a carbon-centered radical (Ch(C₇)), which can be trapped by ground-state oxygen³ producing ChOO. These peroxy radicals are reactive enough to abstract liable hydrogens from native Ch molecules, starting a new chain of reactions. Moreover, in cell membranes ChOO can abstract hydrogen from different lipids, like polyunsaturated fatty acids (PUFA), initiating various radical-chain reactions that

lead to lipid peroxidation. The follow-up reactions of the primary Ch(C₇) radical itself gave rise to different oxysterols that are used as biological markers for the oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. The current state-of-the-art in the field of non-enzymatic oxidation of Ch, as well as the use of oxidized Ch as a biomarker, is given in a recent review.⁴

Photo-excited benzophenone (BZP) is often used as a convenient model for biologically relevant free radicals in reactions where HA is involved.^{5,6} Its electronic structure and the rate constants for HA closely resemble those of oxygen-centered free radicals. This primarily applies to allylic hydrogens.^{7,8} Moreover, it is relatively easy to implement BZP as a photo-triggered hydrogen abstractor, being convenient for time-resolved investigations. Recently, we have successfully applied this approach to show an efficient generation of biradicals in dyads with an ester moiety linking the BZP and Ch units, which are appropriate models to study Type I Ch oxidation.^{9,10}

Time-Resolved Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization (TR-CIDNP)^{11,12} is a very powerful method to follow free radical reactions.^{13,14} In photo-chemical processes, such as bond cleavage, electron or hydrogen transfer, free radicals are usually born within (triplet) correlated radical pairs. To recombine in a solvent cage, those radical pairs must reach an overall singlet state. Since electron spins are coupled via hyperfine interaction to nuclear spins, the rate of intersystem crossing depends on the latter. Radical pairs with one nuclear spin orientation reach singlet state rapidly and tend to react immediately in cage. Conversely, radical pairs with opposite nuclear spin orientation do not reach the overall singlet state within their in-cage lifetime and react via an alternative exit channel, e.g. Spin–Orbit-Coupling (SOC) driven reactions. Thus,

^aInstitute of Physical and Theoretical Chemistry, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, 8010 Graz, Austria. E-mail: neshchadin@tugraz.at; Fax: +43 316 87332202

^bInstituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de Valencia, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: mmiranda@qim.upv.es

^cDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, 87036 Cosenza, Italy

^dUnidad mixta de investigación IIS La Fe – UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3sc22109a

nuclear-spin states influence the probability for in-cage or exit channel reactions. This spin-sorting mechanism leads to an overpopulation of certain spin states in products of two different types: cage and escape/exit, an effect that becomes manifest in NMR signals recorded shortly after generation of the radical pair. The resulting spectrum consists of NMR signals, which appear in absorption and emission, *i.e.* they are differently polarized. CIDNP polarizations depend not only on the nuclear spin states but also on hyperfine coupling constants (*hfc*s), the difference of *g* factors of the reacting free radicals, and the exchange integral; accordingly, all those important parameters can, in principle, be evaluated from CIDNP spectra. Moreover, when executed in a time-resolved manner,^{12,15} CIDNP sheds light on the kinetics of free radical processes.¹⁶

Herein, we have studied covalently linked benzophenone-aminocholestene¹⁷ dyads, prepared from ketoprofen (Kp) as a simple BZP derivative. In these systems, both reaction partners possess a confined geometry and are located in close proximity to each other. This is reminiscent of the situation of Ch in cell membranes, where movement is heavily restricted by the environment and Ch is more inclined to radical formation than the surrounding PUFA,¹⁸ despite the fact that the C₇-H bond-dissociation energy in Ch is *ca.* 50 kJ mol⁻¹ higher than homolytic cleavage of the allylic hydrogens in PUFA.¹⁹ Thus, entropic factors, such as proximity and preorientation, must play a predominant role in the oxidation of Ch in membranes.

We combine steady-state photolysis, photoproducts studies, laser flash photolysis (LFP) and photo-CIDNP, to follow primary intramolecular HA from 3 α -amino-5-cholestene (NH₂Ch, **1b**) by the triplet excited state of Kp in Kp-NHCh dyads **2** and **3** (see structures in Chart 1).

Results and discussion

Steady-state and laser flash photolysis

The diastereoisomeric amides **2** and **3** were prepared from α -aminocholestene (**1b**) and (*S*) or (*R*)-Kp following standard procedures⁹ (see details in ESI[†]). Steady-state photolysis was carried out using monochromatic light at 254 nm in dichloromethane (*ca.* 10⁻⁵ M solutions) under nitrogen atmosphere. It was monitored by UV spectrophotometry following the decrease of the typical π , π^* BZP absorption band at 254 nm. As shown in Fig. 1, UV spectral changes were consistent with reduction of the BZP chromophore. Interestingly, dyad **2** was significantly more photoreactive than its diastereoisomer **3**.

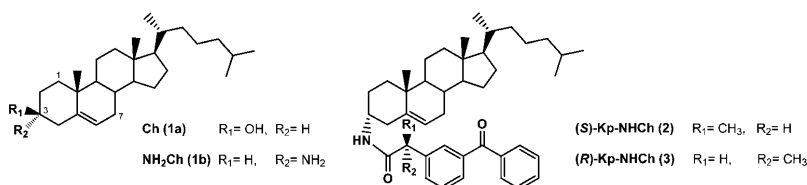


Chart 1 Chemical structures of compounds 1–3.

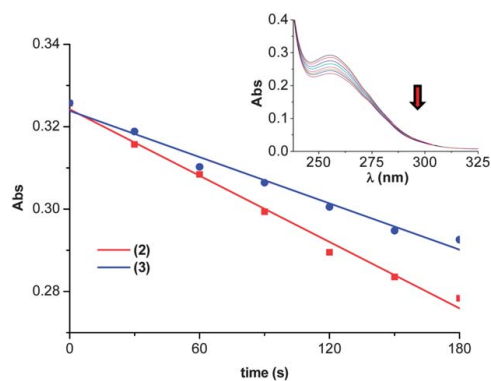
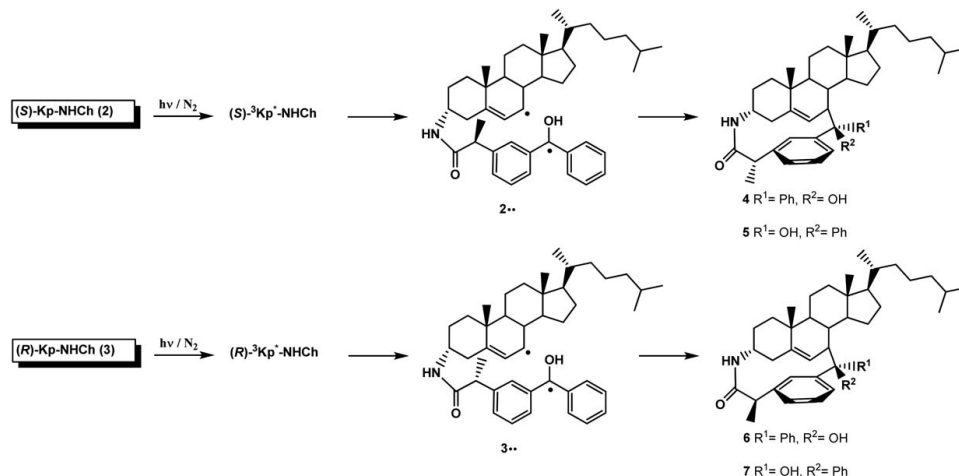


Fig. 1 Photoreaction of dyads (*S*)-Kp-NHCh (**2**) and (*R*)-Kp-NHCh (**3**) at 254 nm as a function of the irradiation time (CH₂Cl₂, inert atmosphere). Inset: changes in absorption spectrum of a deaerated dichloromethane solution of **2** after increasing irradiation times.

