

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Institut Universitari Mixt de Tecnologia Química
(UPV-CSIC)

Departament de Química



PROTEÏNES COM A MICROREACTORS EN FOTOQUÍMICA SUPRAMOLECULAR

TESI DOCTORAL

Presentada per:

Mireia Marín i Melchor

Dirigida per:

Prof. Miguel Ángel Miranda Alonso
Dra. Virginie Lhiaubet-Vallet

València 2012

En Miguel Ángel Miranda Alonso, Catedràtic de Química de la Universitat Politècnica de València i Na Virginie Lhiaubet-Vallet, Investigadora Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas a l'Institut Universitari Mixt de Tecnologia Química (UPV-CSIC),

CERTIFIQUEN: que la present Tesi Doctoral titulada “Proteïnes com a Microreactors en Fotoquímica Supramolecular” ha estat desenvolupada per Mireia Marín i Melchor sota la seua direcció en l'Institut Universitari Mixt de Tecnologia Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València.

Miguel Ángel Miranda Alonso

Virginie Lhiaubet-Vallet

a Ximo

Agraïments

Aquesta tesi no és només tot el que llegireu ací. Hi ha molt més al darrere. Tant de feina (no cal dir-ho!), com a nivell personal. La tesi és una etapa intensa en la que succeeixen tantes coses que es fa difícil, quan és tan recent, ser conscient de tot. Malgrat això, hi ha una cosa clara i és que la gent amb què et trobes marca una petjada en tu que no s'esborrarà. És per això que m'agradaria dedicar unes línies a tots aquells que, durant tot aquest temps, han format part, d'una manera o d'una altra, d'aquesta experiència.

En primer lloc, no puc més que agrair a Miguel Ángel i a Virginie que em donaren l'oportunitat de formar part del seu grup. Gràcies per la vostra confiança, per fer-me partícip del vostre entusiasme i coneixements i per fer-me en tot moment de guia i de recolzament.

També, per suposat, als companys de laboratori que han anat passant al llarg de tots aquests anys i que han fet que els dies de feina (de vegades interminables) foren tan genials. A tots ells, però en especial a Ceci, Giacomo, Vicky, Patri, Paula M., Miguel, Jana, Gemma, Maya, Froso i Sara.

No em vull oblidar tampoc dels altres membres del nostre grup de fotoquímica (tant de l'ITQ com del departament), perquè sempre m'he sentit acollida i a gust i amb els que he compartit també dinars, sopars, xarrades, congressos, etc. Així que gràcies a Marisa, Chelo C., Inma, Chelo J., Paco, Susana, Dani, Neus, Raúl, Rafa, Carlos, Luís, Sonia, Paula B., Edurne, Faber, Hannes, Santi i a tota la resta.

Als eterns companys de, com a mínim, esmorzars. Perquè sempre m'han arrancat un riure quan ho necessitava i m'han servit de respir en èpoques "intenses". A vosaltres (Carmen, Pablo, Isabel, Cristina, Tomás, Miguel, Nastia, Raquel, Karen i Amparo), també moltes gràcies.

A altres companys de l'ITQ que, junt a alguns que ja he esmentat, per una cosa o per una altra, han acabat sent amics i amb qui he compartit sopars, eixides, xarrades, cerveses, riures, pors, inquietuds i tantes altres coses (que espere que continuen). Ací he d'anomenar a Victoria, Paula R., Olalla, Tania, Manolo, Ángel, Judit i Pablo E.

No vull deixar-me tampoc a la resta de gent que a l'ITQ, a Erlangen, al departament, a Burjassot, als cursos de doctorat, etc. m'han tirat una maneta (o moltes) sempre que ho he necessitat. Perquè tots han aportat el seu granet de sorra.

I, per fi, als meus pares i a la meua família, que sempre han intentat entendre les meues decisions i m'han recolzat en tot. Sense ells no haurien sigut possibles moltes coses, i aquest treball és una d'elles.

Però sobretot, a Ximo. Perquè aquesta tesi només està ací perquè he tingut el seu suport i els seus ànims. Perquè ell m'ha donat l'empenta que necessitava en els moments més baixos i ha compartit amb mi els moments més feliços. Perquè m'ha acompanyat al llarg d'este camí, que encara dura.

I a Arnau, perquè amb ell segueix tot a partir d'ara.

Abreviatures i Símbols

AB	Avobenzona o 4- <i>tert</i> -butil-4'-metoxidibenzoilmetà
ABR	Radical de l'avobenzona (Avobenzone Radical)
ACN	Acetonitril
AINES	Antiinflamatoris no esteroideus
BrAB	Bromoavobenzona o 4- <i>tert</i> -butil-4'-metoxidibenzoilbromometà
BSA	Albúmina sèrica bovina (Bovine Serum Albumin)
CD	Ciclodextrina
CP	Carprofén
CPD	Dímers de pirimidina del tipus ciclobutà (Cyclobutane Pyrimidine Dimers)
DA	Dansilamida
DG	Dansilglicina
ϵ	Coeficient d'extinció molar
E_T	Energia de l'estat excitat triplet
EtOH	Etanol
Φ	Rendiment quàntic
FRET	Transferència d'energia per ressonància de Förster (Förster Resonance Energy Transfer)
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS-ES ⁺	Espectrometria de massa d'alta resolució - Electrospray en mode positiu (High Resolution Mass Spectrometry - Electrospray positive mode)
HSA	Albúmina sèrica humana (Human Serum Albumin)
IBP	Ibuprofèn
λ	Longitud d'ona
MS	Espectrometria de masses (Mass Spectrometry)
MeAB	Metilavobenzona o 1,1-(4- <i>tert</i> -butilbenzoil)(4'-metoxidibenzoil)età
MeDPA	N-Metildifenilamina (N-Methyldiphenylamine)
1O_2	Oxigen Singlet
OA	Àcid oleic (Oleic Acid)
PBS	Solució de tampó fosfat (Phosphate Buffer Saline)
PrAB	Propilavobenzona o 1,1-(4- <i>tert</i> -butilbenzoil)(4'-metoxidibenzoil)butà
RSA	Albúmina sèrica de conill (Rabbit Serum Albumin)
(R)-IBP	(R)-Ibuprofèn
SA	Albúmina sèrica (Serum Albumin)

(S)-IBP	(S)-Ibuprofén
UV	Ultraviolat / Ultraviolada
UVA	Ultraviolat A
UVB	Ultraviolat B
UVC	Ultraviolat C

Capítol 1. Introducció	1
1.1. Introducció a la química supramolecular.....	3
1.1.1. Química amfitrió-hoste.....	4
1.1.2. Reconeixement molecular i selectivitat.....	4
1.1.3. Constants d'unió.....	5
1.1.4. Aplicacions de la química supramolecular.....	5
1.2. Amfitrions abiòtics i reactivitat química.....	7
1.2.1. Ciclodextrines.....	7
1.2.2. Micel·les.....	8
1.2.3. Zeolites.....	9
1.2.4. Altres estructures supramoleculares.....	10
1.3. Proteïnes: les biomolècules com a amfitrions.....	12
1.3.1. Albúmines sèriques.....	13
1.3.2. Enzims.....	17
1.3.3. Anticossos catalítics (abzims).....	18
1.4. Fotoreactivitat en química supramolecular.....	20
1.4.1. Fotoreactivitat en medis no biològics.....	21
1.4.2. Fotoreactivitat en medis biològics.....	23
1.5. Anàlisi general de la situació.....	28
1.6. Bibliografia.....	30
Capítol 2. Objectius	39
Capítol 3. Reordenament de foto-Fries en albúmina sèrica	43
3.1. Introducció i objectius.....	45
3.1.1. Característiques del reordenament de foto-Fries.....	45
3.1.2. Interés i rellevància de la reacció de foto-Fries.....	45
3.1.3. Antecedents de la reacció de foto-Fries en sistemes supramoleculares.....	46
3.1.4. Objectius.....	50
3.2. Disseny dels substrats de foto-Fries.....	51
3.3. Estudis preliminars de degradació dels substrats.....	51
3.3.1. Estudis preliminars del substrat 1a.....	51
3.3.2. Estudis preliminars dels substrats 1b i 1c.....	53

3.4. Interacció dels substrats amb distintes albúmines.....	54
3.4.1. Determinació de l'estequiometria dels complexos.....	54
3.4.2. Determinació de les constants i el lloc d'unió dels substrats.....	55
3.5. Reacció de foto-Fries en distintes albúmines sèriques.....	58
3.5.1. Determinació dels rendiments quàntics de la reacció.....	58
3.5.2. Determinació dels rendiments químics de la reacció per a 1b en PBS i HSA.....	60
3.6. Conclusions.....	61
3.7. Part experimental.....	61
3.7.1. Síntesi dels naftils ésters.....	61
3.7.2. Síntesi, separació i caracterització dels fotoproductes.....	62
3.7.3. Equipament: absorció, emissió i sistemes de fotoirradiació.....	63
3.7.4. Cinètiques de degradació i de fotòlisi d'1a.....	63
3.7.5. Rendiments quàntics de reacció i cinètiques de degradació d'1b i 1c.....	63
3.7.6. Tractament de mostra per calcular els rendiments de reacció d'1b.....	64
3.8. Bibliografia.....	65
Capítol 4. Derivats d'avobenzona en albúmina sèrica.....	67
4.1. Introducció i objectius.....	69
4.1.1. Els filtres solars i l'avobenzona.....	69
4.1.2. Estabilitat de l'avobenzona i fotodegradació. La forma dicetònica.....	70
4.1.3. Antecedents: avobenzona en sistemes supramoleculars.....	72
4.1.4. Objectius.....	72
4.2. Caracterització de BrAB en dissolució.....	73
4.2.1. Propietats d'emissió i absorció de BrAB.....	73
4.2.2. Fotòlisi de flaix làser de BrAB.....	74
4.3. Interacció de MeAB, PrAB i BrAB amb albúmina sèrica humana.....	76
4.4. Fotoquímica de PrAB unida a proteïna. Norrish II.....	78
4.5. Conclusions.....	79
4.6. Part experimental.....	80
4.6.1. Emissió, absorció, fotòlisi de flaix làser i sistemes d'irradiació.....	80
4.6.2. Desactivació de l'estat excitat triplet de la xantona per la BrAB.....	80
4.6.3. Cinètiques de fotodegradació de PrAB.....	81
4.7. Bibliografia.....	82

Capítol 5. Fotoelectrociclació [6π] a l'interior d'albúmines sèriques.....	85
5.1. Introducció i objectius.....	87
5.1.1. Fotoelectrociclacions [6π].....	87
5.1.2. Interés i rellevància de les fotoelectrociclacions [6π]. Aplicacions.....	88
5.1.3. Fotoelectrociclació [6π] de la <i>N</i> -metildifenilamina. Mecanisme.....	89
5.1.4. Fotoelectrociclacions en sistemes supramoleculars.....	90
5.1.5. Objectius.....	92
5.2. Rendiments quàntics de la reacció en diferents medis.....	93
5.2.1. Seguiment cinètic de la reacció per absorbància i per fluorescència.....	93
5.2.2. Seguiment cinètic de la reacció per HPLC.....	94
5.3. Estudis dels intermedis de reacció per fotòlisi de flaix làser.....	95
5.4. Interacció substrat-proteïna.....	97
5.4.1. Determinació de l'estequiometria del complex	97
5.4.2. Determinació del lloc d'unió del substrat a l'interior de la proteïna.....	99
5.5. Avaluació de l'eficiència de la reacció. El paper de l'O ₂	100
5.6. Conclusions.....	102
5.7. Part experimental.....	102
5.7.1. Productes químics.....	102
5.7.2. Equipament: Absorció, emissió, fotoirradiació i fotòlisi de flaix làser.....	102
5.7.3. Cinètiques monocromàtiques. Càlcul dels rendiments quàntics de la fotoelectrociclació.....	103
5.7.4. Cinètiques de la fotociclació monitoritzades per HPLC.....	104
5.7.5. Determinació de l'estequiometria del complex. Condicions experimentals.....	105
5.7.6. Determinació del lloc d'unió a la proteïna. Condicions experimentals.....	105
5.8. Bibliografia.....	106
 Capítol 6. Part experimental comuna.....	 109
6.1. Equipament.....	111
6.1.1. Absorció i emissió estacionària.....	111
6.1.2. Fotòlisi de flaix làser.....	111
6.1.3. Sistemes d'irradiació monocromàtica.....	111

6.1.4. Sistemes d'irradiació multilàmpara.....	112
6.1.5. Equip d'HPLC.....	112
6.2. Tractament de la mostra previ a la injecció en HPLC.....	112
6.2.1. Tractament de la mostra irradiada en absència de proteïna.....	112
6.2.2. Tractament de la mostra irradiada en presència de proteïna.....	112
Conclusions generals.....	115
Resums.....	121
Annex: Publicacions.....	135

1. Introducció

1.1. INTRODUCCIÓ A LA QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Quan un substrat s'uneix a un enzim (per exemple, un fàrmac que s'enganxa a la seua diana), tenen lloc interaccions altament selectives que permeten controlar els processos implicats^[1-3]. La química supramolecular tracta d'estudiar aquestes interaccions i d'entendre les seues conseqüències, així com de mimetitzar certs processos biològics o sintètics i també de crear-ne de nous.

L'objectiu d'aquest primer apartat de la present tesi doctoral és introduir breument el lector en el camp de la química supramolecular. Lluny de pretendre aprofundir en aquesta àrea tan complexa (atés que no és l'objectiu d'aquest treball), més bé es desitja descriure alguns conceptes bàsics que tenen importància en aquesta tesi per tal que no quede cap idea important per esmentar.

Així doncs, la química supramolecular ha estat definida tradicionalment com la branca de la química que es preocupa de l'estudi de les interaccions no covalents entre una molècula denominada *amfitrió* i una molècula denominada *hoste*^[4]. Aquest concepte es mostra esquemàticament en la Figura 1.1.

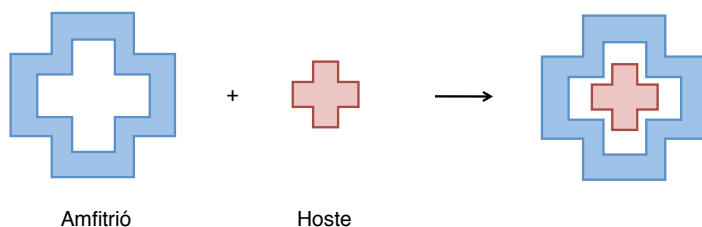


Figura 1.1. Esquema de la unió entre una molècula amfitrió i una molècula hoste.

Quan es parla d'un sistema supramolecular, es té en compte que aquest és el resultat d'interaccions entre les quals s'inclouen els ponts d'hidrogen, interaccions hidrofòbiques, coordinació metall-ligand, interaccions π - π , ió-íó, ió-dipol o anió/catió- π , etc^[4]. A la fi, les propietats resultants del sistema supramolecular són diferents de la suma de propietats individuals de cada component^[5, 6].

No obstant això, la química supramolecular moderna no només té en compte la idea *amfitrió-hoste* sinó que engloba també conceptes com els de dispositius i màquines moleculars^[7, 8], reconeixement molecular^[9], autoensamblatge^[10, 11], autoorganització i fins i tot la nanoquímica^[4].

Aquest treball, tal com es veurà en els apartats següents, centrarà la seua atenció en les relacions *amfitrió-hoste* que existeixen entre un substrat i una proteïna o enzim i les

conseqüències que té la formació d'aquest tipus de sistema supramolecular en la fotofísica i fotoquímica del substrat en qüestió. Quan es tracta d'un enzim, les interaccions poden ser complexes però, alhora, poden oferir certs avantatges que s'aniran comentant.

1.1.1. Química *amfitrió-hoste*

Si es considera la química supramolecular en el sentit més simple, es tenen en compte bàsicament les unions no-covalents entre molècules (també conegudes com complexacions). En aquest context, es considera una molècula (*amfitrió*) que s'uneix de manera no-covalent a una altra molècula (*hoste*) per a formar un complex *amfitrió-hoste* (Figura 1.1). Normalment, l'*amfitrió* és una molècula gran o un agregat, com per exemple un enzim, o un compost cíclic sintètic que posseeix una cavitat determinada. L'*hoste* sol ser una molècula més petita, de vegades un catió monoatòmic, un anió inorgànic o simplement una molècula neutra; fins i tot pot arribar a ser una molècula més sofisticada, com ara una hormona, una feromona o un neurotransmissor^[4, 6]. Per a la seua unió, l'*amfitrió* i l'*hoste* han de posseir llocs d'unió complementaris: bases de Lewis front a àcids de Lewis, donadors front a acceptors de ponts d'hidrogen, etc^[4, 6, 12].

D'entre totes aquestes idees, és important incidir en el concepte de *lloc d'unió*. Així doncs, es pot definir aquest com la regió de l'*amfitrió* o de l'*hoste* (generalment es refereix a la de l'*amfitrió*) que pren part en les interaccions no covalents que apareixen entre ambdues molècules per formar el complex.

1.1.2. Reconeixement molecular i selectivitat

En molts processos biològics, el reconeixement molecular és essencial. Així doncs, processos químics vitals com el transport molecular, el processament de la informació genètica o l'ensamblatge de proteïnes es basen essencialment en el reconeixement molecular. Així, cada unió no s'entén com una mera unió, sinó amb un propòsit.

D'aquesta manera, es defineix el reconeixement molecular com un procés que inclou tant la unió com la selecció de substrats per part d'una molècula receptora determinada per tal de realitzar una funció específica^[13]. Aquesta unió selectiva és una combinació de l'ajust estèric entre l'*hoste* i la cavitat de l'*amfitrió* i d'una distribució espacial apropiada dels llocs d'unió entre ambdues molècules. Tot això implica un patró estructural ben definit d'interaccions intermoleculars^[4, 13].

1.1.3. Constants d'unió

L'estabilitat termodinàmica d'un complex *amfitrió-hoste* en un dissolvent determinat a una temperatura determinada ve donada per la mesura de la constant d'unió, K_B (provinent del terme anglés *Binding Constant*)^[4] del substrat a l'amfitrió. A grans trets, per a un sistema de formació d'un complex 1:1 segons l'Esquema 1.1, es pot definir una constant d'unió genèrica amb l'Equació 1.1.



$$K_B = \frac{[A@C]}{[A] \cdot [C]} \quad \text{Equació 1.1}$$

Tant les constants d'unió com l'estequiometria dels complexos (habitualment calculada amb el mètode de Job^[14]) es poden calcular utilitzant tècniques de mesura diverses: diàlisi, dicromisme circular, ultracentrifugació, fluorescència, ultrafiltració, cromatografia líquida, difusió de RMN, calorimetria, electroforesi capil·lar, espectrofotometria d'absorció, etc. El procediment concret que s'utilitza es detallarà en la part experimental.

1.1.4. Aplicacions de la química supramolecular

Per tal de posar-nos en situació, s'anomenaran a continuació algunes aplicacions interessants que es poden ubicar dins del camp de la química supramolecular. No obstant això, al llarg d'aquesta introducció i d'aquest treball s'explicaran amb més detall nombrosos exemples que ens donaran una idea més àmplia d'aquest vast camp d'estudi.

Una de les aplicacions més habituals en química supramolecular és la del disseny de sondes per a certs cations o anions metàl·lics o orgànics menuts. Són nombrosos els exemples en aquest àmbit. En el cas de la identificació de cations, usualment es troben a la bibliografia exemples amb èters corona, podands, criptands esferands, calixarens, etc^[15]. En la Figura 1.2 es mostra un esquema genèric de com un éter corona atrapa un catió.

També es dissenyen sondes per a molècules orgàniques. Sovint aquestes sondes són macromolècules de l'estil dels cavitands: ciclodextrines, calixarens, carcerands, cucurbiturils, etc. Aquestes, modificades de múltiples formes, poden ser selectives per a certes molècules d'interés.

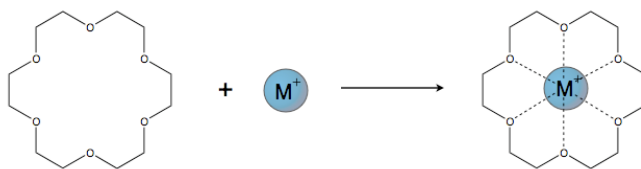


Figura 1.2. Esquema de la captació d'un catió genèric per part d'un éter corona

Dins del camp de les supramolècules es troben també les xarxes sòlides. A grans trets, s'entén per xarxes sòlides sòlids que formalment no contenen molècules discretes, sinó que el sòlid sencer és la molècula *per se*; o bé sòlids que estan fets d'uns pocs filaments de gran longitud i units per forces covalents o enllaços coordinats datius. Com a exemple representatiu dins d'aquesta categoria es trobarien les zeolites, que són de gran importància en la indústria de refí del petroli, entre d'altres^[16, 17].

Un altre concepte important en el camp de la química supramolecular és l'autoensamblatge o autoreplicació (*self-assembly*)^[4, 11]. S'entén per autoensamblatge l'associació espontània (no dirigida externament) de molècules menudes per tal de formar grans i complexes entitats supramoleculares tenint en compte la informació intrínseca continguda en dites molècules. Un exemple simple d'això seria el que es mostra en la Figura 1.3, en el qual dos molècules s'uneixen entre elles formant un adducte que, alhora, serveix de suport per a la unió de dos altres molècules per formar-ne un altre d'igual^[18]; així, té lloc un procés cíclic de replicació d'aquest. Altres exemples coneguts en relació a aquest àmbit a una escala més biològica, seria la replicació de l'ADN, la biosíntesi de la insulina, etc.

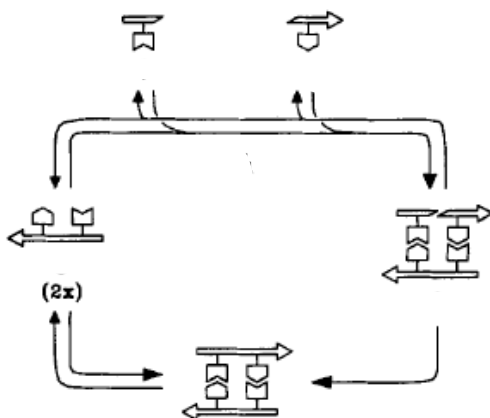


Figura 1.3. Exemple d'autoreplicació^[18]

Una altra aplicació seria el que es coneix com a dispositiu o màquina molecular. Es tracta d'un sistema complex fet de components moleculars amb propietats individuals definides. Aquesta definició tan àmplia abarca conceptes des d'endolls moleculars, nanocables, motors moleculars, nanoelectrodes, ascensors moleculars, nanodispositius que es posen en marxa induïts per llum, etc [7, 8, 19-23].

L'últim camp d'aplicació que s'ha volgut esmentar en aquest treball és el de la catàlisi supramolecular i la mimètica biològica. Donada l'amplitud d'aquest tema i el fet que té una importància destacada en aquesta tesi, es comentarà més àmpliament al llarg d'aquesta introducció (veure apartats 1.2, 1.3 i 1.4).

1.2. AMFITRIONS ABIÒTICS I REACTIVITAT QUÍMICA

Quan es parla de catàlisi supramolecular o de reactivitat en química supramolecular, en general hom assumeix implícitament la interacció *amfitrió-hoste* que s'ha descrit en l'apartat anterior. Es pot parlar però, d'amfitrions "naturals" (proteïnes o enzims) o bé d'amfitrions sintètics. De fet, hi ha certs paral·lelismes entre la reactivitat artificial o abiòtica supramolecular i la reactivitat bioquímica. I és que els catalitzadors sintètics poden, d'una banda, modelitzar els catalitzadors naturals però, a més, permeten el disseny de nous i diferents tipus de reaccions.

Els sistemes biològics han servit de model d'inspiració per al desenvolupament de la química supramolecular. D'aquesta manera, molts sistemes supramoleculars han estat dissenyats per mimetitzar l'estructura o la funció de processos biològics més complexos, de manera que serveixen com a model d'aquests i permeten entendre el seu funcionament^[12, 24-26].

A continuació es presentaran els principals amfitrions abiòtics que existeixen i s'esmentaran les seues característiques, funcions i usos més representatius.

1.2.1. Ciclodextrines

Un dels substrats més utilitzats en catàlisi supramolecular són les ciclodextrines (CD)^[27-29]. Les ciclodextrines són oligosacàrids cíclics formats usualment per 6, 7 o 8 unitats de D-(+)-glucopiranososa i en general es produeixen per hidròlisi enzimàtica^[30]. Són unes macromolècules molt atractives ja que, d'una banda, tenen una cavitat hidrofòbica on poden unir-se certs hostes i, de l'altra, posseeixen grups hidroxil que poden bé permetre

l'anclatge directe dels hostes, o bé afegir un grup funcional per modificar el tipus d'anclatge d'aquests. En essència, són unes dianes molt versàtils que donen lloc a moltes possibilitats (Figura 1.4).

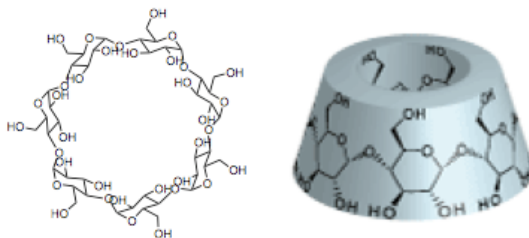


Figura 1.4. Esquema d'una ciclodextrina

A la bibliografia es troben nombrosos exemples de com diverses ciclodextrines i ciclodextrines modificades són capaces de catalitzar reaccions simples del tipus Diels-Alder^[31, 32], alquilacions^[33], halogenacions^[34], deshalogenacions^[35], fosforilacions^[36], etc. I també reaccions més complexes mimetitzant enzims tals com estearases^[37], glioxalases^[38], transaminases^[39] o epoxidases^[40].

1.2.2. Micel·les

Les micel·les són entitats supramoleculares formades per molècules bipolars i anomenades surfactants. Aquests estan formats per una part relativament llarga, orgànica i hidrofòbica (la *cua*) unida a una altra part polar o iònica (el *cap*) (veure Figura 1.5). Aquests surfactants solen formar un agregat globular amb una cavitat interior hidrofòbica (on poden tenir lloc reaccions químiques o fotoquímiques) i una exterior hidrofílica, o bé a la inversa (micel·les inverses), dependent de la naturalesa del dissolvent utilitzat^[41].

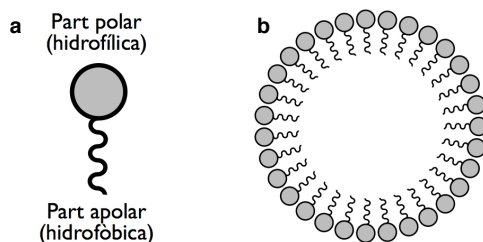


Figura 1.5. (a) Detall esquemàtic d'un surfactant. (b) Esquema d'una micel·la

Nombrosos tipus de reaccions s'han estudiat a l'interior de les micel·les o comicel·les (formades per més d'un tipus de surfactant), analitzant l'efecte, sovint catalític, que l'estructura supramolecular té sobre elles^[42-47]. Així doncs, s'han investigat reaccions com hidròlisis^[48, 49], solvòlisis^[50, 51], N-alkilacions^[52], reaccions S_N2 ^[53], etc., en les quals la reacció sol ser més favorable a l'interior de les micel·les que en dissolució.

1.2.3. Zeolites

Les zeolites són aluminosilicats cristal·lins microporosos capaços de complexar o adsorbir molècules orgàniques^[54, 55]. Com a tret característic, posseeixen estructures periòdiques regulars que poden entendre's com un material similar a una esponja amb cavitats i canals que s'estenen periòdicament i regularment al llarg de la seua estructura (se'n mostra un exemple en la Figura 1.6). La complexació amb molècules orgàniques té lloc per difusió dels hostes dins d'aquestes cavitats.

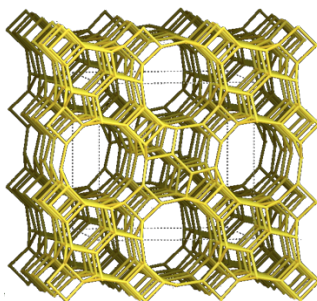


Figura 1.6. Esquema d'un dels diferents tipus d'estructures de zeolita
<http://www.iza-structure.org/databases/>

Aquesta estructura tan particular, i alhora versàtil, combinada amb altres factors (composició iònica de la xarxa, etc.), és una de les característiques més destacades que ha fet que les zeolites siguin catalitzadors àmpliament utilitzats en una nombrosa quantitat de processos químics^[16]. D'entre aquests, caldria destacar les aplicacions en refinament de petroli (cracking, hidrocracking, reforming de nafta, millora de les fraccions de diesel, conversió de metanol a olefines i a gasolina, etc.), processos catalítics implicats en la protecció del medi ambient (tècniques de neteja de gasos i de líquids tòxics i/o contaminants, tècniques de millora de neteja de residus, processos catalítics que impliquen una producció sostenible i eco-compatible, etc.), processos catalítics per a la síntesi de compostos de química fina, i un llarg etcètera.

1.2.4. Altres estructures supramoleculares

Existeixen altres estructures supramoleculares que s'han fet servir a la bibliografia en la química *amfitrió-hoste*. Per tal d'evitar una extensió excessiva en cadascuna d'elles, s'anomenaran i explicaran breument les característiques i utilitats que se'ls han donat:

Calixarens

Els calixarens són estructures supramoleculares cícliques formades per monòmers amb una estructura general tal com es mostra en la Figura 1.7^[15]. Poden tenir una varietat extensa de mides però els macrocicles formats per quatre, sis o huit anells fenòlics són els més fàcils de sintetitzar i els més àmpliament estudiats. Segons els substituents dels anells aromàtics, l'estructura supramolecular pot tenir distintes conformacions i això li dona versatilitat en les seues utilitats.

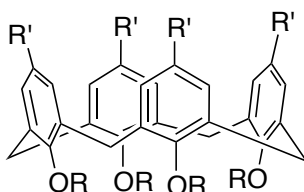


Figura 1.7. Estructura general d'un calixarè

Els macrocicles de la família dels calixarens s'han utilitzat sovint per formar complexos amb ions metàl·lics i receptors neutres (existeixen treballs on es mostren interessants aplicacions biomimètiques relacionades amb aquest aspecte^[56, 57]), per a encapsular nanopàrticules^[58], catalitzar reaccions químiques^[59], etc.

Éters Corona

Els éters corona són un dels lligands macrocíclics més simples i solen utilitzar-se en química supramolecular com a amfritrions de ions metàl·lics i orgànics^[4]. Consisteixen simplement en una correlació cíclica d'àtoms d'oxigen separats per espaiadors orgànics (típicament grups $-CH_2-CH_2-$). D'aquesta manera, mentre la capacitat d'unió al metall dels éters unidentats (com el dietilèter) és molt feble, la dels éters corona és molt més efectiva a causa de l'efecte quelat i la preorganització parcial assolida per l'estructura del macrocicle. En la figura 1.2 es pot veure esquemàticament com un èter corona atrapa un catió.

Polímers: Dendrímers

La química de polímers és complexa ja que existeixen molts tipus de polímers (monòmers units per funcionalitats químiques, polímers que impliquen la unió no covalent de monòmers, agregats de polímers amb un alt grau de polimerització com poden ser fibrines, filaments, amiloides, gels supramoleculares o fins i tot cristalls líquids). La química supramolecular en aquest camp està molt relacionada amb les estructures secundàries i terciàries dels polímers covalents. Tenen particular interès els dendrímers, que són polímers ramificats que formen ensamblatges globulars de propietats úniques^[4] (en la Figura 1.8 es mostra un exemple d'un dendrímer de ferrocé).

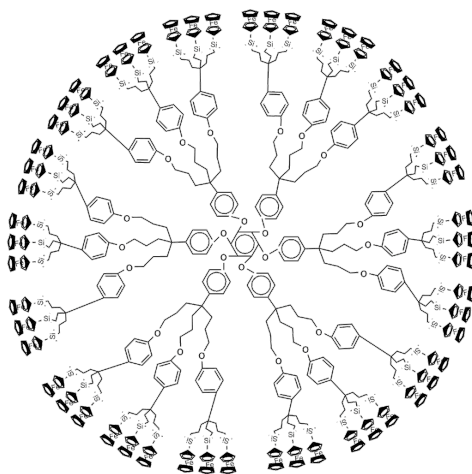


Figura 1.8. Exemple d'un dendrímer de ferrocé.

Una de les particularitats que té una estructura dendrítica és que el lloc d'unió està aïllat i *protegit* per una “carcassa” del medi exterior, cosa que pot modificar les propietats electroquímiques, cinètiques, químic-físiques, etc. d'aquest. A més, l'encapsulament d'hostes a l'interior d'un dendrímer fins i tot pot resultar irreversible si la capa exterior d'aquest està funcionalitzada amb grups voluminosos.