Taking into account that intramolecular HA in the dyads is expected to generate carbon-centered biradicals,^{10,20} which can recombine to form C–C coupling products, irradiation of dyads **2** and **3** was performed at preparative scale to investigate photoproduct formation. Hence, dichloromethane solutions of **2** and **3** were photolyzed through Pyrex, with a 400 W medium pressure mercury lamp. The progress of the photoreactions was monitored by TLC and NMR. Photomixtures were submitted to silica gel column chromatography affording two pairs of diastereoisomeric products. The structures of compounds **4–7** were unambiguously assigned on the basis of their NMR (¹H and ¹³C), and mass spectral data. Their formation can be explained as the result of intramolecular HA from the C₇ allylic position of Ch by the triplet excited state of Kp, followed by C–C coupling of the generated biradical (Scheme 1).

In order to obtain direct experimental evidence supporting the proposed mechanism involving the intramolecular HA step, dyads **2** and **3** were submitted to LFP studies. Experiments were performed in dichloromethane solutions, under nitrogen, using 355 nm as the excitation wavelength. The transient absorption spectra, obtained 200 ns after the laser pulse, indicated the presence of two species: an earlier intermediate assigned to the triplet excited state (triplet-triplet absorption of the BZP chromophore) with maxima at *ca.* 325 and 525 nm, and a ketyl-allyl biradical showing typical bands with maxima at *ca.* 330 and



Scheme 1 Formation of products 4–7 upon irradiation of dyads 2 and 3.

545 nm. Both species were efficiently quenched by oxygen. As shown in Fig. 2A, dyad 2 (red line) showed slightly higher contribution of biradical than dyad 3.

Kinetic analysis of the triplet decays (Fig. 2B), using a bi-exponential function, led to the determination of the triplet and biradical lifetimes. The triplet lifetimes were very short (ns timescale), whereas the generated biradicals were much longer-lived (0.5 and 0.8 μs for 2 and 3, respectively). As a consequence of the spectral overlap of triplets and biradicals and because of the short triplet lifetimes, it was not possible to achieve accurate values for the triplet lifetimes by direct observation of the T–T absorption of dyads 2 and 3. Therefore, additional experiments were performed by the well-established energy transfer method, using naphthalene as the acceptor.²¹

Dichloromethane solutions of 2 and 3 were submitted to LFP ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) in the presence of increasing amounts of NP,

and the triplet–triplet absorption of NP was observed and monitored at 415 nm.

When the reciprocal transient absorbance at 415 nm was plotted against the reciprocal of NP concentration straight lines were obtained (see eqn (1) and the inset Fig. 2B).

$$1/A_{415} = \alpha + \alpha/(k_q \times \tau_i \times [\text{NP}]) \quad (1)$$

here, A_{415} is the absorbance of the triplet of NP at 415 nm, before significant decay takes place, k_q is the bimolecular rate constant for triplet quenching by NP, τ_i is the triplet lifetime of 2 or 3 in the absence of NP, and α is a constant. The Stern–Volmer parameters ($k_q \times \tau_i$) were obtained from the intercept-to-slope ratios. They were found to be 440 M^{-1} and 1072 M^{-1} for 2 and 3, respectively. Moreover, the intermolecular k_q determined in dichloromethane for Kp was $8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which was

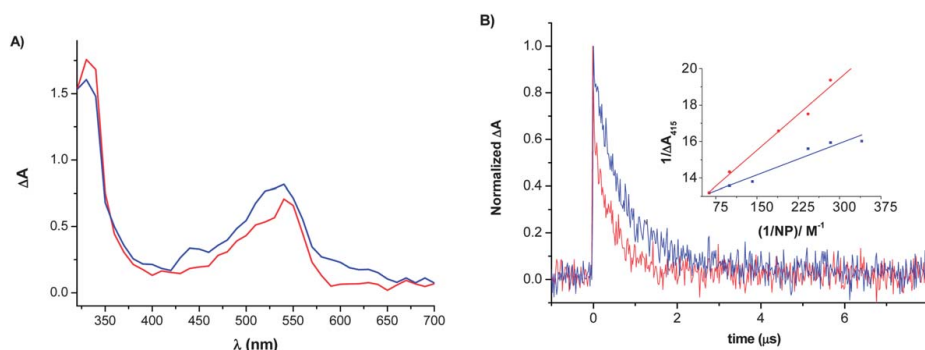


Fig. 2 (A) Transient absorption spectra obtained ca. 0.2 μs after laser pulse ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) for (S)-Kp-NHCh (2, red) and (R)-Kp-NHCh (3, blue). (B) Normalized decays of the transients generated from 2 (red) and 3 (blue) monitored at 525 nm. Inset: double reciprocal plot for quenching of dyads 2 (red) and 3 (blue) triplet excited state by NP in CH_2Cl_2 .

assumed to be the same for the dyads. With these data, the triplet lifetimes obtained were 55 ns for **2** and 134 ns for **3**. The obtained values were used to determine the rate constants for the intramolecular process (k_{iq}) by means of eqn (2), and the values obtained were $1.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ for **2** versus $6.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ for **3**.

$$k_{iq} = 1/\tau_i - 1/\tau_0 \quad (2)$$

where τ_0 is the triplet lifetime of the reference compound, namely, (S)-Kp (1.6 μs).

From a qualitative point of view, these results are in agreement with those obtained in steady-state photolysis, confirming that dyads **2** and **3** display an important stereodifferentiation in the intramolecular HA process.

Photo-CIDNP

A mixture of Ch and BZP (as the hydrogen abstractor) did not show any CIDNP effects at a wide range of concentrations (μM – mM) in dichloromethane- d_2 and benzene- d_6 . Also, no resonances of follow-up products were found in the NMR spectrum after the CIDNP experiment was accomplished. Conversely, dyads **2** and **3** exhibited rather strong ^1H CIDNP polarizations. The NMR and CIDNP spectra of **2** and **3** at different conditions, together with the assignments of the signals, are shown in Fig. 3 and 4. The assignments are based on the NMR spectra of isolated photoproducts. In the CIDNP spectra of dyads **2** and **3**, NMR transitions are polarized in both, positive (enhanced absorption, EA) and negative (enhanced emission, EE) directions. Besides the polarizations of parent **2** and **3**, only few

signals of additional products were found. Table 1 shows the chemical shifts of all assigned NMR signals of dyads **2** and **3**, together with types of their polarizations in the CIDNP spectra.

Quantum mechanical calculations

The knowledge about values and signs of hfcs is crucial to interpret CIDNP spectra. We have performed B3LYP/TZVP DFT^{22,23} calculations of hfcs in biradicals **2'** and **3'** as the superposition of two mono-radicals **A** (Ch-type) and **B** (BZP-type). This was done since DFT methods do not allow calculations of hfcs in biradicals. In addition, alkyl chains were removed from calculations for the sake of CPU time. As the starting point for the calculation of free radicals, we have used B3LYP/TZVP optimized structures of **2** and **3** (Fig. 5). It is important to note that the distance between the carbonyl oxygen and one of the allylic protons in **2** and **3** is only *ca.* 2.6 Å. Fig. 6 shows geometries and hfcs (larger than 1 G) of radicals **A** and **B**. The calculations show that the predominant amount of spin population in radicals **A** and **B** is located close to the radical center. The most prominent hfcs in radicals **A** and **B** belong to H_f (24.3 G), H_c (–15.6 G), and H_d (13.6 G, average of two values) protons. The geometries of free radicals **A** and **B** were not very different from those of the parent **2** and **3**.