Els complexos *amfitrió-hoste* amb dendrímers han estat molt estudiats en l'àmbit del transport de fàrmacs^[60] ja que sovint permeten solubilitzar fàrmacs insolubles o sensibles a hidròlisi. Alguns dendrímers, però, presenten toxicitat significativa; des d'aquest punt de vista són interessants els *dendrophanes* que són dendrímers solubles en aigua i poden actuar com a amftrions d'un gran número de molècules biològicament actives, com per exemple els esteroides^[61-64].

1.3. PROTEÏNES: LES BIOMOLÈCULES COM A AMFITRIONS

Les proteïnes són macromolècules molt abundants i essencials en els organismes vius. Com s'ha descrit en part en els apartats anteriors, desenvolupen diverses funcions vitals, de manera que poden actuar com a enzims, hormones, anticossos o com a vehicle de transport de diverses substàncies endògenes i també exògenes^[65].

Des del punt de vista estructural, les proteïnes poden ser considerades com polímers lineals formats per aminoàcids. No obstant això, aquestes cadenes polipeptídiques es pleguen a diversos nivells formant estructures geomètriques de manera que adopten unes conformacions tridimensionals concretes^[66]. Aquests plegaments condueixen a la formació del lloc d'unió o centre actiu, que consisteix en una cavitat on té lloc la interacció específica entre substrats de distinta naturalesa i la proteïna. És doncs, un punt clau des d'on la proteïna desenvolupa les seues funcions pròpies^[67].

Quan un substrat s'uneix a una proteïna en el seu lloc d'unió per tal de desenvolupar una funció determinada ho fa per contacte tridimensional a través d'interaccions de naturalesa iònica, per enllaç d'hidrogen o de tipus van der Waals i tota mena de forces intermoleculares.

Les proteïnes poden interaccionar amb diversos tipus de substrats, com ara ions metàl·lics (calci, magnesi, etc.), vitamines, àcids grassos, fàrmacs, etc. Les que són susceptibles d'interaccionar amb fàrmacs (o, més àmpliament, molècules orgàniques petites) formen part de les denominades *dianes farmacològiques*. Així doncs, les proteïnes es poden classificar en tres grans grups^[68]:

(a) Proteïnes transportadores

Són aquelles que proporcionen un mitjà de transport (a través del plasma o de la membrana cel·lular) a aquells substrats que interaccionen en el seu lloc d'unió. Entre els nombrosos exemples de proteïnes transportadores es poden destacar l'hemoglobina (que es troba a l'interior dels glòbuls rojos i transporta l'oxigen des dels pulmons a la resta del cos), les albúmines sèriques^[69] (proteïnes plasmàtiques que actuen com a vehicle de diversos agents tant endògens -àcids grassos, hormones, enzims- com exògens -fàrmacs-) i també l' α -glicoproteïna àcida (una glicoproteïna plasmàtica encarregada de transportar fàrmacs de naturalesa bàsica).

(b) Receptors farmacològics

Són molècules generalment de naturalesa proteica que se situen en la membrana cel·lular o intracel·lularment. El fàrmac desenvolupa la seua acció en interaccionar en el centre actiu d'aquestes. Les interaccions que tenen lloc entre el fàrmac i el receptor són generalment làbils i reversibles. Mitjançant la combinació química del fàrmac amb el receptor, aquest darrer pateix un canvi configuracional que origina una resposta funcional en la cèl·lula^[70]. Aquesta resposta és, en definitiva, resultat de l'efecte farmacològic i pot ser, per exemple, la contracció o relaxació d'un múscul, l'augment o la inhibició de la secreció d'una glàndula, l'obertura o bloqueig d'un canal iònic, les variacions del metabolisme cel·lular, l'activació d'enzims i proteïnes intracel·lulars o inhibició d'aquestes, etc. Alguns fàrmacs actuen modificant reaccions cel·lulars desenvolupades per certs enzims ja que interaccionen amb aquests. D'entre aquests enzims es pot destacar la fosfolipasa A2 (inhibida per glucocorticoides) i la ciclooxigenasa (inhibida per AINES[†]).

(c) Enzims

Com ja s'ha comentat anteriorment, els enzims són biocatalitzadors de naturalesa proteica^[71, 72]. Totes les reaccions químiques del metabolisme cel·lular es realitzen gràcies a l'acció d'aquests catalitzadors, la funció principal dels quals és incrementar la velocitat dels processos químics, actuant sobre un substrat de forma específica i enormement eficient. Els enzims són fonamentals ja que les funcions vitals de qualsevol cèl·lula serien impossibles de mantenir si les reaccions que ocorren a l'interior fóren massa lentes. Exemples d'enzims són els citocroms P450 (generalment solen ser proteïnes associades a les membranes i estan involucrats en el metabolisme de certs agents exògens, la biosíntesi del colesterol i d'esteroides en general) o les lipases (enzims involucrats en la hidròlisi dels triglicèrids en àcids grassos i glicerol).

1.3.1. Albúmines sèriques

Les albúmines sèriques són un tipus de proteïnes que existeixen a la natura provinents de fonts de distintes espècies. Es poden extraure de rates, conills, cavalls, gossos, humans, etc. No obstant això, les albúmines que han suscitat major interès són l'albúmina sèrica humana (*Human Serum Albumin, HSA*) i l'albúmina sèrica bovina (*Bovine*

[†] AINES: Sigles per a anomenar els fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus.

Serum Albumin, BSA). La primera, per la seua importància òbvia en estudis clínics, metabòlics i genètics; i la segona, pel seu paper com a proteïna model en moltes aplicacions *in vitro*^[69]. No obstant això, les albúmines d'altres animals s'han utilitzat també per a estudis d'interacció amb fàrmacs i de farmacocinètica en lloc de HSA, a causa de la similitud trobada en les seqüències d'aminoàcids d'altres espècies respecte a la humana. No obstant això, diferents estudis han posat de manifest diferències quant a la unió de diversos fàrmacs i metabòlits a albúmines de diferents espècies. Com a exemple es pot citar el cas de la bilirrubina, que presenta diferents graus d'unió segons interaccione amb una albúmina o una altra^[73-75].

Funció de l'albúmina

L'albúmina és una proteïna que se sintetitza en el fetge i es localitza pràcticament en tot el cos. Existeixen grans quantitats d'albúmina a la pell i pot trobar-se en qualsevol fluid corporal (el fluid vitri i aquós ocular, la suor, les llàgrimes, la saliva, els músculs, etc.)

L'albúmina sèrica (*Serum Albumin, SA*) ajuda a mantenir el pH i la pressió osmòtica a la sang^[76]. La seua principal funció és actuar com a vehicle de transport i de distribució de substàncies endògenes i exògenes per tot el cos. L'exemple d'això és el transport de fàrmacs (de manera que influeix en la farmacocinètica i distribució d'aquests), d'àcids grassos aniónics de cadena llarga, d'àcids biliars, hormones, vitamines, etc^[77].

La interacció de substrats amb la SA pot originar un increment en la solubilitat d'aquests en la sang (com és el cas, per exemple, dels àcids grassos) i també una disminució de la seua toxicitat o una protecció front a l'oxidació (per exemple en el cas del dany peroxidatiu a l'àcid linoleic)^[78].

De vegades l'albúmina actua com a magatzem de certes toxines, per exemple quan transporta la bilirrubina fins al fetge per a la seua excreció biliar. També és capaç d'interaccionar amb toxines exògenes fent que siguen menys nocives per a l'organisme, per exemple la interacció de la SA amb l'aflatoxina G₁ (cancerígena), que és transportada fins al fetge per a la seua destrucció^[79].

L'albúmina també pot presentar activitat enzimàtica quan interacciona amb molècules menudes. Posseeix activitat enolasa i també és capaç d'actuar com tioesterasa (ja que posseeix un grup sulfhidril lliure al voltant del residu aminoàcid cisteïna-34), cosa que li permet dur a terme un important procés clínic com és la degradació de disulfiram^[80, 81]. A més, també presenta activitat esterasa en un dels seus múltiples llocs d'unió, probablement a causa de la proximitat de l'arginina-410 i la tirosina-411; així és, per tant,

capaç de produir la hidròlisi d'alguns glucurònids, com el del carprofén, el del ketoprofén o el del flurbiprofén^[82-84]. L'activitat esterasa de la SA és útil des del punt de vista clinicofarmacèutic, ja que és important en el procès d'activació de profàrmacs, com és el cas del medoxomil olmesartan, que es transforma al fàrmac actiu olmesartan^[85].

Estructura general de l'albumina

L'albumina consta d'una cadena polipeptídica simple sense grups prostètics o altres additius amb una massa molecular aproximada de 67KDa. Conté 9 hèlixs dobles formats per 17 ponts disulfur que envolten els residus de cisteïna adjacents. Aquests es poden agrupar en tres dominis homòlegs (anomenats I, II i III), amb els quals poden interaccionar substrats de distinta naturalesa. Cadascun d'aquests dominis conté dos hèlixs i està separat dels contigus per un altra hèlix. Així doncs, en cada domini hi ha dos subdominis A i B. Per tant, en les albumines existeix un ampli i variat nombre de llocs d'unió on els substrats poden interaccionar^[69].

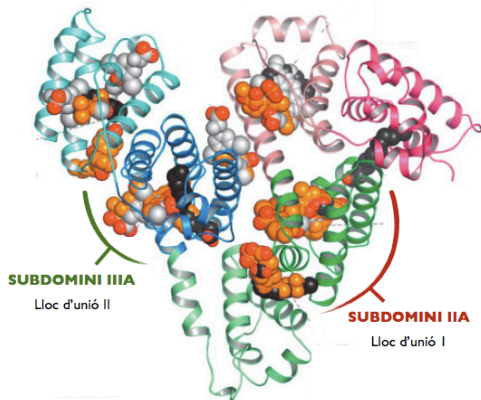


Figura 1.9. Estructura de l'albumina sèrica humana (HSA). S'hi detallen el subdomini IIA i IIIA de la proteïna, on resideixen els llocs d'unió I i II respectivament de molècules menudes (per exemple, fàrmacs).

En general, les albumines sèriques són molt similars des del punt de vista estructural (la Figura 1.9 mostra l'estructura de l'HSA). Les diferències que poden haver entre elles es deriven de la substitució de certs aminoàcids hidrofòbics per un altre tipus d'aminoàcid també hidrofòbic. No obstant això, aquestes petites diferències, de vegades poden traduir-se en diferències més grans pel que fa a la interacció amb certs substrats.

Interacció amb substrats

Les albumines són proteïnes flexibles que poden adaptar la seua estructura per a interaccionar amb una gran varietat de substrats en els seus distints dominis d'unió (esteroides, zinc (II), coure (II), calci, magnesi, vitamines, etc). Aquesta interacció pot

generar canvis en l'albumina que provoquen un augment en la seua estabilitat, una major afinitat cap a altres substrats, etc.^[78]

L'estudi de la interacció de l'albumina amb molècules orgàniques petites és important, per exemple, per a l'estudi dels fàrmacs no esteroideus. En general, aquest tipus de molècules presenten un alt grau d'unió amb l'albumina, amb unes constants d'associació que generalment oscil·len entre 10^4 i 10^6 M. Les interaccions poden ser de tipus electrostàtic, ponts d'hidrogen, pont salí o Van der Waals.

Tot i que les albumines sèriques posseeixen diversos dominis d'unió amb substrat, se segueix acceptant l'existència de dos llocs específics d'unió (centres actius) per a molècules orgàniques petites. En el cas concret de l'albumina sèrica humana, aquests llocs van ser designats per Sudlow com **lloc I** (on s'uneix la warfarina) i **lloc II** (on s'uneix el diazepam)^[86]. En la Taula 1.1 es mostren algunes característiques dels dos principals llocs d'unió de la HSA.

	Lloc I	Lloc II
Substrats específics	Warfarina, dansilamida	Dansilglicina, dansilsarcosina, diazepam
Altres substrats afins	Ésters dels àcids 2-arilpropionics	Àcids 2-arilpropionics
Residus d'a.a. presents	Trp 214, Arg 218	His 146, Lys 194, Arg 410, Tyr 411

Taula 1.1. Característiques dels dos principals llocs d'unió de l'albumina sèrica humana.

El lloc I es troba situat en el subdomini IIA de la proteïna^[87]. Les interaccions que predominen en aquest són de tipus hidrofòbic^[88]. Alguns exemples de substrats que s'hi uneixen són warfarina, indometacina, fenilbutazona, etc. També és conegut que els ésters dels àcids 2-arilpropionics interaccionen preferentment en aquest lloc d'unió^[89]. Algunes evidències suggereixen que el lloc I és flexible i de mida gran (molècules grans, com la bilirubina, hi interaccionen). Els aminoàcids que tenen major rellevància per a la interacció amb molècules orgàniques petites són el Trp 214 i l'Arg 218.

El lloc II es troba situat en el subdomini IIIA i és de mida menor i de menor flexibilitat que el lloc I^[87]. Les interaccions que hi predominen són de tipus pont d'hidrogen i electrostàtiques^[88]. Els substrats que solen unir-se al lloc II són àcids carboxílics aromàtics, per exemple, els antiinflamatoris no esteroideus (AINEs) de la família dels àcids 2-arilpropionics, com pot ser l'ibuprofén. Els aminoàcids que en aquest cas desenvolupen un paper important en la interacció amb els lligands són l'Arg 410 i la Tyr 411.

1.3.2. Enzims

Característiques generals

L'enorme varietat de reaccions bioquímiques que comprenen la vida estan, quasi totes, mediatas per unes proteïnes catalítiques anomenades *enzims*. És en els *llocs d'unió* o *llocs actius* d'aquestes proteïnes on els substrats s'uneixen i on té lloc la catàlisi^{1, 2}. La unió inicial, com s'ha comentat anteriorment, és un procés d'equilibri termodinàmicament controlat i, a més, és altament selectiu.

Els enzims, en general, són altament selectius en les reaccions que catalitzen, fins al punt que són capaços de distingir els canvis més subtils en l'estructura del substrat (poden diferenciar regioisomers, enantiòmers, etc). A més, porten a terme la seua reacció amb una precisió extrema: poden seleccionar un únic lloc d'unió en tot el substrat i dur a terme la reacció de manera estereoespecífica.

La catàlisi de certes reaccions per part dels enzims fa que s'incremente en gran mesura la seua velocitat. Sovint, la velocitat d'una reacció quan intervé un enzim s'aproxima al límit difusional. Això és possible per una sèrie de paràmetres que la presència de l'enzim afavoreix: pot fer la reacció més favorable disminuint l'energia de l'estat de transició, pot augmentar la proximitat dels substrats que reaccionen afavorint així que els processos tinguen lloc, etc.

A més, els rendiments de reacció quan intervenen enzims són increïblement alts (d'entre 10^6 i 10^{12} vegades més grans que els de les corresponents reaccions sense la intervenció d'aquestos) i tot això té lloc sota unes condicions molt suaus de temperatura, pressió i pH.

Per últim, cal esmentar també que els enzims tenen una alta capacitat de control. És a dir que les activitats catalítiques de molts enzims varien segons canvis subtils de concentració de certes substàncies (a banda dels substrats i productes que intervenen en la reacció enzimàtica concreta) que activen l'acció de l'enzim.

Segons la *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, els enzims poden catalitzar cinc tipus de reaccions i es classifiquen segons això. Així doncs, les *oxidoreductases* catalitzen reaccions d'oxidació-reducció, les *transferases* catalitzen reaccions de transferència d'un grup funcional, les *hidrolases* catalitzen la hidròlisi de diversos enllaços, les *liases* catalitzen la ruptura d'enllaços químics per un mecanisme diferent al de la hidròlisi o l'oxidació/reducció, les *isomerases* catalitzen la transformació

d'un isòmer d'una molècula en un altre i les *ligases* catalitzen la unió de dues molècules de mida gran mitjançant enllaços covalents.

Aplicacions industrials

Una de les aplicacions més destacades dels enzims en la indústria és la intervenció en síntesis de certs productes que tenen una activitat biològica potent. Es tracta de productes com, per exemple, la quinina, la morfina, la penicilina, la ciclosporina A (un potent immunosupresor), el taxol (un potent anticancerígen). Moltes vegades la síntesi o l'aïllament d'aquests productes del seu medi natural és difícil i cara. Amb l'ajuda de certs enzims, en canvi, hom pot ser capaç de sintetitzar-los (a aquests directament o a algun precursor) de manera més senzilla^[90].

Una altra aplicació important que cal tenir en compte és l'ús dels enzims en catàlisi orgànica asimètrica. Atès que aquests són catalitzadors altament selectius i poden ser enantioespecífics, se'ls pot fer servir a escala pràctica per tal de resoldre mesclures racèmiques i obtenir-ne el component actiu. Aquest aspecte esdevé cada vegada més important en síntesi de fàrmacs, ja que tenir l'enantiòmer correcte és sovint essencial en el camp de la farmacologia.

Per últim, cal destacar també la importància de la catàlisi enzimàtica en el camp de la recerca de fàrmacs. Moltes malalties estan desencadenades per certes reaccions enzimàtiques que es produeixen en alguns bacteris tòxics o altres organismes patògens. Però degut a l'alta selectivitat dels enzims comentada anteriorment, aquestes reaccions enzimàtiques sovint són diferents en els organismes patògens que en els humans. Això fa que es puguin trobar inhibidors selectius per a aquests organismes que no afecten els humans. És per això que l'inhibició enzimàtica és una de les bases per al descobriment de nous fàrmacs.

1.3.3. Anticossos catalítics (abzims)

Anticossos catalítics i enzims

És important començar per definir la diferència entre enzims i anticossos catalítics ja que pot semblar que ambdues denominacions descriuen una mateixa cosa. És cert que ambdues supramolècules són capaces d'unir-se al seu corresponent substrat (que pot anar des d'una molècula menuda fins a una macromolècula) amb una gran afinitat i especificitat. No obstant això, la diferència fonamental entre elles és que els enzims, durant la reacció,

evolucionen per tal d'estabilitzar l'estat de transició d'alta energia del substrat (en definitiva, el que limita la velocitat de la reacció) i tenen, doncs, com a objectiu principal catalitzar la reacció amb una eficiència màxima. En canvi, els anticossos evolucionen per a maximitzar l'afinitat de les molècules en el seu estat fonamental^[91, 92]. D'aquesta comparació es deriva que si es crea un anticòs perquè aquest s'unisca a l'estat de transició limitant d'una reacció determinada, es pot dir que actua com un enzim; podem parlar, per tant, d'un *anticòs catalític*^[93]. Així doncs, hi ha gran quantitat d'exemples en els quals els anticossos catalitzen un llarg nombre de reaccions^[94]; són d'especial interès els anticossos catalítics que catalitzen reaccions per a les quals no es coneix cap enzim^[95].

Per tal de dissenyar anticossos catalítics, un mètode habitual és el de sintetitzar químicament anàlegs a l'estat de transició de la reacció objectiu i utilitzar aquests anàlegs com a haptens per tal de sintetitzar el nou anticòs catalític a través de processos immunològics^[96-100].

Anticossos catalítics en síntesi de productes naturals

La síntesi de productes naturals ha estat, des de sempre, la peça central de la síntesi orgànica donat atés que sempre ha estat la prova final per a nous conceptes i nous mètodes sintètics. Simbolitza, per tant, el poder de la síntesi química en un moment determinat i defineix el seu abast i les seues limitacions^[101]. Així doncs, a pesar dels continus èxits de la química orgànica i de les noves metodologies sintètiques, existeix una cerca contínua de mètodes per millorar la síntesi orgànica i proporcionar així rutes pràctiques i fàcils per sintetitzar fàrmacs, productes naturals i altres productes químics de gran rellevància.

Els enzims i altres biocatalitzadors han estat objecte d'atenció com a eines útils per a aquest tipus de síntesis ja que ofereixen solucions eficients a molts problemes (també a la indústria) que són difícils de resoldre amb mètodes sintètics "convencionals"^[102, 103]. No obstant això, per a moltes transformacions químiques no es coneix un enzim "natural" que les catalitzi i, per a moltes altres, l'enzim és difícil d'aïllar de la seua font natural o és massa inestable per a utilitzar-lo en aplicacions sintètiques. Aquestes limitacions han portat a buscar nous biocatalitzadors i és en aquest terme on els anticossos catalítics han estat una de les solucions més eficaces i que han tingut més èxit.

A la bibliografia es troben nombrosos exemples en els quals anticossos catalítics intervenen en la síntesi de productes naturals. Així doncs, l'*anticòs 14D9* (que catalitza de manera efectiva la hidròlisi de gran varietat de funcions oxigenades com acetals^[104]

cetals^[105], epòxids^[106], éters^[107]) participa en un pas asimètric clau de la síntesi de l' α -multistriatina^[108] que és un component essencial de la feromona d'atracció de l'escarabat de l'escorça de l'om europeu (causant d'una de les principals malalties de l'om holandès^[109]). També els anticossos catalítics aldolases 38C2 i 33F12 han estat utilitzades en etapes claus de la síntesi de derivats d'epotilons^[110] (derivats de productes naturals utilitzats com a fàrmacs contra el càncer^[111]). Per últim, es volia destacar que s'ha aconseguit sintetitzar l'S-(+)-naproxèn (un dels fàrmacs anti-inflamatoris no esteroideus més receptats) mitjançant anticossos catalítics amb una eficiència molt notable^[112].

1.4. FOTOREACTIVITAT EN QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Les reaccions fotoquímiques representen una eina important en la química sintètica moderna. Permeten, en nombrosos casos, l'obtenció de productes sovint inaccessibles a partir de reaccions tèrmiques ja que en fotoquímica s'involucren els estats excitats. Malgrat això, moltes vegades no és fàcil predir i controlar el resultat en dissolució homogènia, on les molècules tenen un comportament relativament caòtic. Per tant, l'explotació de les reaccions fotoquímiques com a mètode sintètic depèn del fet que es pugui controlar la distribució i el rendiment dels fotoproductes actuant sobre les condicions experimentals (com la temperatura, el dissolvent, les concentracions, etc.).

Des d'aquest punt de vista, la fotoquímica supramolecular és una estratègia molt atractiva en la qual la combinació de les forces intramoleculares, elèctriques i magnètiques entre un substrat i l'entitat supramolecular ofereix una oportunitat de controlar el desenvolupament de noves reaccions fotoquímiques i d'investigar amb nous horitzons les reaccions clàssiques. Així doncs, la restricció espacial generada per l'estructura tridimensional d'una cavitat supramolecular pot canalitzar la fotoreacció fins a un únic fotoproducte.

S'ha vist en els capítols anteriors que les reaccions catalítiques tèrmiques estan àmpliament estudiades en el camp de les supramolècules (tant de les sintètiques com de les biològiques). No obstant això, les reaccions fotoquímiques només estan analitzades més a fons en medis organitzats sintètics. En canvi, els estudis en medis biològics són escassos.

En aquest capítol, doncs, es descriuran alguns treballs remarcables que es troben a la bibliografia en el quals s'estudien reaccions fotoquímiques a l'interior de supramolècules. Es parlarà esment a les característiques destacables de cada treball que són importants per a la present tesi i a les que són comunes per a aquest tipus d'estudi en

general. El bloc es dividirà en dues parts: d'una banda, es farà un repàs de les reaccions fotoquímiques estudiades a l'interior de macromolècules de tipus sintètic (ciclodextrines, micel·les, zeolites, calixarens, èters corona, etc.); i de l'altra, de fotoreaccions a l'interior de supramolècules d'origen biològic (principalment proteïnes).

1.4.1. Fotoreactivitat en medis no biològics

Les reaccions fotoquímiques, doncs, han estat estudiades en medis confinats. En aquesta secció s'analitzarà, a grans trets, la situació actual d'aquests estudis i s'enumeraran algunes de les aplicacions més representatives que es troben a la literatura. Per facilitar la visió, s'han organitzat els treballs segons distints tipus de supramolècules.

Ciclodextrines

Una de les aplicacions més destacades de les CD en fotoquímica és la del reconeixement quirals (és a dir, la discriminació entre dos estereoisòmers d'una molècula quiral). Aquest, com és conegut, és important sobretot des del punt de vista dels fàrmacs quirals, ja que els efectes biològics d'un fàrmac poden ser radicalment diferents per a cada enantiòmer. El reconeixement quiral amb CD és possible gràcies a la funcionalització d'aquestes amb un grup adient per a cada cas. En aquest àmbit són rellevants els treballs del professor Yoshihisa Inoue *et al.* en què es controla la fotodimerització de l'àcid 2-antracècarboxílic (i del seu anió) de manera enantioselectiva [113-119] i també els seus treballs sobre l'estudi de l'estereodiferenciació en la reacció de fotoisomerització del cicloocté^[41, 120-122] (veure esquema en la Figura 1.10) i del ciclooctadié^[123]. Cal esmentar, a més, els treballs del professor Ramamurthy *et al.* en els que s'han estudiat el control enantiò o diastereoselectiu per a diverses fotoreaccions en medi CD^[124-128].

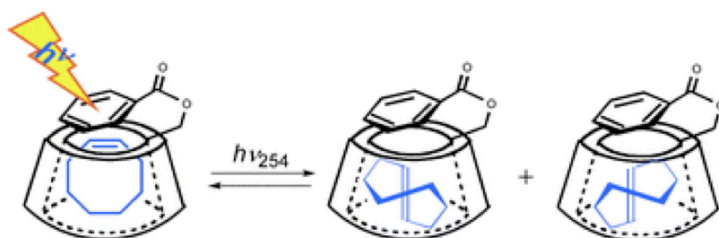


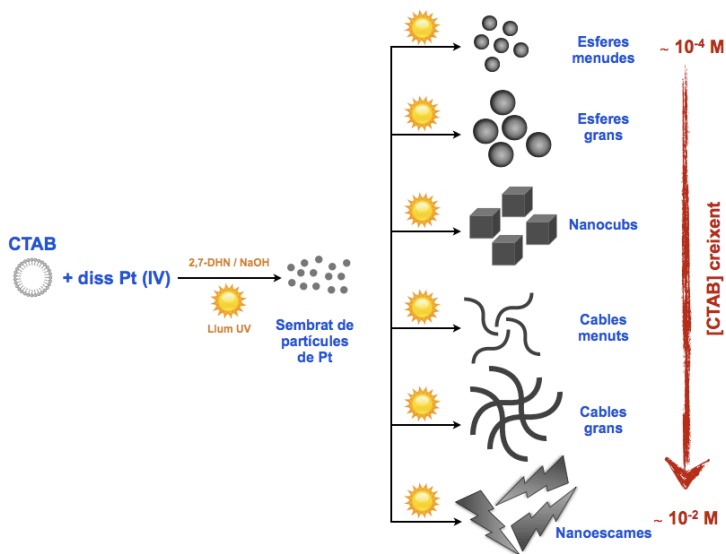
Figura 1.10. Entantiodiferenciació supramolecular de la fotoisomerització del cicloocté inserit i sensibilitzat per una CD modificada^[122].

A banda, també s'han fet estudis de reaccions fotoquímiques en què no intervé el reconeixement quiral. Mereixen especial menció alguns estudis sobre la reacció de foto-Fries^[129, 130] i de foto-Claisen que el professor Ramamurthy *et al.* han dut a terme a l'interior de les cavitats de CD^[131] i en les quals s'observa certa regioselectivitat.

Micel·les

Les micel·les o comicel·les se solen utilitzar com a medi per a realitzar reaccions fotoquímiques al seu interior ja que, de vegades, en les reaccions convencionals, l'agitació o la calefacció pot desfer les micel·les i aquestes deixen de fer el seu efecte; en canvi, utilitzar la llum com a reactiu en general no modifica les seues propietats^[132].

Així doncs, les micel·les poden fer la funció de microreactors per a certes reaccions fotoquímiques. Des d'aquest punt de vista, una de les aplicacions més utilitzada és la de fer-les servir com a microambient per a sintetitzar nanopartícules metàl·liques de manera fotoinduïda^[133-137]. Amb aquestes es pot controlar la reacció i, sobretot, la mida de les partícules. De vegades, fins i tot la forma, de manera que també es troben exemples de nanobastons^[138] i nanocables^[139] sintetitzats d'aquesta manera. Així doncs, es poden obtenir diferents tipus de nanoestructures utilitzant micel·les, en variar les condicions de reacció^[139] (Figura 1.11).



Esquema 1.11. Representació esquemàtica de la formació de múltiples nanoestructures de platí en diferents condicions de reacció^[139].

A la literatura també es troben altres casos de reaccions o processos fotoquímics que s'estudien a l'interior de diferents tipus de micel·les. En són un exemple els treballs del professor Ramamurthy *et al.*, en els quals s'estudien les reaccions de foto-Fries, la ruptura alfa de certs substrats i les reaccions de Norrish de tipus I i de tipus II^[140].

Zeolites

Són nombrosos i extensament variats els exemples que es troben a la literatura en els que s'utilitzen les zeolites com a microreactors de processos fotoquímics. No obstant això, per proximitat al treball ací presentat, mereixen especial menció els treballs de Ramamurthy *et al.* en els quals s'estudien reaccions fotoquímiques clàssiques com són les de foto-Fries i de foto-Claisen^[141-143] i les reaccions de Norrish tipus I i tipus II ^[144-147], treballs en els quals s'utilitzen les zeolites per a controlar la selectivitat dels productes obtinguts. A més, també han estudiat les zeolites com a medi per a induir quiralitat en processos fotoquímics^[55, 148].

També s'han considerat processos fotoquímics en altres supramolècules sintètiques tals com dendrímers, cucurbiturils, membranes, etc. No obstant això, els exemples ací exposats ja són suficientment representatius per tenir una mostra d'un amplíssim àmbit d'estudi i, alhora, per concretar les situacions que són més pròximes a l'objectiu d'aquest treball.

1.4.2. Fotoreactivitat en medis biològics

En aquest apartat es descriuran diverses reaccions fotoquímiques que tenen lloc en medis biològics. Per fer-ho tot més entenedor, s'ha organitzat aquest apartat aportant exemples segons el tipus de biomolècules implicades en el procés.

Anticossos catalítics

A banda dels nombrosos exemples de reaccions químiques catalitzades per anticossos catalítics que s'han descrit a l'apartat corresponent (1.3.3), a la bibliografia es troben també alguns exemples d'anticossos que catalitzen processos fotoquímics. Així doncs, s'ha estudiat la catàlisi de reaccions com la Norrish tipus II ^[149, 150], el fototrencament de dímers de timina^[151, 152] i la reacció de foto-Claisen ^[153] a través d'anticossos catalítics.

Enzims

Tal com s'ha comentat anteriorment, els enzims són proteïnes que catalitzen reaccions químiques o bioquímiques. Com a primera particularitat que els diferencia de supramolècules sintètiques és que són altament selectius, tant pel que fa al substrat que uneixen com pel que fa a la reacció concreta que catalitzen. I això és fruit de milions d'anys d'evolució. Des del punt de vista de la fotoquímica, la Natura només ha explotat el potencial de la llum en uns pocs exemples^[154]. Se'n descriuran breument els processos a continuació.

Tal vegada un dels exemples més coneguts d'activitat enzimàtica és la **fotosíntesi**, que és un procés molt important per a la vida a la Terra. Aquesta, en essència, és el procés mitjançant el qual les plantes transformen el CO₂ de l'atmosfera i l'aigua en carbohidrats i oxigen, amb l'ajuda de la llum solar^[2]. Aquest procés té lloc en els cloroplasts i es desenvolupa en dues fases:

- (1) *Fase lluminosa*: a través de la clorofil·la, es captura l'energia de la llum per generar molècules altament energètiques (ATP i NADPH) i a partir de l'aigua es genera oxigen.
- (2) *Fase fosca*: l'enzim RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfat carboxilasa/oxigenasa, de la qual se'n mostra un esquema en la Figura 1.12) captura el CO₂ de l'atmosfera i a través del cicle de Calvin-Benson (en què intervenen l'ATP i NADPH formats en la primera etapa) es genera gliceraldehid-3-fosfat (GAP) que en processos posteriors servirà per a sintetitzar glucosa.

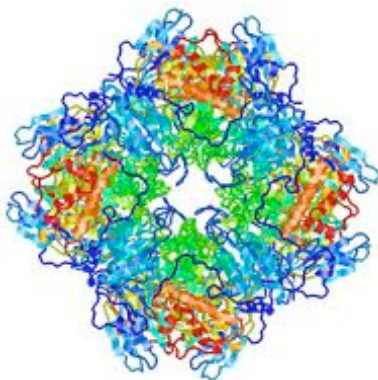


Figura 1.12. Esquema de l'enzim RuBisCO.

També des del punt de vista fotoquímic són importants els enzims que es coneixen com *receptors de llum blava* (**blue light receptors** en anglés)^[155-160]. Aquests estan presents a les plantes i regulen diferents aspectes del seu creixement i desenvolupament.