CIDNP assignments

The ^1H CIDNP spectra of **2** and **3** clearly indicate partly reversible hydrogen transfer between the NH_2Ch and BZP moieties of dyads **2** and **3** (Fig. 3b and 4b). This is reflected by the polarizations of resonances of parent **2** and **3**. The values of CIDNP polarizations from parent **2** and **3** are in perfect agreement with

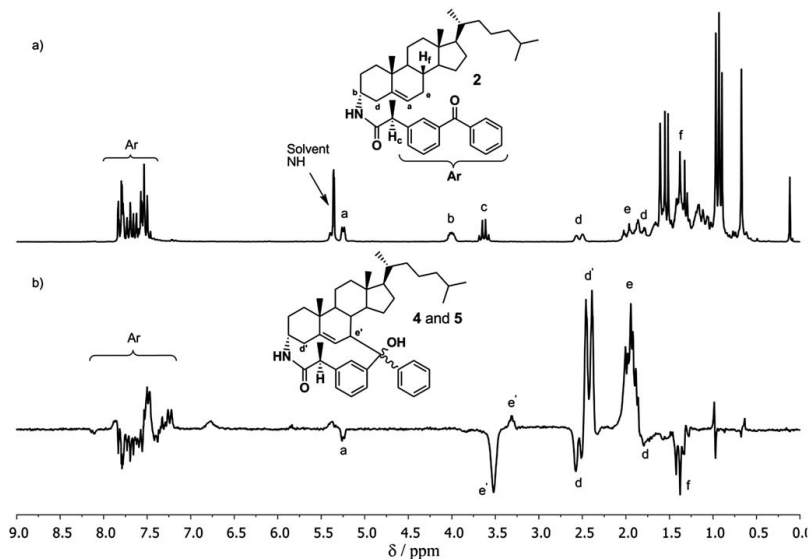


Fig. 3 NMR (a) and CIDNP (b) spectra of **2** taken (time to the center of RF pulse) 2 μs after the laser flash (355 nm) in CD_2Cl_2 , together with the assignments of the most important protons.

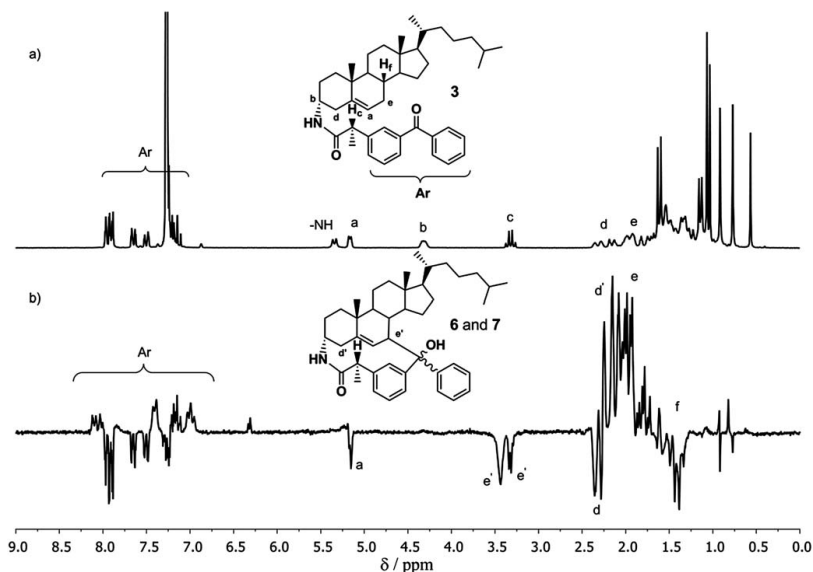


Fig. 4 NMR (a) and CIDNP (b) spectra of **3** taken (time to the center of RF pulse) 2 μ s after the laser flash (355 nm) in C_6D_6 , together with the assignments of the most important protons.

the calculated hfc (Fig. 6). That is, higher polarizations in **2** and **3** correspond to bigger absolute values of hfc in biradicals **2'** and **3'**, which are the result of the intramolecular hydrogen

transfer in the triplet excited state. In biradicals **2'** and **3'**, the protons possessing significant hfc values are: H_a , H_d , H_e , H_f , and aromatics. The signals of these protons are most strongly

Table 1 NMR and CIDNP parameters of **2** and **3** and their assignments derived from Kaptein's rules. (For numbering, see Fig. 3 and 4)

Proton	Chemical shift ppm	Sign of CIDNP polarization	Sign of hfc in free radical	$I = a \times \Delta g \times \mu \times \epsilon$
Dyad 2 (CD_2Cl_2)				
H_a	5.24	–	+	– = + – + +
H_b	3.99	Not polarized		
H_c	3.63	Not polarized		
H_d	2.54	–	+	– = + – + +
H_e	1.95	+	–	+ = – – + +
H_f	1.37	–	+	– = + – + +
New signals				
$H_c(1)$	3.52	–	–	– = – – + –
$H_c(2)$	3.31	+	–	+ = – – + +
H_d'	2.42	+	+	+ = + – + –
Dyad 3 (C_6D_6)				
H_a	5.16	–	+	– = + – + +
H_b	4.31	Not polarized		
H_c	3.32	Not polarized		
H_d	2.32	–	+	– = + – + +
H_e	1.91	+	–	+ = – – + +
H_f				
New signals				
$H_c(1)$	3.43	–	–	– = – – + –
$H_c(2)$	3.32	–	–	– = – – + –
H_d'	2.18	+	+	+ = + – + –

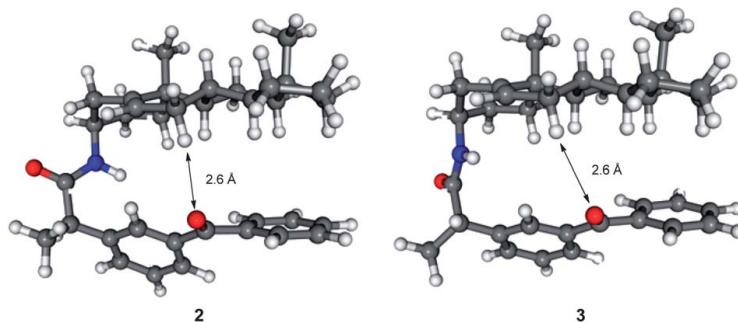


Fig. 5 Calculated (B3LYP/TZVP) geometries of **2** and **3**.

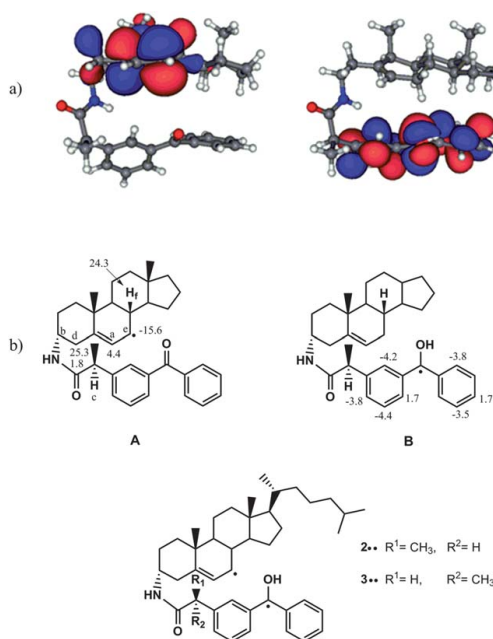


Fig. 6 SOMO visualization (a) and calculated (B3LYP/TZVP) hfcs (>1 G) of radicals **A** and **B**, which were used to predict hfcs in biradicals **2'** (for **3'** see ESI†).

polarized in CIDNP spectra. This is in concert with the theory of CIDNP and obeys Kaptein's rule for net polarization:²⁴

$$I = a \times \Delta g \times \mu \times \varepsilon \quad (3)$$

where " I " is the sign of CIDNP polarization, " a " is the sign of the hfcs, " Δg " the g -factor difference of radicals within a primary radical pair, " μ " the multiplicity of the precursor ($\mu = +$ for a radical pair formed in the triplet state, " $-$ " for the singlet state) and ε the type of the exit channel ($\varepsilon = +$ for cage and " $-$ " for escape/exit products). Thus, protons with opposite polarizations possess hfcs of opposite sign (Table 1). However, this rule

is applicable only for relatively long biradicals, where radical centers are well-separated in space and the exchange interaction between two electron spins is negligible.²⁵ When the exchange interaction exceeds the hyperfine one, only mixing between T_- (or T_+) and S states is possible (no T_0 - S mixing), therefore the sign of the polarization does not depend anymore on the sign of the hyperfine coupling constant. In that case, all signals are polarized in the same direction. Our CIDNP spectra are unambiguously of T_0 - S type (both negative and positive polarizations) that implies a negligible exchange interaction between electron spins, even though the distance between them is *ca.* 5 Å, that is equivalent to three single carbon-carbon bonds.

Apart from back hydrogen transfer, re-forming parent **2** and **3**, a second reaction occurs after intramolecular HA, namely cyclization between carbon C_7 of aminocholestene and the carbonyl carbon of the BZP moiety yielding **4**–**7**. This is reflected by three polarized multiplets in each spectrum that are assigned to H_d' and H_e' protons of two pairs of diastereoisomers. Assuming that the g factors of the ketyl parts of biradicals **2'** and **3'** are larger than those of the NH_2 Ch moieties,²⁶ we conclude that back hydrogen transfer is a "cage" reaction. Accordingly, the radical cyclization is an exit channel. This is in concert with the positive polarization of H_d' (2.18 ppm) and the negative one of H_e' (3.43 and 3.32 ppm) in **3** (the full treatment of polarizations with Kaptein's rule is shown in Table 1). However, in the CIDNP spectrum of **2**, H_e' is positively polarized. Within our paradigm, it suggests that one of the diastereoisomers **4** or **5** is formed directly from the triplet state. A similar behavior of cycloalkanones described by Kaptein²⁷ was attributed to a SOC driven reaction.

As mentioned above, a mixture of Ch and BZP did not show significant reactivity in the TR-CIDNP and NMR experiments, but dyads **2** and **3** reacted very efficiently. The same reactivity pattern was observed by steady-state irradiation and LFP experiments. For the combination of BZP and Ch it was previously shown²⁹ that in hydrogen donating solvents (dichloromethane, dioxane, methanol) the major reaction pathway is HA from the solvent. However, even in acetonitrile, which has a poor hydrogen donating ability, bimolecular reaction of the triplet excited state of BZP with Ch is much less efficient than in

dyads containing covalently linked BZP and Ch moieties. The quantum yields of biradicals in those dyads, produced *via* intramolecular HA, were $\phi_{BR} = 0.65$ – 0.80 depending on the solvent. This drastically exceeded the quantum yields of intermolecular reactions ($\phi_{KR} = 0.00$ – 0.14). In dyads 2 and 3, which are very similar to those discussed above, the distance between the carbonyl oxygen and the abstractable hydrogen at C₇ is only 2.6 Å in their minimum ground-state conformations. In our view, this short distance and orientation determine such a high reactivity of dyads 2 and 3 compared to the bimolecular reaction between Ch and BZP. The same topologic factors can play a significant role in cell membranes, where Ch is more prone to oxidation than the surrounding PUFA.

Conclusions

The photoreaction between BZP and the NH₂Ch moieties of covalently bound dyads 2 and 3 proceeds mainly *via* intramolecular HA. The analogous reaction in (bimolecular) Ch/BZP mixtures is substantially less efficient. This points to a very specific orientation of the reactants being decisive for the HA reaction. Since sterol moieties are particularly oriented in membranes, such topologically controlled reactions could be essential in nature. Our results also illustrate the importance of entropic factors in radical reactions.

Acknowledgements

Financial support from the MICINN (Grants CTQ2009-13699 and CTQ2010-14882), from the Generalitat Valenciana (Grisolia fellowship for F. P.) from the Carlos III Institute of Health (Grant RIRAAF, RETICS program and Miguel Servet Contract CP11/00154 for I. A.) and TU Graz is gratefully acknowledged.

References

- G. J. Schroepfer Jr, *Physiol. Rev.*, 2000, **80**, 361–554.
- F. Shahidi and Y. Zhong, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4067–4079.
- A. W. Girotti, G. J. Bachowski and J. E. Jordan, *Lipids*, 1987, **22**, 401–408.
- L. Iuliano, *Chem. Phys. Lipids*, 2011, **164**, 457–468.
- D. Neshchadin, R. Levinn, G. Gescheidt and S. N. Batchelor, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 7008–7016.
- I. Andreu, D. Neshchadin, E. Rico, M. Griesser, A. Samadi, I. M. Morera, G. Gescheidt and M. A. Miranda, *Chem.-Eur. J.*, 2011, **17**, 10089–10096.
- M. V. Encinas and J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 6393–6397.
- W. M. Nau, F. L. Cozens and J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 2275–2282.
- I. Andreu, I. M. Morera, F. Bosca, L. Sanchez, P. Camps and M. A. Miranda, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 860–867.
- I. Andreu, F. Bosca, L. Sanchez, I. M. Morera, P. Camps and M. A. Miranda, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4597–4600.
- G. L. Closs and R. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 1639–1641.
- J. K. Vollenweider, H. Fischer, J. Hennig and R. Leuschner, *Chem. Phys.*, 1985, **97**, 217–234.
- H. D. Roth, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 540–546.
- M. Goez and G. Eckert, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 5294.
- G. L. Closs, R. J. Miller and O. D. Redwine, *Acc. Chem. Res.*, 1985, **18**, 196–202.
- A. Yurkovskaya, O. Morozova and G. Gescheidt, *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, John Wiley & Sons Ltd., 2012, vol. 1, pp. 175–206.
- M. Lönnfors, O. Engberg, B. R. Peterson and J. P. Slotte, *Langmuir*, 2012, **28**, 648–655.
- H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl and G. Juergens, *Free Radical Biol. Med.*, 1992, **13**, 341–390.
- H. W. Gardner, *Free Radical Biol. Med.*, 1989, **7**, 65–86.
- I. Andreu, F. Palumbo, F. Tilocca, I. M. Morera, F. Bosca and M. A. Miranda, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 4096–4099.
- J. C. Scaiano, W. G. McGimpsey, W. J. Leigh and S. Jakobs, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 4540–4544.
- A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648–5652.
- P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623–11627.
- R. Kaptein and L. J. Oosterhoff, *Chem. Phys. Lett.*, 1969, **4**, 214–216.
- K. M. M. Salikhov, N. Yu, R. Z. Sagdeev and A. L. Buchachenko, *Studies in Physical and Theoretical Chemistry, Vol. 22: Spin Polarization and Magnetic Effects in Radical Reactions*, Elsevier, Amsterdam, Neth., 1984.
- F. Gerson and W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy for Organic Chemists*, John Wiley & Sons, 2003.
- K. F. J. De and R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4759–4766.