En general, per a les plantes existeixen dos grups de *blue light receptors* que són: els criptocroms (encarregats del creixement de l'hipocòtil† i dels ritmes de floració) i les fototropines (que actuen de mediador del fototropisme§ en resposta a l'estímul de la llum blava).

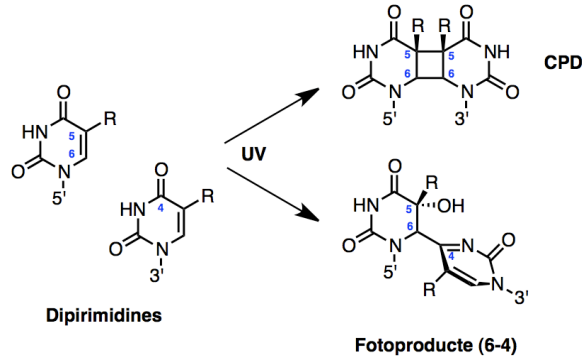


Figura 1.13. Esquema dels fotoproductes que es produeixen en l'ADN.

Un altre exemple destacable d'enzims és l'**ADN fotoliasa**. Hom sap que la radiació UV pot danyar l'ADN i donar lloc a mutacions, mort cel·lular i càncer^[161]. Existeixen diversos tipus de danys^[162, 163] però, d'entre aquests, els que es produeixen amb major percentatge són els dímers de pirimidina de tipus ciclobutà (*Cyclobutane Pyrimidine Dimers*, CPD) i els (6-4) fotoproductes pirimidina-pirimidona (Figura 1.13), que es formen aproximadament en el 80-90% i el 10-20%, respectivament. Aquestes fotolesions són reparades per la **CPD fotoliasa** i per la **(6-4) fotoliasa**, que són de vital importància per a la supervivència de moltes espècies.

L'enzim CPD fotoliasa s'uneix als CPD independentment de la llum, en el lloc on l'hèlix de l'ADN pateix una distorsió deguda a la formació d'aquests dímers de pirimidina. Després el dímer s'extrau de la doble hèlix de l'ADN i passa a localitzar-se en la cavitat del lloc actiu de l'enzim. La catàlisi s'inicia per llum de manera que un fotó VIS és absorbit per part d'un cromòfor antena de l'enzim i l'energia d'excitació d'aquest és transmesa mitjançant

† *Hipocòtil* és el terme botànic utilitzat per a referir-se a la part de la planta que germina d'una llavor.

§ El *fototropisme* és la resposta de la planta a l'estímul lluminós. Aquesta resposta implica un creixement de la planta influenciat per aquest estímul. Cada part de la planta respon de distinta manera a aquest estímul. Per exemple, en el cas de la tija, s'observa un fototropisme positiu perquè creix cap a la font lluminosa; en el cas de l'arrel, en canvi, es dona un fototropisme negatiu.

una FRET^{§§}[164] al cofactor flavina (reduïda) de l'enzim. Aquesta, des del seu estat excitat singlet, transfereix un electró al dímer i trenca així l'anell de ciclobutà per formar dues pirimidines. A la vegada, un electró del radical de pirimidina és transferit a la flavina formada durant la catàlisi i es regenera així la flavina activa inicial (Figura 1.14). La reparació del fotoproducte CPD té lloc amb un rendiment quàntic molt alt (entre 0.7 i 0.98).

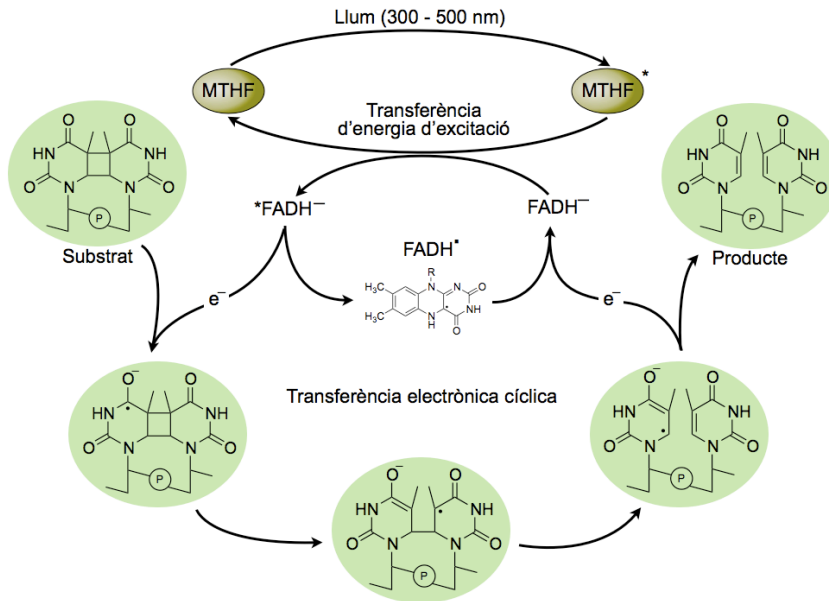


Figura 1.14. Esquema del mecanisme de reparació de la CPD fotoliasa.

Fins no fa molts anys, el mecanisme de la (6-4) fotoliasa es creia similar al de la CPD fotoliasa, però amb una diferència significativa que consistia que l'enzim primer convertia tèrmicament el fotoproducte (6-4) en un intermedi amb un anell de 4 membres semblant al CPD i, a partir d'aquest punt, actuava de manera semblant a l'altre enzim. No obstant això, aquest mecanisme ha estat àmpliament discutit al llarg dels últims anys^[165-171]. I és que certs estudis han proposat un mecanisme en el qual el primer pas consistiria en una transferència electrònica fotoinduïda des de l'estat excitat singlet reduït de la flavina directament a l'adducte (6-4), cosa que provoca el trencament d'aquest.

§§ Abreviatura en anglès de *Förster Resonance Energy Transfer* que es refereix a un procés de transferència d'energia que té lloc entre dos cromòfors: una molècula donadora (D) en estat excitat i una molècula acceptora (A) en estat fonamental.

Albúmines sèriques

A la bibliografia, els exemples en què s'utilitzen proteïnes com a sistemes supramoleculars en els quals tenen lloc reaccions fotoquímiques són escassos i fan servir, bàsicament, albúmines sèriques. Els processos descrits fins ara en la bibliografia s'inclouen en l'àrea de la fotoquirogènesi supramolecular. En aquest sentit, els estudis es limiten a alguns treballs relacionats amb la fotodescomposició del binaftol^[172], la fotodeshalogenació del carprofén^[173], la fotociclació de la bilirubina^[174], les fotoisomeritzacions de les colquícines^[175], la fotodescarboxilació del ketoprofén^[176, 177], la fotooxidació de l'antracé^[178] i la fotodimerització de l'àcid antracé-2-carboxílic en presència d'albúmina sèrica humana i/o bovina^[179-181]. A grans trets, el que aquests exemples mostren és que la presència de les proteïnes i la inclusió del substrat en un determinat lloc d'unió dins d'aquestes influeix en l'enantiò o estereodiferenciació observada per a les reaccions en qüestió i també afavoreix la formació d'uns fotoproductes de manera predominant respecte a uns altres.

En el nostre grup, des d'aquest punt de vista, s'ha estudiat la fotofísica i fotoquímica del carprofén (CP) en albúmina sèrica humana^[173]. D'una banda, s'obté una estereodiferenciació en els senyals transitoris obtinguts per fotòlisi de flaix làser entre l'(*R*)-CP i l'(*S*)-CP quan aquests estan complexats amb la proteïna (majoritàriament en el lloc d'unió II). A més, pel que fa la formació del fotoproducte d'irradiació -que implica una reacció de fotodeshalogenació (Figura 1.15)- resultà ser 1.5 vegades més eficient en el cas del complex (*S*)-CP@HSA.

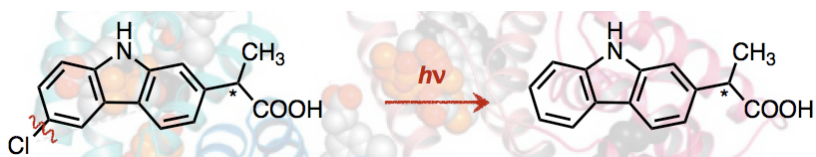


Figura 1.15. Esquema la fotodeshalogenació del carprofén a l'interior de l'HSA.

Al grup també s'ha estudiat la fotooxidació d'un derivat quiral d'antracé soluble en aigua a l'interior de diverses proteïnes^[178]. Les espècies transitòries també mostren en aquest cas una estereodiferenciació entre els enantiòmers *R* i *S* del substrat quan estan complexades amb proteïna, i aquesta és major si es tracta de l'HSA en comparació amb la resta. En l'estudi de la fotooxidació del substrat (a través de la formació d'¹O₂) per a formar l'antraquinona corresponent, s'obté que la reacció va més lenta quan té lloc a l'interior de les proteïnes que en dissolució, atès que la proteïna protegeix el substrat de l'atac de l'¹O₂.

En el cas de l'HSA s'obté, a més, que la fotooxidació era més lenta per al lloc d'unió II que per al lloc I.

Així doncs, l'àmbit de les proteïnes com a catalitzadors de reaccions fotoquímiques està poc estudiat. És per això que s'ha considerat interessant aprofundir el treball en aquesta àrea, atès que les proteïnes ofereixen avantatges que no ofereixen les supramolècules sintètiques.

1.5. ANÀLISI GENERAL DE LA SITUACIÓ

En aquesta anàlisi introductòria s'ha observat que el món de la química supramolecular és complex i ric en matisos. La seua característica més destacada (que sovint presenta avantatges respecte de la química "tradicional") consisteix a aprofitar l'estructura tridimensional de la molècula amfitrió per a catalitzar reaccions o fotoreaccions de manera dirigida cap a uns productes o fotoproductes concrets i amb uns rendiments alts. Avui dia aquests aspectes són objectius fonamentals en la majoria de processos sintètics ja que, d'una banda, es permet un major aprofitament dels substrats a causa de l'alt rendiment de les reaccions i, a més, com que les reaccions estan dirigides, s'aconsegueix una disminució dels residus generats.

A banda d'això, s'ha analitzat en els apartats anteriors que l'estudi de les reaccions fotoquímiques resulten interessants des de molts punts de vista: permeten sintetitzar productes difícils d'obtenir per mitjà de reaccions convencionals, estan involucrades en processos biològics essencials (síntesi de la vitamina D, fotosíntesi), en fàrmacs poden desencadenar processos secundaris perjudicials per al cos humà, estan involucrades en alguns processos mutagènics, etc. Molts d'aquests processos han estat (i encara ho són) vastament estudiats a la bibliografia. Des del punt de vista supramolecular, que és el que ens ocupa, es troben nombrosos exemples de reaccions fotoquímiques catalitzades per supramolècules com zeolites, ciclodextrines, micel·les, etc. No obstant això, els exemples amb amfitrions biològics són escassos. Així doncs, com que la capacitat i potencial de les biomolècules ha estat poc explotada en aquest sentit, la línia general d'aquesta tesi ha volgut centrar la seua atenció en l'estudi de reaccions fotoquímiques a través de supramolècules d'origen biològic que funcionen com a catalitzadors. Cal destacar que, en general, els amfitrions biòtics són capaços de proporcionar una interacció molt estreta amb el substrat, cosa que sol implicar una millora important de la selectivitat i el rendiment de la reacció. Això pot també notar-se a nivell d'estereoselectivitat, atès el caràcter quiral dels

llocs d'unió. Aquestes característiques són difícils de trobar en compostos supramoleculars abiòtics ja que el seu disseny comporta un alt nivell de complexitat.

Com que en el nostre grup de treball tradicionalment s'han utilitzat albúmines sèriques en l'anàlisi de nombrosos processos fotoquímics^[173, 178, 182-187] s'han aprofitat aquests antecedents i experiència per estudiar algunes reaccions fotoquímiques d'interés en presència d'aquestes proteïnes. S'ha considerat que les albúmines sèriques són biomolècules interessants per als objectius d'aquesta tesi per dues raons fonamentals: (i) són proteïnes transportadores que actuen com a vehicle d'una àmplia varietat de substàncies endògenes i exògenes; (ii) posseeixen generalment dos llocs d'unió diferenciats que poden aportar punts de vista nous a aquest tipus d'estudi.

Així doncs, s'ha fet servir el potencial catalític de les proteïnes sèriques en l'àmbit de la fotoreactivitat, i s'han obtingut resultats diversos i interessants que, a grans trets, han permès, d'una banda, augmentar el rendiment i la direccionalitat de les fotoreaccions; i de l'altra, entendre millor el funcionament de les albúmines com a amfitrions. A més, els resultats poden ser rellevants també des del punt de vista de la fotobiologia ja que poden ajudar a aprofundir en la comprensió de la fotoinestabilitat de certs agents exògens a medis biològics que desencadenen processos perjudicials per a la salut (per exemple, alguns fàrmacs). D'aquesta manera, aquests estudis es podran relacionar amb els processos mutagènics que produeix la llum en biomolècules essencials com l'ADN, membranes cel·lulars, etc.

1.6. BIBLIOGRAFIA

- [1] T. D. H. Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, 2nd ed., Blackwell Publishing, **2004**.
- [2] D. V. Voet, J. G. Biochemistry, 4th ed., Wiley, **2010**.
- [3] J. M. Lehn, *Science* **1993**, *260*, 1762.
- [4] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd, **2009**.
- [5] T. K. Katsuhiko Ariga, *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications*, Springer, **2006**.
- [6] E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokel, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 2564.
- [7] V. Balzani, M. Gomez-Lopez, J. F. Stoddart, *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 405.
- [8] W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nature Nanotechnology* **2006**, *1*, 25.
- [9] J. Rebek, Jr, *Science* **1987**, *235*, 1478.
- [10] F. M. Menger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 4818.
- [11] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **2002**, *295*, 2418.
- [12] D. J. Cram, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1988**, *27*, 1009.
- [13] H. J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 263.
- [14] C. Y. Huang, *Methods in Enzymology* **1982**, *87*, 509.
- [15] F. Davis, S. Higson, *Macrocycles: Construction, Chemistry, and Nanotechnology Applications*, Wiley, Hoboken, **2011**.
- [16] J. Cejka, A. Corma, S. Zones, *Zeolites And Catalysis: Synthesis, Reactions and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, **2010**.
- [17] A. Corma, *Journal of Catalysis* **2003**, *216*, 298.
- [18] A. Terfort, G. Vonkiedrowski, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1992**, *31*, 654.
- [19] V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Physics World* **2004**, *17*, 39.
- [20] V. Balzani, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 459.
- [21] V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Pure and Applied Chemistry* **2003**, *75*, 541.
- [22] V. Balzani, A. C. Venturi, *Molecular Devices and Machines: A Journey into the Nanoworld*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.

- [23] K. Sablon, *Nanoscale Research Letters* **2008**, *3*, 268.
- [24] W. B. Motherwell, M. J. Bingham, Y. Six, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4663.
- [25] A. J. Kirby, in *Stimulating Concepts in Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, p. 396.
- [26] A. J. Kirby, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 707.
- [27] R. Breslow, S. D. Dong, *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 1997.
- [28] J. Bjerre, C. Rousseau, L. Marinescu, M. Bols, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *81*, 1.
- [29] R. Villalonga, R. Cao, A. Fragoso, *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 3088.
- [30] A. Douhal, *Cyclodextrin Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology*, Elsevier, **2006**.
- [31] D. C. Rideout, R. Breslow, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7816.
- [32] H. J. Schneider, N. K. Sangwan, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1986**, 1787.
- [33] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Fujita, H. Kawakubo, *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 2083.
- [34] O. S. Tee, J. M. Bennett, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 269.
- [35] O. S. Tee, J. M. Bennett, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 3226.
- [36] A. C. Hengge, W. W. Cleland, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 1972.
- [37] J. B. Giorgi, O. S. Tee, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3633.
- [38] S. Tamagaki, A. Katayama, M. Maeda, N. Yamamoto, W. Tagaki, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1994**, 507.
- [39] I. Tabushi, Y. Kuroda, M. Yamada, H. Higashimura, R. Breslow, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 5545.
- [40] Y. Kuroda, T. Hiroshige, H. Ogoshi, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1990**, 1594.
- [41] R. H. Lu, C. Yang, Y. J. Cao, L. H. Tong, W. Jiao, T. Wada, Z. Z. Wang, T. Mori, Y. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 7695.
- [42] V. Chechik, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2006**, *102*, 357.
- [43] V. Chechik, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2007**, *103*, 352.
- [44] V. Chechik, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2008**, *104*, 331.
- [45] L. Onel, N. J. Buurma, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2009**, *105*, 363.