Biradical vs singlet oxygen photogeneration in suprofen–cholesterol systems

Fabrizio Palumbo¹, Francisco Bosca¹, Isabel M. Morera¹, Inmaculada Andreu^{*2} and Miguel A. Miranda^{*1}

Full Research Paper

Open Access

Address:

¹Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC/ Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain and ²Unidad Mixta de Investigación IIS La Fe-UPV, Hospital Universitari i Politécnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain

Email:

Inmaculada Andreu^{*} - iandreu@qim.upv.es; Miguel A. Miranda^{*} - mmiranda@qim.upv.es

^{*} Corresponding author

Keywords:

aryl ketones; hydrogen abstraction; lipid peroxidation; photoproducts; triplet excited state

Beilstein J. Org. Chem. **2016**, *12*, 1196–1202.

doi:10.3762/bjoc.12.115

Received: 08 March 2016

Accepted: 24 May 2016

Published: 14 June 2016

Associate Editor: J. A. Murphy

© 2016 Palumbo et al.; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

Cholesterol (Ch) is an important lipidic building block and a target for oxidative degradation, which can be induced via free radicals or singlet oxygen (¹O₂). Suprofen (SP) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug that contains the 2-benzoylthiophene (BZT) chromophore and has a π,π^* lowest triplet excited state. In the present work, dyads (S)- and (R)-SP- α -Ch (**1** and **2**), as well as (S)-SP- β -Ch (**3**) have been prepared from β - or α -Ch and SP to investigate the possible competition between photogeneration of biradicals and ¹O₂, the key mechanistic steps in Ch photooxidation. Steady-state irradiation of **1** and **2** was performed in dichloromethane, under nitrogen, through Pyrex, using a 400 W medium pressure mercury lamp. The spectral analysis of the separated fractions revealed formation of two photoproducts **4** and **5**, respectively. By contrast, under the same conditions, **3** did not give rise to any isolable Ch-derived product. These results point to an intramolecular hydrogen abstraction in **1** and **2** from the C7 position of Ch and subsequent C–C coupling of the generated biradicals. Interestingly, **2** was significantly more photoreactive than **1** indicating a clear stereodifferentiation in the photochemical behavior. Transient absorption spectra obtained for **1–3** were very similar and matched that described for the SP triplet excited state (typical bands with maxima at ca. 350 nm and 600 nm). Direct kinetic analysis of the decay traces at 620 nm led to determination of triplet lifetimes that were ca. 4.1 μ s for **1** and **2** and 5.8 μ s for **3**. From these data, the intramolecular quenching rate constants in **1** and **2** were determined as $0.78 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. The capability of dyads **1–3** to photosensitize the production of singlet oxygen was assessed by time-resolved near infrared emission studies in dichloromethane using perinaphthenone as standard. The quantum yields (Φ_{Δ}) were 0.52 for **1** and **2** and 0.56 for **3**. In conclusion, SP- α -Ch dyads are unique in the sense that they can be used to photogenerate both biradicals and singlet oxygen, thus being able to initiate Ch oxidation from their triplet excited states following either of the two competing mechanistic pathways.

Introduction

Among the constituents of cell membranes, cholesterol (Ch) is the most important lipidic building block. It is required for permeability, fluidity, and integrity of all animal cell membranes. However, as an unsaturated lipid, Ch is susceptible to oxidative degradation, which can result in potentially pathologic consequences encompassing from inflammation to cardiovascular and Alzheimer diseases [1,2]. This type of damage can be induced via free radicals or singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) [3,4]. The former generally involves hydrogen abstraction (HA) of an allylic hydrogen and can be achieved by photosensitizing agents in combination with UVA light. The latter involves energy transfer from the photosensitizer triplet excited state to ground state molecular oxygen [5,6].

Ketoprofen (KP) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug that contains the benzophenone (BZP, Figure 1) chromophore and displays a n,π triplet excited state [7–9], whereas tiaprofenic acid (TPA) is a related drug that includes the 2-benzoylthiophene (BZT, Figure 1) chromophore and has a π,π^* lowest triplet excited state [9,10]. Generally, the photochemical reactivity of the n,π^* triplet state is higher than that of π,π^* triplet state. It is also accepted that ketones with lowest-lying π,π^* triplets react predominantly via thermal population of the higher energy n,π^* states.

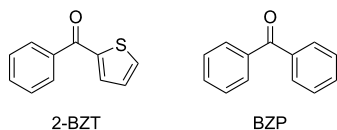


Figure 1: Chemical structure of the photosensitizing chromophores benzophenone (BZP) and 2-benzoylthiophene (BZT).

In this context, we have previously shown that the electronic nature of the involved triplet excited state displays a marked in-

fluence on the photobehavior of ketone-Ch dyads. Hence, KP- α -Ch dyads are suitable to generate biradicals by intramolecular HA from the C7-allyl position of Ch [11,12], whereas the TPA- α -Ch analogs are unreactive via HA but they generate singlet oxygen efficiently [13].

Suprofen (SP) is another nonsteroidal anti-inflammatory drug, which contains a BZT chromophore. The only structural difference between SP and TPA is the site of attachment of the propionic acid side chain (Figure 2), which is the benzoyl or the thenoyl group, respectively [14,15]. Interestingly, this apparently minor modification leads to a smaller energy gap between the T_1 ($\pi\pi^*$) and the T_2 ($n\pi^*$) states in SP than in TPA (ca. 3 vs 7 kcal/mol, respectively) [16]. Therefore, HA processes could be enhanced in the SP derivatives.

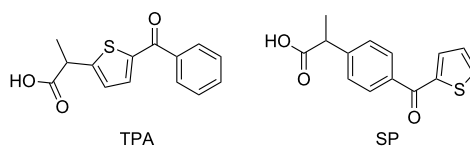


Figure 2: Chemical structure of tiaprofenic acid (TPA) and suprofen (SP).

With this background, dyads (*S*)- and (*R*)-SP- α -Ch (**1** and **2**), as well as (*S*)-SP- β -Ch (**3**) have been prepared in the present work from β - or α -Ch and SP (Figure 3) in order to investigate the possible competition between photogeneration of biradicals and $^1\text{O}_2$, the key mechanistic steps in Ch photooxidation.

Results and Discussion

Preparation of dyads

Compounds **1–3** were prepared by esterification of α - or β -Ch with racemic SP following standard procedures [13]. They were

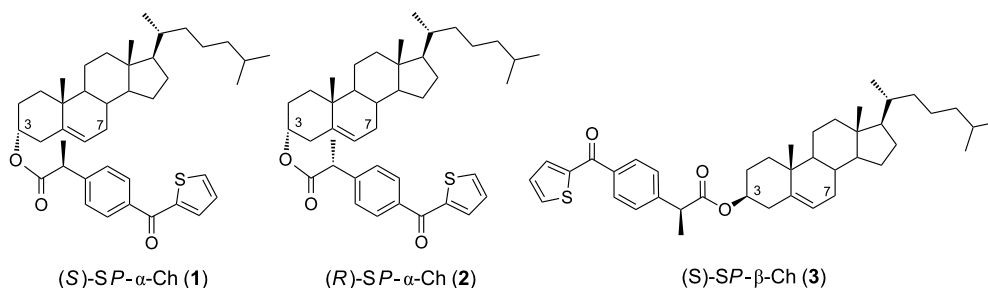


Figure 3: Chemical structures of dyads **1–3**.

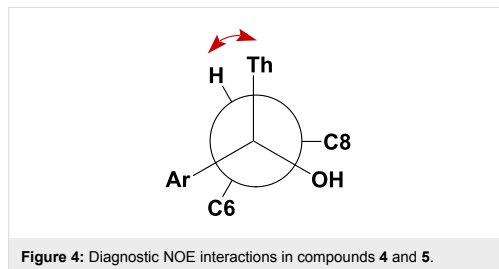
purified and resolved into the pure diastereoisomers by fractional crystallization from hexane/ethyl acetate. Ester **1** was obtained as a pure solid, while its diastereoisomer **2** remained as a viscous oil after elimination of the solvent from the filtered solution. In order to make an unambiguous stereochemical assignment, authentic samples of **1** and **2** were prepared by direct esterification of (*R*)- and (*S*)-SP with α -Ch [17].

Steady-state photolysis

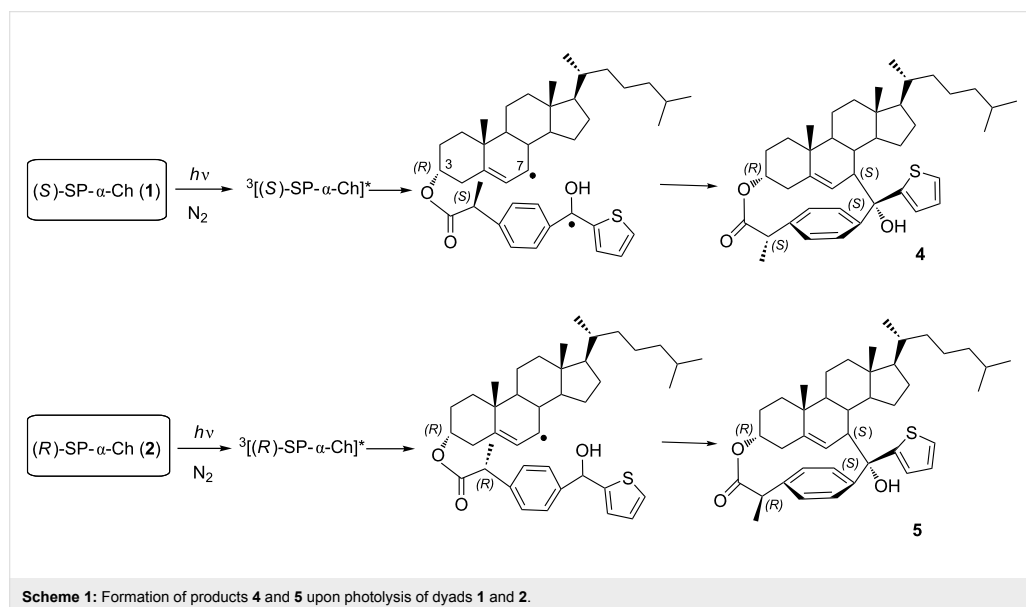
In order to investigate photoproducts formation, steady-state irradiation of dichloromethane solutions (ca. 10^{-3} M) of **1–3** was performed under nitrogen, using a Pyrex filter and a 400 W medium pressure mercury lamp. The reaction progress was followed by TLC and NMR. The resulting photomixtures were submitted to silica gel column chromatography, using hexane/ethyl acetate (95:5 v/v) as eluent. The spectral analysis of the separated fractions revealed the formation of two new diastereomeric photoproducts **4** and **5** from dyads **1** and **2**, respectively (Scheme 1). By contrast, (*S*)-SP- β -Ch (**3**) did not give rise to any isolable Ch-derived product; this is in agreement with conformational restrictions, which do not allow an effective approach between the two active moieties. The nature of the photoproducts formed from **1** and **2** point to an intramolecular HA from the C7 position of Ch and subsequent C–C coupling of the generated biradicals.

The structures of compounds **4** and **5** were unambiguously assigned on the basis of their NMR spectroscopic data (^1H , ^{13}C ,

HSQC and NOEDIFF) and mass spectrometry analysis, including high-resolution measurements. Because of the rigidity of the steroidal skeleton, NOE experiments were necessary to assign the stereochemistry of the new chiral centers generated upon photocyclization. In both photoproducts, the most relevant interaction was found between the allylic proton at C7 and the protons of the thiophene ring (Figure 4). More details are provided in the Supporting Information File 1.



Having established the nature of the occurring photochemical reactions, it appeared interesting to explore the possible stereodifferentiation in the HA process. Thus, irradiation of **1–3** was performed with monochromatic light at 266 nm in CH_2Cl_2 (ca. 10^{-5} M solutions), under nitrogen. The changes were monitored by UV-spectrophotometry, following the decrease in the maximum absorption at 290 nm (inset of Figure 5), which is consistent with reduction of the BZT chromophore.



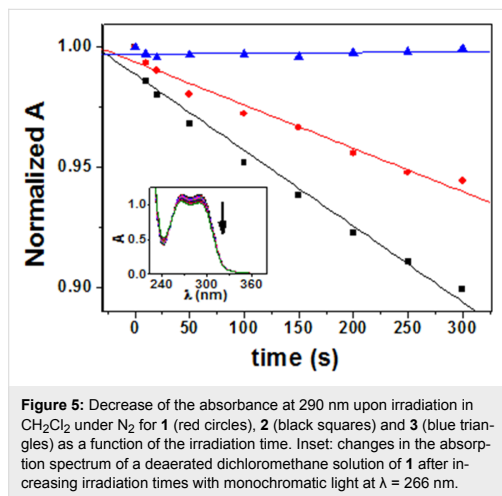


Figure 5: Decrease of the absorbance at 290 nm upon irradiation in CH_2Cl_2 under N_2 for **1** (red circles), **2** (black squares) and **3** (blue triangles) as a function of the irradiation time. Inset: changes in the absorption spectrum of a deaerated dichloromethane solution of **1** after increasing irradiation times with monochromatic light at $\lambda = 266$ nm.

Dyads **1** and **2** were efficiently photolyzed under anaerobic conditions, whereas **3** was markedly unreactive. Interestingly, **2** was significantly more photoreactive than **1** indicating a clear stereodifferentiation in the photochemical behavior.

Laser flash photolysis (LFP)

The studies were carried out in dichloromethane under anaerobic atmosphere at $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm. Transient absorption spectra

acquired for **1–3** (Figure 6) were all very similar to that previously reported for the triplet excited state of SP, with maxima at ca. 350 nm (major) and 600 nm (minor) [18].

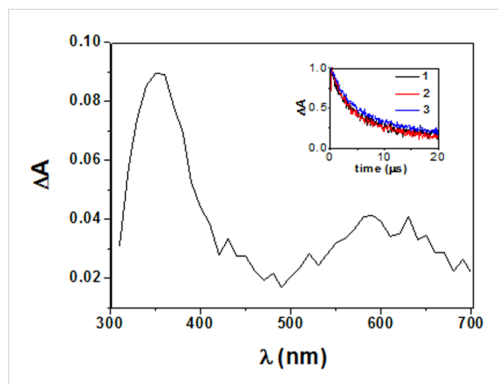
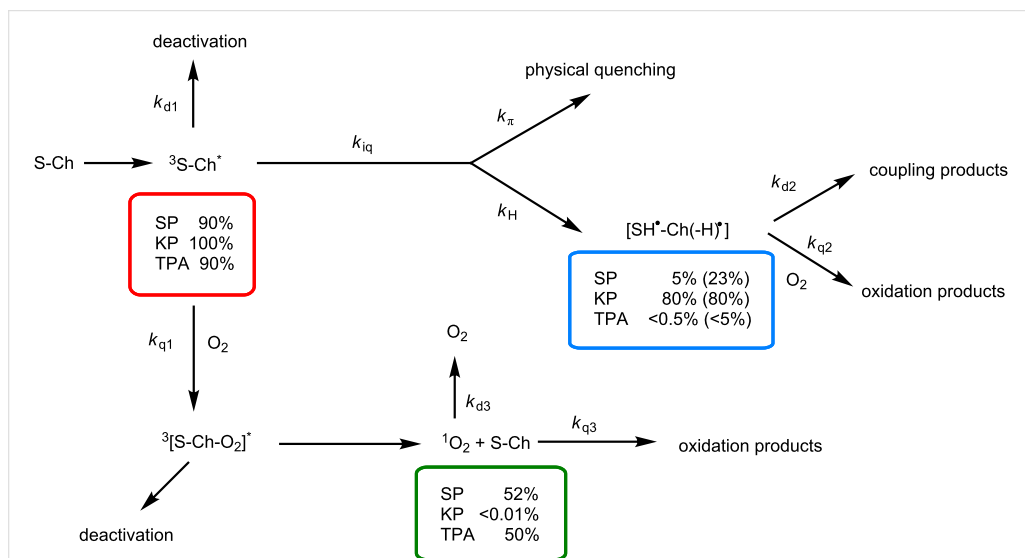


Figure 6: Transient absorption spectra for dyad **1** in CH_2Cl_2 1 μs after laser pulse ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm). Inset: Normalized decays of the triplets generated from dyads **1–3** monitored at 620 nm.