- [46] L. Onel, N. J. Buurma, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2010**, 106, 344.
- [47] N. J. Buurma, *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)* **2011**, 107, 328.
- [48] M. L. Satnami, S. Dhritlahre, R. Nagwanshi, I. Karbhal, K. K. Ghosh, F. Nome, *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 16759.
- [49] A. C. Faria, R. S. Mello, E. S. Orth, F. Nome, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2008**, 289, 106.
- [50] P. Campos-Rey, C. Cabaleiro-Lago, P. Hervés, *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 14004.
- [51] M. J. Pastoriza-Gallego, C. Bravo-Díaz, *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, 22, 390.
- [52] J. J. Lee, B. D. Smith, *Chemical Communications* **2009**, 1962.
- [53] M. A. Farrukh, R. C. Beber, J. P. Priebe, M. Lal Satnami, G. A. Micke, A. C. O. Costa, H. D. Fiedler, C. A. Bunton, F. Nome, *Langmuir* **2008**, 24, 12995.
- [54] S. M. Auerbach, K. A. Carrado, P. K. Dutta, *Handbook of Zeolite Science and Technology*, CRC Press New York, **2003**.
- [55] V. Ramamurthy, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2000**, 1, 145.
- [56] Y. K. Agrawal, H. Bhatt, *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2004**, 2, 237.
- [57] D. Coquiere, S. Le Gac, U. Darbost, O. Seneque, I. Jabin, O. Reinaud, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, 2485.
- [58] A. Wei, *Chemical Communications* **2006**, 1581.
- [59] F. Sansone, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro, *New Journal of Chemistry* **2010**, 34, 2715.
- [60] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chemical Society Reviews* **2004**, 33, 43.
- [61] B. Kenda, F. Diederich, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 3154.
- [62] P. Wallimann, P. Seiler, F. Diederich, *Helvetica Chimica Acta* **1996**, 79, 779.
- [63] S. Mattei, P. Wallimann, B. Kenda, W. Amrein, F. Diederich, *Helvetica Chimica Acta* **1997**, 80, 2391.
- [64] S. Mattei, P. Seiler, F. Diederich, V. Gramlich, *Helvetica Chimica Acta* **1995**, 78, 1904.
- [65] G. C. Barrett, J. S. Davies, *Amino Acids, Peptides and Proteins, Volume 34*, Royal Society of Chemistry, **2003**.
- [66] R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochemistry*, 4th ed., Cengage Learning, **2009**.
- [67] G. A. Petsko, D. Ringe, *Protein Structure And Function*, New Science Press, **2003**.

- [68] T. Peters Jr, J. T. E. C.B. Anfinsen, M. R. Frederic, in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 37, Academic Press, **1985**, pp. 161.
- [69] T. Peters Jr, *All About Albumin. Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, **1995**.
- [70] D. J. Triggle, *Pharmaceutica acta Helvetiae* **2000**, 74, 79.
- [71] H. Yamada, S. Shimizu, *Angewandte Chemie* **1988**, 100, 640.
- [72] C. H. Wong, *Science* **1989**, 244, 1145.
- [73] A. Robertson, W. Karp, R. Brodersen, *Developmental Pharmacology and Therapeutics* **1990**, 15, 106.
- [74] D. Harmatz, G. Blauer, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1975**, 170, 375.
- [75] L. Stern, R. Brodersen, *Pediatrics* **1987**, 79, 154.
- [76] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Engineering* **1999**, 12, 439.
- [77] M. Dockal, D. C. Carter, F. Ruker, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 29303.
- [78] U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, M. Otagiri, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 25, 695.
- [79] J. I. Ewaskiewicz, T. M. Devlin, J. J. Chih, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, 179, 1095.
- [80] Z. Drmanovic, S. Voyatzi, D. Kouretas, D. Sahpazidou, A. Papageorgiou, O. Antonoglou, *Anticancer Research* **1999**, 19, 4113.
- [81] R. P. Agarwal, M. Phillips, R. A. McPherson, P. Hensley, *Biochemical Pharmacology* **1986**, 35, 3341.
- [82] H. Georges, N. Presle, T. Buronfosse, S. Fournel-Gigleux, P. Netter, J. Magdalou, F. Lapicque, *Chirality* **2000**, 12, 53.
- [83] N. Dubois-Presle, F. Lapicque, M. H. Maurice, S. Fournel-Gigleux, J. Magdalou, M. Abiteboul, G. Siest, P. Netter, *Molecular Pharmacology* **1995**, 47, 647.
- [84] C. J. Bueno, M. C. Jimenez, M. A. Miranda, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, 113, 6861.
- [85] S. F. Ma, M. Anraku, Y. Iwao, K. Yamasaki, U. Kragh-Hansen, N. Yamaotsu, S. Hirono, T. Ikeda, M. Otagiri, *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, 33, 1911.
- [86] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Molecular Pharmacology* **1976**, 12, 1052.
- [87] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, 358, 209.
- [88] F. Lapicque, N. Muller, E. Payan, N. Dubois, P. Netter, *Clinical Pharmacokinetics* **1993**, 25, 115.

- [89] M. H. Rahman, K. Yamasaki, Y. H. Shin, C. C. Lin, M. Otagiri, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **1993**, *16*, 1169.
- [90] A. Bruggink, E. C. Roos, E. de Vroom, *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 128.
- [91] E. Keinan, *Catalytic Antibodies*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, **2005**.
- [92] L. Pauling, *Nature* **1948**, *161*, 707.
- [93] G. M. Blackburn, A. S. Kang, G. A. Kingsbury, D. R. Burton, *Biochemical Journal* **1989**, *262*, 381.
- [94] P. G. Schultz, J. Yin, R. A. Lerner, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 4427.
- [95] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Accounts of Chemical Research* **1993**, *26*, 391.
- [96] V. L. Schramm, *Accounts of Chemical Research* **2003**, *36*, 588.
- [97] D. Hilvert, *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 751.
- [98] N. Thomas, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1994**, *47*, 345.
- [99] M. Barbany, H. Gutiérrez-de-Terán, F. Sanz, J. Villà-Freixa, A. Warshel, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 277.
- [100] P. G. Schultz, *Science* **1988**, *240*, 426.
- [101] K. C. Nicolaou, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 11928.
- [102] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232.
- [103] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258.
- [104] J. L. Reymond, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 1711.
- [105] S. C. Sinha, E. Keinan, J. L. Reymond, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 11910.
- [106] S. C. Sinha, E. Keinan, J. L. Reymond, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 4893.
- [107] J. L. Reymond, G. K. Jahangiri, C. Stoudt, R. A. Lerner, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 3909.
- [108] S. C. Sinha, E. Keinan, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 3653.
- [109] G. T. Pearce, W. E. Gore, R. M. Silverstein, J. W. Peacock, R. A. Cuthbert, G. N. Lanier, J. B. Simeone, *Journal of Chemical Ecology* **1975**, *1*, 115.

- [110] S. C. Sinha, C. F. Barbas, III, R. A. Lerner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 14603.
- [111] K. C. Nicolaou, F. Roschangar, D. Vourloumis, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2014.
- [112] A. Datta, P. Wentworth, J. P. Shaw, A. Simeonov, K. D. Janda, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 10461.
- [113] C. Yang, G. Fukuhara, A. Nakamura, Y. Origane, K. Fujita, D. Q. Yuan, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2005**, *173*, 375.
- [114] C. Yang, A. Nakamura, T. Wada, Y. Inoue, *Organic Letters* **2006**, *8*, 3005.
- [115] C. Yang, A. Nakamura, G. Fukuhara, Y. Origane, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 3126.
- [116] C. Yang, T. Mori, Y. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 5786.
- [117] C. F. Ke, C. Yang, T. Mori, T. Wada, Y. Liu, Y. Inoue, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6675.
- [118] H. B. Qiu, C. Yang, Y. Inoue, S. N. Che, *Organic Letters* **2009**, *11*, 1793.
- [119] C. Yan, M. Nishijima, A. Nakamura, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 4357.
- [120] G. Fukuhara, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 8233.
- [121] R. H. Lu, C. Yang, Y. J. Cao, Z. Z. Wang, T. Wada, W. Jiao, T. Mori, Y. Inoue, *Chemical Communications* **2008**, 374.
- [122] G. Fukuhara, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Chemical Communications* **2005**, 4199.
- [123] C. Yang, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 697.
- [124] R. Kaliappan, V. Ramamurthy, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *207*, 144.
- [125] S. Koodanjeri, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 9229.
- [126] J. Shailaja, S. Karthikeyan, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 9335.
- [127] A. Natarajan, K. Wang, V. Ramamurthy, J. R. Scheffer, B. Patrick, *Organic Letters* **2002**, *4*, 1443.
- [128] S. Koodanjeri, A. Joy, V. Ramamurthy, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7003.
- [129] S. Koodanjeri, A. R. Pradhan, L. S. Kaanumalle, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 3207.
- [130] M. S. Syamala, B. N. Rao, V. Ramamurthy, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7234.

- [131] M. S. Syamala, V. Ramamurthy, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7223.
- [132] S. Tascioglu, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11113.
- [133] M. L. Marin, K. L. McGilvray, J. C. Scaiano, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 16572.
- [134] S. S. Srinivasan, J. Wade, E. K. Stefanakos, *Journal of Nanomaterials* **2006**, *7*.
- [135] S. Kundu, H. Liang, *Langmuir* **2009**, *26*, 6720.
- [136] S. Kundu, K. Wang, H. Liang, *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 18570.
- [137] Q. Jin, G. Liu, J. Ji, *European Polymer Journal* **2010**, *46*, 2120
- [138] K. Nishioka, Y. Niidome, S. Yamada, *Langmuir* **2007**, *23*, 10353.
- [139] S. Kundu, D. Huitink, H. Liang, *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 7700.
- [140] S. Arumugam, D. R. Vutukuri, S. Thayumanavan, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13200.
- [141] W. Q. Gu, M. Warriar, V. Ramamurthy, R. G. Weiss, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 9467.
- [142] K. Pitchumani, M. Warriar, C. Cui, R. G. Weiss, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6251.
- [143] K. Pitchumani, M. Warriar, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9428.
- [144] D. R. Corbin, D. F. Eaton, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 4848.
- [145] V. Ramamurthy, D. R. Corbin, D. F. Eaton, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 5269.
- [146] V. Ramamurthy, D. R. Corbin, D. F. Eaton, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1989**, 1213.
- [147] V. Ramamurthy, X. G. Lei, N. J. Turro, T. J. Lewis, J. R. Scheffer, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 7675.
- [148] A. Joy, V. Ramamurthy, *Chemistry – A European Journal* **2000**, *6*, 1287.
- [149] S. Saphier, S. C. Sinha, E. Keinan, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 1378.
- [150] M. J. Taylor, T. Z. Hoffman, J. T. Yli-Kauhaluoma, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12783.
- [151] A. G. Cochran, R. Sugawara, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7888.

- [152] J. R. Jacobsen, A. G. Cochran, J. C. Stephans, D. S. King, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5453.
- [153] T. J. Dickerson, M. R. Tremblay, T. Z. Hoffman, D. I. Ruiz, K. D. Janda, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 15395.
- [154] S. Saphier, R. Piran, E. Keinan, in *Catalytic Antibodies*, Wiley-VCH, **2005**, pp. 351.
- [155] C. T. Lin, *Trends in Plant Science* **2000**, *5*, 337.
- [156] R. Banerjee, A. Batschauer, *Planta* **2005**, *220*, 498.
- [157] A. R. Cashmore, J. A. Jarillo, Y. J. Wu, D. M. Liu, *Science* **1999**, *284*, 760.
- [158] W. R. Briggs, J. M. Christie, *Trends in Plant Science* **2002**, *7*, 204.
- [159] A. R. Cashmore, *Journal of Plant Research* **1998**, *111*, 267.
- [160] J. M. Christie, W. R. Briggs, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 11457.
- [161] C. L. Partch, A. Sancar, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 1, Elsevier Ltd, **2004**, pp. 698.
- [162] D. L. Mitchell, in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed., CRC Press LLC, **2004**, pp. 140/1.
- [163] M. G. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed., CRC Press LLC, **2004**, pp. 141/1.
- [164] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, **1983**.
- [165] J. Yamamoto, Y. Tanaka, S. Iwai, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 161.
- [166] S. Asgatay, C. Petermann, D. Harakat, D. Guillaume, J.-S. Taylor, P. Clivio, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 12618.
- [167] E. Schleicher, K. Hitomi, C. W. M. Kay, E. D. Getzoff, T. Todo, S. Weber, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 4738.
- [168] M. J. Maul, T. R. M. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 10076.
- [169] A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 10299.
- [170] T. Domratcheva, I. Schlichting, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 17793.
- [171] K. Sadeghian, M. Bocola, T. Merz, M. Schütz, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16285.
- [172] A. Ouchi, G. Zandomenighi, M. Zandomenighi, *Chirality* **2002**, *14*, 1.
- [173] V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 423.

- [174] A. F. McDonagh, G. Agati, F. Fusi, R. Pratesi, *Photochemistry and Photobiology* **1989**, *50*, 305.
- [175] P. Bartovsky, R. Tormos, M. A. Miranda, *Chemical Physics Letters* **2009**, *480*, 305.
- [176] S. Monti, I. Manet, F. Manoli, R. Morrone, G. Nicolosi, S. Sortino, *Photochemistry and Photobiology* **2006**, *82*, 13.
- [177] S. Monti, I. Manet, F. Manoli, S. Sortino, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6*, 462.
- [178] R. Alonso, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Organic Letters* **2011**, *13*, 3860.
- [179] M. Nishijima, T. C. S. Pace, A. Nakamura, T. Mori, T. Wada, C. Bohne, Y. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 2707.
- [180] M. Nishijima, T. Wada, T. Mori, T. C. S. Pace, C. Bohne, Y. Inoue, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3478.
- [181] T. C. S. Pace, M. Nishijima, T. Wada, Y. Inoue, C. Bohne, *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 10445.
- [182] V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9538.
- [183] M. C. Jimenez, M. A. Miranda, I. Vaya, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 10134.
- [184] I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- [185] I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. Jimenez, M. A. Miranda, *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 11284.
- [186] E. Nuin, I. Andreu, M. J. Torres, M. C. Jimenez, M. A. Miranda, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 1158.
- [187] J. Moser, F. Bosca, W. W. Lovell, J. V. Castell, M. A. Miranda, A. Hye, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, *58*, 13.

2. Objectius

Tal com s'ha vist a la introducció, l'estudi de diferents reaccions fotoquímiques en sistemes supramoleculars ha estat explorat des de molts punts de vista. No obstant això i malgrat les propietats remarcables que poden demostrar els amfitrions biòtics, els exemples amb biomolècules segueixen sent escassos.

L'objectiu principal de la present tesi serà definir una base per a l'ús de biomolècules com a fotocatalitzadors. Així, el tema comú de tots els capítols consistirà a establir els avantatges essencials que poden aportar les biomolècules com a amfitrions de reaccions fotoquímiques. Concretament, es consideraran les albúmines sèriques com a macromolècules i s'estudiaran les següents reaccions fotoquímiques clàssiques: el reordenament de foto-Fries, la fragmentació de tipus Norris II i la fotoelectrociclació [6π].

Així doncs, es plantegen els següents objectius concrets per a aquesta tesi doctoral:

1. Estudiar l'efecte de la rigidesa i del confinament proporcionats per la cavitat proteica sobre el comportament dels estats excitats. Amb aquest objectiu es caracteritzaran fotofísicament els substrats a l'interior i a l'exterior de la proteïna per tal d'establir les diferències en aquests dos àmbits.
2. Avaluar la influència que té la complexació amb l'albúmina sobre la fotoquímica dels substrats mitjançant la determinació dels rendiments quàntics i químics de la reacció (bé absoluts o bé relatius) a l'interior de la proteïna.
3. Establir la importància del lloc d'unió de l'hoste en la selectivitat i el rendiment quàntic de la reacció. En relació a això, cal dissenyar i estudiar substrats que demostrin una interacció específica per a cada lloc d'unió i establir l'estequiometria dels complexos supramoleculars i el lloc d'interacció.
4. Determinar l'efecte dels canvis de la concentració i de la constant de difusió de l'oxigen a l'interior de les albúmines, tant pel que fa a la desactivació d'espècies transitòries (estats excitats triplets, etc.) com a la seua participació com a reactiu.

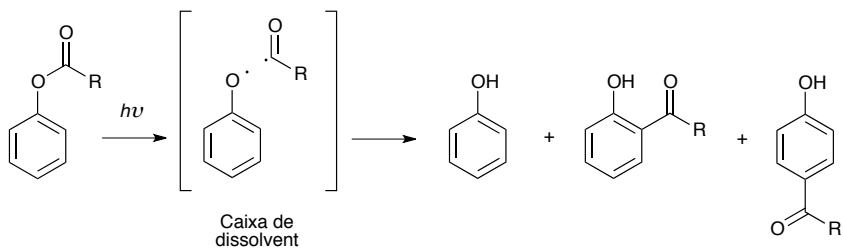
3. Reordenament de foto-Fries en albúmina sèrica

3.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

La reacció de foto-Fries és una reacció fotoquímica clàssica que s'ha estudiat en nombrosos treballs^[1]. En aquesta tesi s'ha pres com a reacció fotoquímica model per tal d'estudiar-la a l'interior de distintes proteïnes sèriques de diferents orígens. En aquest cas, aquestes funcionaran com a matrius biològiques i, tal com es veurà, presenten certes diferències respecte a altres tipus de matrius supramoleculares.

3.1.1. Característiques del reordenament de foto-Fries

La reacció o reordenament de foto-Fries és anàloga a l'homòloga clàssica reacció de Fries (catalitzada per àcid de Lewis) i es dona en èsters arílics. En excitar el substrat per mitjà de llum, es forma l'estat excitat singlet i, a partir d'aquest, té lloc un trencament homolític de l'enllaç simple entre el carbonil i l'oxigen. A causa d'això, s'obté un parell radical confinat inicialment en el que es coneix com a "caixa de dissolvent". Aquest parell radical pot, d'una banda, recombinar-se en les posicions electrònicament més afavorides (*orto* i *para*), recombinar-se per a donar el mateix producte inicial, o bé eixir d'aquesta caixa de dissolvent, de manera que s'obté el fenol corresponent (el subproducte més comú).^[1, 2] Tot aquest procés queda ben il·lustrat en l'esquema 3.1.



Esquema 3.1. Reacció de foto-Fries per a un substrat model.

3.1.2. Interés i rellevància de la reacció de foto-Fries

Tal com s'ha comentat, la reacció de foto-Fries ha estat extensament estudiada en dissolució. Per això, el seu mecanisme, característiques, fotoproductes, etc. són àmpliament coneguts. Tot això fa que pugui utilitzar-se com a model per ser estudiada en sistemes supramoleculares i veure, d'aquesta manera, quin efecte té l'amfitrió en qüestió

sobre el rendiment, la selectivitat, la velocitat, etc. de la reacció (veure l'apartat 3.1.3) i serà això un tema central en aquest treball.

El reordenament de foto-Fries en si, té certa rellevància des del punt de vista de la síntesi orgànica ja que, com moltes reaccions fotoquímiques, poden bé estalviar uns quants passos de síntesi simplificant així processos sintètics llargs i laboriosos, o bé permeten no haver d'utilitzar reactius contaminants, tòxics, perillosos de manejar o difícils d'eliminar. De vegades, però, el problema de l'ús de les reaccions fotoquímiques rau en el fet que produeixen subproductes no desitjats. És per això que el fet d'augmentar la direccionalitat de la reacció, la selectivitat pels fotoproductes desitjats, el rendiment i la velocitat de la reacció, etc. ha estat un dels objectius principals de l'ús de la química supramolecular, tal com es veurà en apartats posteriors.

A la indústria, el reordenament clàssic de Fries s'ha utilitzat en la síntesi de fàrmacs, colorants i productes agraris. Per exemple, s'utilitza per al reordenament selectiu en la posició *para*- del fenilacetat, que és un pas clau en el procés de Hoechst-Celanese de la síntesi del paracetamol^[3]. No obstant això, la reacció clàssica està catalitzada per àcids que típicament poden ser HF, AlCl₃, BF₃, H₂SO₄, etc. que en general són compostos tòxics, corrosius i perillosos de manejar. A més, en aquestes condicions, el reordenament de Fries aporta poca selectivitat i genera residus contaminants i d'alta toxicitat. És per això que a la bibliografia es troben treballs que intenten fer d'aquesta síntesi un procés més ecològic^[4]. En aquest sentit el reordenament fotoquímic de Fries resulta molt interessant ja que, al ser una reacció en la qual intervé només la llum com a reactiu (a banda del substrat en qüestió), es tracta d'un procés més net. I si això es combina amb un augment de la selectivitat utilitzant una supramolècula com a catalitzador (zeolites, biomolècules, etc.) hom es pot acostar encara més al concepte de "química verda".

3.1.3. Antecedents de la reacció de foto-Fries en sistemes supramoleculares

El reordenament de foto-Fries s'ha estudiat a l'interior de distints sistemes supramoleculares. El fet de ser una reacció ben coneguda permet investigar a fons els efectes que un sistema amfitrió pot tenir sobre ella des del punt de vista de la selectivitat, formació dels fotoproductes, rendiments de reacció, etc. A continuació s'esmenten algunes conclusions que s'extrauen dels treballs més destacats.

Pel que fa als estudis de la reacció de foto-Fries en ciclodextrines (CD), a la bibliografia s'han trobat exemples tant amb ésters derivats de fenols com de naftols.

Inicialment, en tots es comprova la inclusió del substrat de la reacció a l'interior de la CD. Això es fa per mitjà de mètodes espectrofotomètrics, d'RMN, etc. Quant a la reacció, és interessant destacar que, en general, en presència de CD s'obté més fotoproducte *orto*-substituït que en dissolució. Això s'explica perquè la CD fa de bastiment de manera que protegeix la posició *para*- de l'atac del radical, deixant la posició *orto*- com a única posició lliure per ser atacada^[5-10] (es mostra un esquema d'això en la Figura 3.1 per a un naftol genèric). A més, la CD com a amfitrió també és capaç d'incrementar el rendiment quàntic de reacció ja que augmenta l'esmentat "efecte caixa". D'aquesta manera s'afavoreix la recombinació del parell de radicals i s'evita l'escapament d'aquests i, per tant, la formació del naftol corresponent ^[6, 9-11].

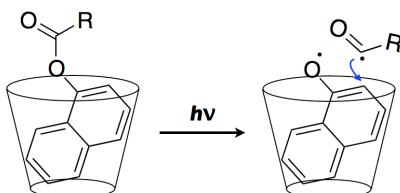


Figura 3.1. Reacció de foto-Fries a l'interior d'una CD.

Alguns d'aquests treballs mostren realment una enorme selectivitat de la reacció de foto-Fries a l'interior de les CD respecte a l'exterior. Així per exemple, Ramamurthy *et al.* ^[5] mostren com diversos 1-naftilfenilacilats són capaços de formar, a través del reordenament de foto-Fries, fins a 8 fotoproductes en dissolució. D'aquests, el majoritari és sempre l'*orto*- substituït amb un rendiment d'entre el 30 i el 60%. A l'interior de Y-CD (formant un complex sòlid), en canvi, el rendiment de l'*orto*-fotoproducte respecte al total de productes obtinguts és d'entre el 95 i el 98%. Això es deu, sobretot, a aquest efecte de protecció que la CD té sobre la posició *para*-.

Resultats igual d'espectaculars es troben en un altre treball de Ramamurthy *et al.* ^[12]. Aquesta vegada, la reacció és duta a terme amb substrats similars, però encapsulats a l'interior d'un cavitand i en medi aquós (Figura 3.2). La fotòlisi dels substrats a l'interior dels cavitands és comparada amb la fotòlisi en dissolució en hexà i en tampó aquós bàsic. De 9 possibles fotoproductes que apareixen en dissolució en hexà i d'un elevat percentatge de

† D'entre ells, el majoritari és l'*orto*-substituït que s'obté, segons el derivat, en una proporció d'entre el 30 i el 60% respecte al total dels fotoproductes.

producte d'hidròlisi que s'obté en la dissolució tampó², els fotoproductes obtinguts a l'interior del cavitand es redueixen exclusivament a un de sol: l'*orto*-substituit.

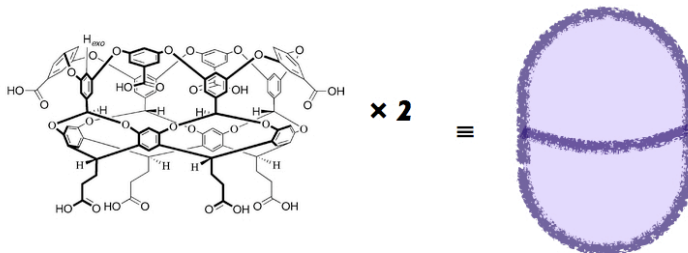


Figura 3.2. Cavitand utilitzat per Ramamurthy *et al.*[12] per a estudiar la reacció de foto-Fries en diversos substrats 1-naftilfenilacetilats.

El reordenament de foto-Fries també ha estat estudiat a l'interior de zeolites. Les zeolites resulten molt interessants com a amfitrions catalítics ja que, com s'ha comentat en capítols anteriors, són macromolècules molt versàtils amb les quals es pot aconseguir una alta selectivitat. Aquesta versatilitat es deu a diversos factors: la mida i estructura dels canals, els tipus de cations situats a les cavitats³, etc.[13] Referent a això, trobem a la bibliografia un exemple molt interessant en el qual s'estudia la reacció de foto-Fries d'1-naftilèsters incorporats a l'estructura de zeolites Y que contenen cations de diverses mides[14]. Aquestes zeolites es caracteritzen per tenir unes cavitats relativament grans (diàmetre ~12 Å). Els resultats mostren que els rendiments obtinguts per al fotoproducte *orto*-substituit augmenten d'un 60% en dissolució en metanol fins a un 94-98% en les diverses zeolites. Així doncs, s'incrementa la selectivitat d'una manera molt destacada.

En tot el treball s'analitzen els factors que condicionen la selectivitat d'aquesta reacció. D'una banda, es demostra que la mida del catió present a la zeolita influeix en el sistema, de manera que, com més gran és el catió, més selectiva és la reacció. Tot i això el factor decisiu no és la forma que la cavitat adquireix, sinó la mida, ja que aquesta és la que imposa restriccions a la mobilitat dels fragments radicals i és això el que condiciona la selectivitat[15]. Malgrat tot, aquesta grandària de la cavitat va lligada a la massa del catió. Pel que fa a això, és conegut que, com més pesant és el catió, més favorable és el creuament

² Tot i que el número total de fotoproductes obtinguts en dissolució tampó és significativament menor, el producte d'hidròlisi obtingut pot arribar a proporcions de fins al 70% de la distribució dels fotoproductes.

³ Tal com s'ha explicat al capítol 1, la zeolita és material porós compostat principalment per aluminosilicats que formen una xarxa aniònica. La càrrega d'aquesta xarxa és contrarestatada per cations que estan localitzats a l'interior de les cavitats sòlides o canals, però en cap cas reomplint-los. Aquests cations també juguen un paper fonamental en la funció de la zeolita com a catalitzador.

intersistema de l'estat excitat singlet al triplet^{16, 17}. I com que el reordenament de foto-Fries té lloc des del singlet, aquest augment de la mida del catió (i per tant de la seua massa) fa que, tot i que la selectivitat és major, la velocitat de la reacció siga menor.

Altres treballs mostren que la selectivitat també depèn de la interacció del catió de la zeolita amb el parell de radicals que intervenen en el reordenament de foto-Fries¹⁸. Aquesta característica pot fer, per exemple, que com a resultat del reordenament es forme majoritàriament el fotoproducte *para*-substituit¹⁹. Així doncs, tal com s'ha vist, la versatilitat i complexitat de les zeolites fa que siga una variada combinació de factors la que influeix en el resultat de la reacció.

En estudis més recents, s'han utilitzat dendrímers i nanobutxaques polimèriques com a medis de reacció. En el cas dels dendrímers²⁰, s'ha comprovat que aquests formen cavitats protectores orgàniques on pot tenir lloc la reacció de foto-Fries en medi aquós i bàsic sense que els substrats sofrisquen hidròlisi. En general, s'observa que la selectivitat de la reacció augmenta molt a l'interior dels dendrímers respecte a la dissolució en hexà, ja que la formació del fotoproducte *orto*-substituit passa de ser d'un 60% a ser d'entre el 85% i el 99%, depenent del dendrímer utilitzat. Això es deu al fet que el parell radical té una mobilitat reduïda a l'interior de la cavitat dendrítica i és més favorable la formació del fotoproducte en *orto*-.

En el cas dels polímers²¹, es tracta d'estructures amfifíliques que tenen una part hidrofílica (àcid carboxílic) i una part hidrofòbica polimèrica (en trobem un exemple en la Figura 3.3). En medi aquós adopten una conformació en la qual la part hidrofílica se situa propera al medi i la part hidrofòbica se situa a l'interior, de manera similar a una micel·la. L'estudi de la reacció de foto-Fries d'un parell de substrats en dissolució, en aquestes micel·les polimèriques i en micel·les més habituals (com són les formades per SDS, CTAB, SDO, etc.) mostren que la selectivitat per la formació del fotoproducte *orto*- augmenta d'un 60% en dissolució (hexà) a un 75-85% en diferents tipus de micel·les "habituals", fins a més d'un 99% en aquestes micel·les polimèriques.

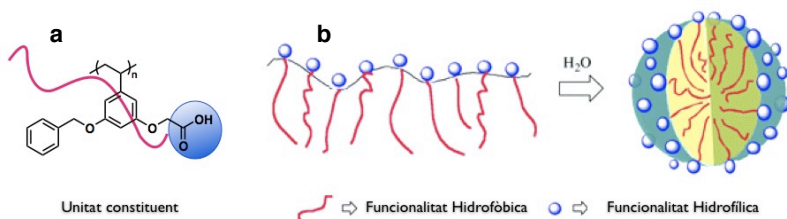


Figura 3.3. (a) Exemple de la unitat constituent del polímer amfifílic (b) Formació en medi aquós de la superestructura molecular on té lloc la reacció de foto-Fries²¹.

En aquests dos darrers casos, cal destacar també, a banda del remarcable augment en la selectivitat pel fotoproducte *orto*-substituït respecte a la dissolució en hexà, que les supramolècules utilitzades permeten treballar en dissolució aquosa en lloc de fer-ho amb dissolvents orgànics. En general, els substrats que permeten treballar directament en medi aquós solen donar un rendiment molt baix dels fotoproductes de reacció *orto*- i *para*-substituïts ja que en la majoria dels casos, el producte majoritari és el d'hidròlisi tèrmica^[20, 21]. Això, i el fet que l'únic reactiu a banda del substrat d'interès és la llum, fa que els residus de la reacció siguin mínims i que hom s'aproximi una vegada més al concepte de "química verda".

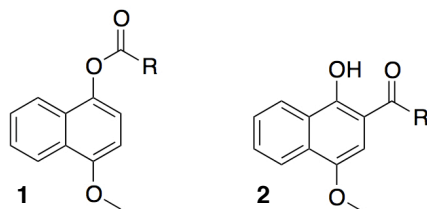
Així doncs, al llarg d'aquest apartat s'han esmentat nombrosos exemples que mostren que el fet d'utilitzar les entitats supramoleculares com a amfitrions de la reacció de foto-Fries, presenta un gran nombre d'avantatges respecte a quan la reacció té lloc en dissolució.

3.1.4. Objectius

S'ha observat que, a la bibliografia, els exemples que estudien la reacció de foto-Fries a l'interior de biomolècules són escassos. Atès que aquestes supramolècules presenten característiques i peculiaritats poc comunes, en aquest capítol s'ha volgut explotar això estudiant la reacció en presència de distintes albúmines sèriques. Per tal de fer-ho, calia dissenyar substrats apropiats perquè, d'un banda, foren capaços de donar foto-Fries i, de l'altra, tingueren afinitat pels diferents llocs d'unió de les proteïnes.

Com a tret diferencial respecte a altres entitats supramoleculares, en aquest treball s'ha volgut aprofitar el fet que les albúmines sèriques poden presentar diversos llocs d'unió per a substrats amb característiques molt diferents. Amb l'objectiu de remarcar aquesta propietat i els avantatges que pot suposar, es prestarà especial atenció a les diferències que els distints llocs d'unió aporten al sistema. En aquest sentit, s'utilitzaran tres tipus d'albúmines sèriques: humana i bovina (amb dos llocs d'unió) i de conill (amb un únic lloc d'unió).

3.2. DISSENY DELS SUBSTRATS DE FOTO-FRIES



a: R = CH₂CH₂COOH

b: R = CH₂CH₂CH₂COOH

c: R = CH₃

Esquema 3.2. Estructura dels substrats (**1a-c**) i dels fotoproductes corresponents (**2a-c**).