An overall mechanistic picture is shown in Scheme 2 and a summary of photophysical parameters is provided in Table 1, together with reference values from the literature [19–21]. The direct kinetic analysis of the decay traces at 620 nm (Figure 6 inset) led to determination of triplet lifetimes (τ_T) that were ca.



Scheme 2: Photoreaction pathways generating biradical and singlet oxygen species of a sensitizer (S), like SP, KP or TPA, covalently linked to Ch. The obtained percentages under anaerobic conditions are given in parenthesis.

4.1 μs for **1** and **2** and 5.8 μs for **3**. From these data, the intramolecular quenching rate constants were determined as $k_{\text{iq}} = 1/\tau_{\text{T}(1 \text{ or } 2)} - 1/\tau_{\text{T}(3)}$, and the value obtained for **1** and **2** was $0.78 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

Table 1: Photophysical parameters of dyads in CH_2Cl_2 .

Parameters	(S)- or (R)-SP- α -Ch (1 , 2)	KP- α -Ch ^a
Φ_{isc}	0.9 ^b	1.0 ^c
$k_{\text{d1}} [\text{s}^{-1}]$	$1.7 \times 10^{5\text{d}}$	5.9×10^5
$k_{\text{iq}} [\text{s}^{-1}]$	$7.8 \times 10^{4\text{e}}$	1.0×10^8
$k_{\text{H}} [\text{s}^{-1}]$	$6.2 \times 10^{4\text{f}}$	8.0×10^7
$K_{\pi} [\text{s}^{-1}]$	$1.6 \times 10^{4\text{f}}$	2.0×10^7
$k_{\text{q1}} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	0.4×10^9	0.6×10^9
Φ_{Δ}	0.52	<0.01
$k_{\text{d2}} [\text{s}^{-1}]$	ND ^g	5.0×10^6
$k_{\text{q2}} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	ND ^g	3.6×10^9
$k_{\text{d3}} [\text{s}^{-1}]$	$1.4 \times 10^{\text{h}}$	1.3×10^4
$k_{\text{q3}} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$5.7 \times 10^{4\text{i}}$	$5.7 \times 10^{4\text{i}}$
$\tau_{\text{T}} [\mu\text{s}]$	4.10	<0.01

^aValues taken from ref. [13]; ^bvalue taken from ref. [15]; ^cvalue taken from ref. [19]; ^d $k_{\text{d1}} = 1/\tau_{\text{T}(3)}$; ^ethe intramolecular quenching rate constants were estimated as $k_{\text{iq}} = 1/\tau_{\text{T}(1 \text{ or } 2)} - 1/\tau_{\text{T}(3)}$; ^fthe rate constants for HA (k_{H}) and physical quenching by the π system (k_{π}) were obtained by assuming that their ratio is similar to that determined in KP- α -Ch and that $k_{\text{iq}} = k_{\text{H}} + k_{\pi}$; ^gnot determined; ^h $k_{\text{d3}} = 1/\tau_{\Delta}$ with perinaphthenone as photosensitizer (value taken from ref. [20]); ⁱvalue taken from ref. [21].

Unfortunately, in the nanosecond timescale it was not possible to detect the biradical species. Indeed, the coupling rate constant (k_{d2}) should be similar to that of KP- α -Ch and therefore

much higher than the hydrogen abstraction rate constant (k_{H}), which is by definition lower than k_{iq} . Consequently, biradicals are not expected to accumulate since their consumption is much faster than their formation.

It is interesting to note that the reverse is true that for the KP- α -Ch analogs, where k_{d2} is lower than k_{H} (Table 1). Therefore, biradical accumulation is indeed observed in this case, because the coupling products are generated much more slowly.

Singlet oxygen generation

To assess the capability of dyads **1–3** to photosensitize the production of excited singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$ or $^1\Delta_{\text{g}}$), time-resolved near infrared emission studies were carried out in dichloromethane using perinaphthenone (PN) as standard. The formation of this reactive oxygen species was detected by its luminescence at 1270 nm, using a germanium diode as detector. The singlet oxygen lifetime (Figure 7A) was found to be ca. 70 μs in all cases (in agreement with the $^1\text{O}_2$ lifetime reported in the literature [20] for the same solvent). The photosensitized singlet oxygen production was established with a quantum yield (Φ_{Δ}) of 0.52 for **1** and **2** and 0.56 for **3** (Table 1 and Figure 7B).

Biradical vs singlet oxygen

Although it was not possible to detect the biradical species by means of LFP in SP- α -Ch systems, its generation (5%) has been chemically proven by obtaining the coupling products **4** and **5**. Moreover, the triplet excited states of **1** and **2** were quenched by O_2 to generate $^1\text{O}_2$ efficiently (52%). Interestingly, the TPA analogs (also with π,π^* character) are unreactive via intramolecular HA (<0.5%), while they produce $^1\text{O}_2$ with a $\Phi_{\Delta} = 0.5$. By

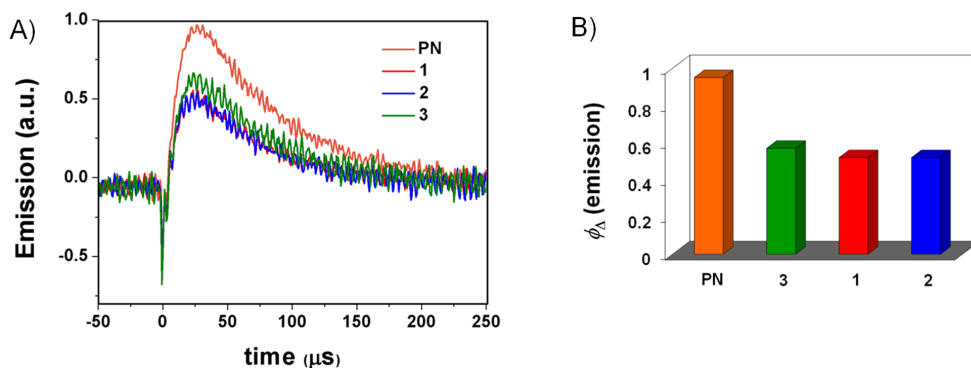


Figure 7: Time-resolved experiments at 1270 nm upon excitation at 308 nm of aerated CH_2Cl_2 solutions of **1–3**, using perinaphthenone as standard for comparison. A) Luminescence decays of $^1\text{O}_2$. B) Formation of $^1\text{O}_2$.

contrast, for KP derivatives ($^3n,\pi^*$), efficient photogeneration of 7-allyl-Ch biradicals (80%) is observed, and 1O_2 production is negligible (<0.01).

In conclusion, SP- α -Ch dyads are unique in the sense that they can be used to photogenerate both biradicals and singlet oxygen, thus being able to initiate Ch oxidation from their triplet excited states following either of the two competing mechanistic pathways.

Experimental

General

Suprofen and β -cholesterol were commercially available. Solvents and other reagents were used as received from the supplier without additional purification. 1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded in $CDCl_3$ as solvent on a Bruker AC-300 at 300 and 75 MHz, respectively, and the NMR chemical shifts are reported in ppm downfield from an internal solvent peak. Ultraviolet absorption spectra were recorded on a Varian Cary 300 scan UV-vis spectrophotometer. All reactions were monitored by analytical TLC with silica gel 60 F₂₅₄ revealed with ammonium molybdate reagent. The residues were purified through silica gel 60 (0.063–0.2 mm). Exact mass was obtained by Waters ACQUITY™ XevoQToF spectrometer.

Laser flash photolysis (LFP) measurements

As described in [17], a pulsed Nd:YAG laser was used for the excitation at 355 nm. The single pulses were of ~10 ns duration, and the energy was from 10 to 1 mJ/pulse. The LFP system consisted of the pulsed laser, the Xe lamp, a monochromator and a photomultiplier made up of a tube, housing and power supply. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. All experiments were performed at room temperature. The samples were dissolved in dichloromethane to have an absorbance of ca. 0.30 at 355 nm, and solutions were deaerated by bubbling nitrogen.

Steady-state photolysis of dyads 1 and 2

Solutions of **1**, **2** or **3** (ca. 10^{-4} M concentration) were irradiated, under anaerobic conditions, with monochromatic light at 266 nm using the Xe lamp of a Photon, Tecnology spectrofluorometer equipped with monochromator. The changes were monitored by UV-vis spectrophotometry following the decrease in the absorption at 290 nm.

To preparative scale, deaerated dichloromethane (20 mL) solutions of (*S*)- or (*R*)- α -Ch dyads **1** and **2** (150 mg, 0.24 mmol) were irradiated for 8 h through Pyrex with a 400 W medium pressure mercury lamp. After this time the reaction mixtures were concentrated under reduced pressure, and the photomixtures were submitted to silica gel column chromatography,

using hexane/ethyl acetate (eluent: 98:2), which afforded the pure photoproducts **4** and **5**.

Data for compounds 4 and 5

Photoproduct 4 (51%)

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 0.53 (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.90–1.98 (complex signal, 24H), 2.18 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 2.69 (s, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.62 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 6.44 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 5.1$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.11 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.74 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 10.2, 13.6, 18.8, 18.9, 20.5, 22.6, 22.9, 23.8, 25.5, 26.7, 28.1, 33.1, 35.8, 36.1, 36.2, 38.1, 39.2, 39.6, 40.2, 41.1, 42.9, 46.6, 46.7, 50.2, 56.1, 70.2, 83.9, 124.7, 124.9, 125.0, 125.9, 126.1, 126.7, 128.0, 135.7, 139.7, 146.8, 156.2, 173.4; HRMS-EI (m/z): $[M - H]^+$ calcd for $C_{41}H_{55}O_3S$, 627.3866; found, 627.3865

Photoproduct 5 (53%)

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 0.53 (s, 3H), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.90–1.97 (complex signal, 24H), 2.14 (m, 1H), 2.46 (m, 1H), 2.70 (s, 1H), 3.06 (m, 1H), 3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 5.4$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.68 (m, 1H), 6.48 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 5.1$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 10.2, 13.1, 18.8, 19.1, 20.5, 22.6, 22.9, 23.7, 25.9, 26.6, 28.1, 32.7, 35.3, 35.8, 36.2, 38.0, 39.2, 39.6, 40.1, 41.2, 42.9, 45.8, 46.4, 50.2, 56.1, 69.7, 84.0, 123.1, 124.7, 124.9, 125.7, 125.9, 126.7, 128.5, 130.8, 134.9, 140.1, 147.0, 156.0, 172.9; HRMS-EI (m/z): $[M - H]^+$ calcd for $C_{41}H_{55}O_3S$, 627.3866; found, 627.3846.

Singlet oxygen measurements

As described in [13], the luminescence (1270 nm) from singlet oxygen was detected by means of an Oriel 71614 germanium photodiode (5 mm²) coupled to the laser photolysis cell in right-angle geometry. An excimer laser (LEXTRA50 Lambda Physik) was used for the excitation at 308 nm (laser excitation at 5 low-pulse energies for each molecule). A 5 mm thick (5 cm in diameter) 1050 nm cut-off silicon filter and a 1270 nm interference filter were placed between the diode and the cell. The photodiode output current was amplified and fed into a TDS-640A Tektronix oscilloscope via a Co-linear 150 MHz, 20 dB amplifier. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer for study. Thus, the singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) of the dyads was determined in

dichloromethane solutions using the same absorbance value (0.30) at 308 nm for each compound. A singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ}) of 0.95 for perinaphthenone in dichloromethane was used as standard [22].

Supporting Information

Supporting Information File 1

Copies of ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC and NOEDIFF spectra for photoproducts 4 and 5.

[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-12-115-S1.pdf>]

Acknowledgements

Financial support from the Generalitat Valenciana (Prometeo Program), the Spanish Government (CTQ2014-54729-C2-2-P and FPU fellowship for F.P.) and the Carlos III Institute of Health (Grant RIRAAF, RETICS program and Miguel Servet Contract CP11/00154 for I. A.) is gratefully acknowledged.

References

- Schroepfer, G. J., Jr. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 361–554.
- Lercker, G.; Rodríguez-Estrada, T. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*; Guardiola, F.; Dutta, P. C.; Codony, R.; Savage, G. P., Eds.; AOCs Press: Champaign, 2002; pp 1–25.
- Luliano, L. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 457–468. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006
- Foote, C. S. *Free Radicals in Biology*; Academic Press: New York, 1976; Vol. 2, pp 85–134.
- Girotti, A. W. *Antioxid. Redox Signaling* **2004**, *6*, 301–310. doi:10.1089/152308604322899369
- Girotti, A. W.; Bachowski, G. J.; Jordan, J. E. *Lipids* **1987**, *22*, 401–408. doi:10.1007/BF02537268
- Encinas, M. V.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6393–6397. doi:10.1021/ja00411a021
- Marković, D. Z.; Durand, T.; Patterson, L. K. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 389–394. doi:10.1111/j.1751-1097.1990.tb01729.x
- Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **1998**, *43*, 1–26. doi:10.1016/S1011-1344(98)00062-1
- Boscá, F.; Miranda, M. A.; Morera, I. M.; Samadi, A. *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *58*, 1–5. doi:10.1016/S1011-1344(00)00102-0
- Andreu, I.; Boscá, F.; Sanchez, L.; Morera, I. M.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4597–4600. doi:10.1021/ol061854c
- Neshchadin, D.; Palumbo, F.; Sinicropi, M. S.; Andreu, I.; Gescheidt, G.; Miranda, M. A. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1608–1614. doi:10.1039/c3sc22109a
- Andreu, I.; Morera, I. M.; Boscá, F.; Sanchez, L.; Camps, P.; Miranda, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 860–867. doi:10.1039/b718068c
- Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J.; Grassa, C.; Martinez, L. A.; Miranda, M. A.; Tarrega, P. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 35–39. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb04998.x
- Encinas, S.; Miranda, M. A.; Marconi, G.; Monti, S. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 633–639. doi:10.1111/j.1751-1097.1998.tb02522.x
- Encinas, S.; Miranda, M. A.; Marconi, G.; Monti, S. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 420–425. doi:10.1111/j.1751-1097.1998.tb05221.x
- Andreu, I.; Morera, I.; Palumbo, F.; Sastre, G.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4035–4041. doi:10.1039/C5SC00823A
- Pérez-Prieto, J.; Boscá, F.; Galian, R. E.; Lahoz, A.; Domingo, L. R.; Miranda, M. A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5104–5113. doi:10.1021/jo034225e
- Aloïse, S.; Ruckebusch, C.; Blanchet, L.; Réhault, J.; Buntinx, G.; Huvenne, J.-P. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *17*, 224–231. doi:10.1021/jp075829f
- Rodgers, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6201–6205. doi:10.1021/ja00358a001
- Vever-Bizet, C.; Dellinger, M.; Brault, D.; Rougee, M.; Bensasson, R. V. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 321–325. doi:10.1111/j.1751-1097.1989.tb04165.x
- Nonell, S.; González, M.; Trull, F. R. *Afinidad* **1993**, *50*, 445–450.

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: doi:10.3762/bjoc.12.115