Se seleccionaren específicament els compostos **1a**, **1b** i **1c** per ser sintetitzats, ja que complien certs requeriments que es van considerar necessaris per al present estudi. Els requeriments van ser els següents:

- (1) Irradiació selectiva del substrat a una longitud d'ona (λ) on l'albúmina no absorbeix ($\lambda > 310$ nm). Per a això, es van fer servir derivats del naftalè.
- (2) Amb motiu de simplificar el sistema, es volgué reduir el nombre de fotoproductes obtinguts en la reacció. Per fer-ho, es col·locà un residu metoxi en la posició 4 del naftalè amb l'objectiu d'evitar la formació del fotoproducte *para*-substituit.
- (3) Afinitat per diferents llocs d'unió de l'albúmina. Per tal de variar l'afinitat del substrat per un o altre lloc d'unió, se sintetitzaren diferents substrats amb presència o absència d'un residu d'àcid carboxílic.

Els èsters **1a** i **1b** se sintetitzaren per mitjà de la reacció del 4-metoxi-1-naftol en medi bàsic amb l'anhidrid succínic i glutàric, respectivament [22]. La reacció d'aquest mateix naftol amb clorur d'acetil donava el compost **1c** [23]. Aquestes síntesis es descriuen detalladament en l'apartat 3.7 d'aquest capítol.

3.3. ESTUDIS PRELIMINARS DE DEGRADACIÓ DELS SUBSTRATS

3.3.1. Estudis preliminars del substrat **1a**

En un primer estadi, es va estudiar la degradació del substrat **1a** en la foscor, en dissolució de tampó fosfat (PBS), tant en presència com en absència d'albúmina sèrica bovina (BSA) i humana (HSA). S'observà que el compost en qüestió es descomposava

ràpidament en dissolució de PBS (Figura 3.4), tot i que es mantenia més estable en presència de les albúmines.

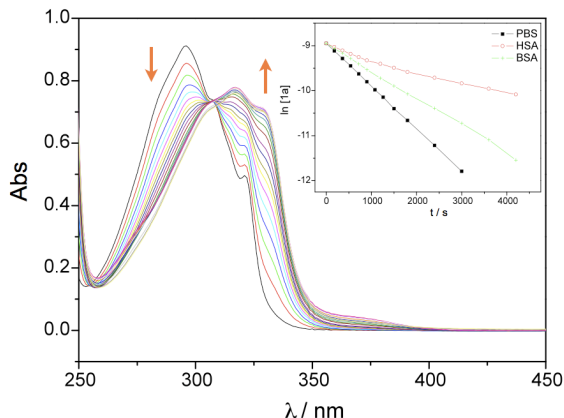
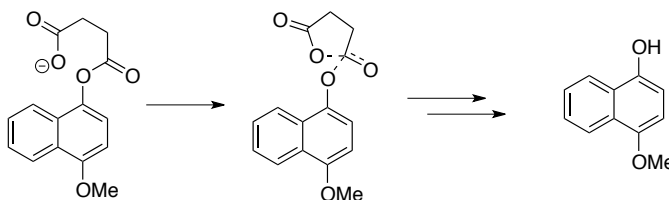


Figura 3.4. Descomposició a temperatura ambient de **1a** (1.4×10^{-4} M) en PBS (de 0 a 140 min). **Inserció:** representació semilogarítmica de la descomposició de **1a** front al temps, sota diferents condicions.

Aquest procés de descomposició tenia lloc en absència de llum i pot ser fàcilment atribuïble a la hidròlisi de l'èster. Això és perquè, tal com es descriu a la bibliografia^[22, 24], els èsters de succinat o maleat habitualment s'hidrolitzen mitjançant un procés catalític intramolecular en el qual intervé la formació d'un anell de 5 membres com a estat de transició (Esquema 3.3).



Esquema 3.3. Hidròlisi catalítica intramolecular que té lloc en el substrat **1a**.

El transcurs de la reacció de descomposició del substrat **1a** fou seguit mitjançant espectrofotometria d'absorció ultraviolada (UV) a través de la monitorització de la formació del 4-metoxi-1-naftol a 337 nm. La cinètica de la hidròlisi seguia un patró de primer ordre (Figura 3.4, inserció) amb unes constants de descomposició de $9.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $3.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $6.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ per a PBS, HSA i BSA respectivament. D'aquesta manera, després de 25 min el percentatge d'hidròlisi era del 70%, 25% i 50% en PBS, HSA i BSA. L'efecte estabilitzant de les proteïnes pot ser atribuït a la rigidesa de la cavitat d'unió. Aquesta reduiria la mobilitat

de la cadena succínica lateral i impediria així la formació de l'anell de 5 membres requerit per a la reacció intramolecular.

Després d'establir la reactivitat d'**1a** en la foscor, aquest compost fou irradiat a $\lambda = 321$ nm en PBS sol i en presència de HSA (amb ratio molar 1:1 respecte al substrat). Com a conseqüència de la irradiació, en PBS apareixia una nova banda amb un màxim a aproximadament 390 nm que fou assignada al producte de foto-Fries **2a** (per comparació amb el producte pur aïllat). S'observà, a més, la formació d'una altra banda al voltant de 600 nm (Figura 3.5a). En base a les anàlisis d'HPLC, s'assignà aquesta nova banda als subproductes derivats de l'oxidació del naftol. En medi HSA, en canvi, apareixia només la banda corresponent al fotoproducte de la reacció. Això és degut a que l'entorn confinat que la proteïna aporta, es protegeix parcialment **1a** de la hidròlisi catalítica intramolecular. D'aquesta manera s'evita la formació de certa proporció de naftol, millorant així les condicions experimentals per a un reordenament de foto-Fries més net (Figura 3.5b).

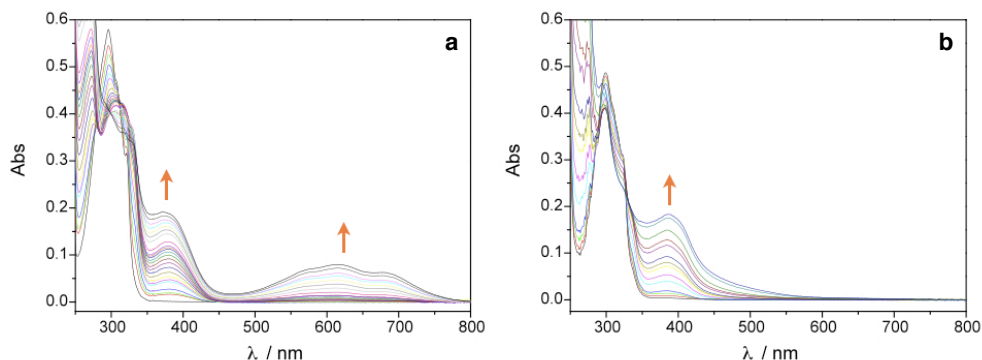


Figura 3.5. Irradiació a temperatura ambient d'**1a** en (a) PBS (1×10^{-4} M, fins a 35 min) i en (b) HSA (1×10^{-4} M, fins a 40 min).

Malgrat tot, en vista de les dificultats experimentals que comportava aquesta hidròlisi intramolecular, es descartà el substrat **1a** per a estudiar-hi més a fons la reacció de foto-Fries. No obstant això, amb aquests experiments preliminars ja s'observà l'efecte protector i, per tant, estabilitzant que aporta la proteïna.

3.3.2. Estudis preliminars dels substrat **1b** i **1c**

A causa de les dificultats que s'observaren en el compost **1a**, mitjançant el procediment anterior es comprovà que en la foscor els compostos **1b** i **1c** romanien estables. De fet, en aquest cas, s'obtingué que, al cap de 200 minuts, s'havia degradat

menys del 2% de la mostra. En el cas del substrat **1b** això es deu al fet que, com que la cadena lateral és més llarga, s'impedeix la formació de l'anell de 5 membres a través del qual es catalitza la hidròlisi intramolecular (Esquema 3.3). Així doncs, amb aquests substrats es va poder estudiar més a fons el reordenament de foto-Fries sense cap dificultat afegida.

3.4. INTERACCIÓ DELS SUBSTRATS AMB DISTINTES ALBÚMINES

3.4.1. Determinació de l'estequiometria dels complexos

En primer lloc, s'investigà sobre la interacció del substrat i les proteïnes amb tècniques espectroscòpiques. Així, s'observà que la presència de proteïna provocava un desplaçament batocròmic (λ més llargues, és a dir, cap al roig) en l'absorbància i un decreixement d'aquesta centrat a 327 nm. Aprofitant aquest canvi espectroscòpic, es pogué determinar l'estequiometria dels complexos substrat@albúmina mitjançant el mètode de Job de la variació contínua^[25]. Aquest mètode consisteix a mesurar els canvis en l'absorbància d'un sistema en què es va variant de 0 fins a 1 la fracció molar de l'albúmina respecte al substrat i en el qual la concentració total (**1b** o **1c** + proteïna) es manté constant (1.0×10^{-4} M en el cas d'**1b** i 1.2×10^{-4} M en el cas d'**1c**). Aquests canvis es representaren front a la fracció molar de proteïna i s'obtingueren els gràfics que s'observen en la Figura 3.6. Com que les corbes resultants han quedat centrades a una fracció molar de 0.5, es pot dir que els complexos formats d'**1b** i **1c** amb les proteïnes tenien, en tots els casos, una estequiometria 1:1.

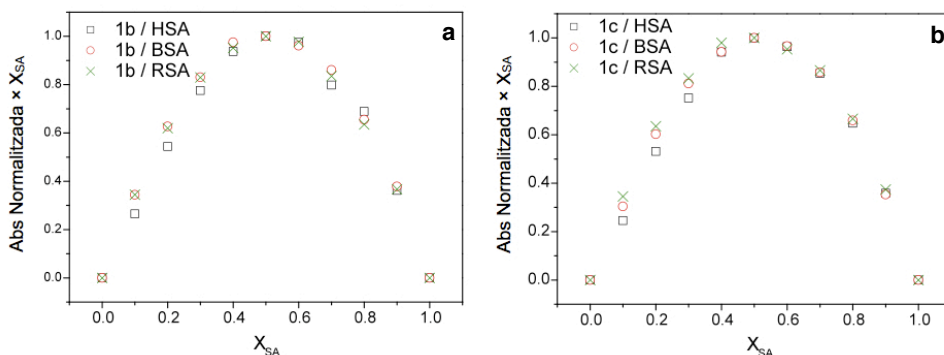
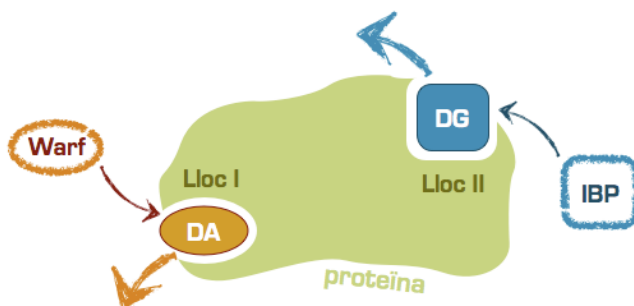


Figura 3.6. Corbes de Job per als complexos de les diverses proteïnes (HSA, BSA i RSA) amb (a) **1b** i (b) **1c**.

3.4.2. Determinació de les constants i del lloc d'unió dels substrats

Una vegada establida l'estequiometria dels complexos, es determinà, d'una banda, el lloc d'unió que cada substrat ocupava en cada proteïna i, de l'altra, es calcularen les constants d'unió dels complexos per a cada cas. Per fer això s'utilitzaren sondes fluorescentes que tenien una afinitat específica per un lloc concret de la proteïna. En aquest cas, es va utilitzar la dansilamida (DA) com a sonda per al lloc d'unió I i la dansilglicina (DG) com a sonda per al lloc II. Aquestes sondes tenen la particularitat que, quan estan unides a la proteïna, tenen una fluorescència molt més alta que quan no ho estan. Aquesta propietat es pot aprofitar per tal de conèixer el lloc d'unió d'altres substrats no fluorescentes, tal com s'explicarà a continuació.

Primerament, es dissenyà un experiment control. Aquest consistiria a unir cadascun dels dansils (D) amb la proteïna sèrica (SA) per tal d'obtenir així el complex D@SA. Per a cada combinació de dansils i proteïna, el sistema tindria una fluorescència determinada. A continuació, s'afegiria al sistema una sonda no fluorescent (almenys a la λ d'excitació) i específica per a un lloc d'unió determinat; s'utilitzaria warfarina per al lloc I i (S)-ibuprofén ((S)-IBP) per al lloc II^[26]. Per tant, en el cas de DA@SA+warfarina, s'esperaria que la warfarina desplaçara la DA fora de la proteïna (Esquema 3.4) i la fluorescència del sistema disminuïra. En el cas de DG@SA+(S)-IBP s'esperaria que l'(S)-IBP desplaçara la DG del complex DG@SA (Esquema 3.4) i la fluorescència disminuïra també. Així doncs, en anar afegint equivalents de les respectives sondes als complexos D@SA, s'obtidria un perfil decreixent d'intensitat de fluorescència, el pendent del qual donaria una mesura relativa de la unió entre la warfarina o l'(S)-IBP i la SA.



Esquema 3.4. Desplaçaments dels dansils DA i DG dels llocs I i II de la proteïna per part de la warfarina i l'IBP, respectivament

Si es feren experiments anàlegs substituint warfarina i/o (S)-IBP per altres substrats, es podrien esbrinar diverses coses. D'una banda, es coneixeria el lloc d'unió del

nou substrat, depenent de si aquest fóra capaç de desplaçar la DA o la DG del complex amb la SA. De l'altra, si es compararen els pendents de decreixement de la fluorescència provocats pel nou substrat amb les de l'experiment control, com que es coneixen les constants d'unió d'ambdós "ligands control" (warfarina i (S)-IBP) a les proteïnes, es podria esbrinar també la constant d'unió del nou substrat a la proteïna.

A continuació s'exposaran els resultats obtinguts per a l'experiment control. Així doncs, per a la HSA, la irradiació selectiva dels dansils a 350 nm donava un espectre d'emissió de fluorescència centrat a 492 nm en el cas de la DA i 475 nm en el cas de la DG. En la Figura 3.7a s'observen els canvis en la fluorescència després de l'addició de distints equivalents d'(S)-ibuprofén ((S)-IBP) o warfarina. Tal com s'esperava per a un lligand del lloc II, l'addició d'(S)-IBP al sistema DG@HSA va provocar una disminució de la intensitat d'emissió. De la mateixa manera, per al sistema DA@HSA s'observà un comportament similar amb l'addició de warfarina com a agent desplaçant.

Per tal de contemplar totes les combinacions possibles, es comprovaren també les opcions creuades (Figura 3.7a). Així doncs, per a la combinació DG@HSA+warfarina s'observen només canvis marginals en l'emissió, cosa que s'explica per què la DG localitzada en el lloc II a penes es veu influïda pel lligand del lloc I (warfarina). Per al cas DA@HSA+(S)-IBP s'observà un cert increment de fluorescència. Això s'explica per què pot donar-se un efecte alostèric, ja que la unió de l'(S)-IBP amb l'albumina en el lloc II pot modificar la interacció de la DA en el lloc I i, en aquest cas, produir un augment de l'emissió. Exemples similars d'efectes alostèrics poden trobar-se en la bibliografia [27].

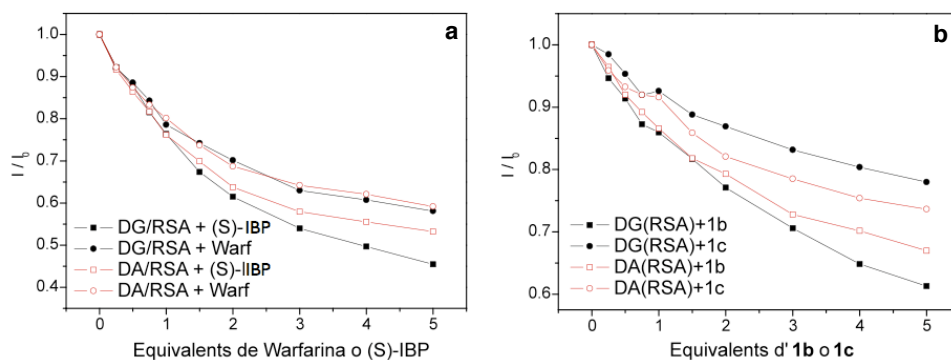


Figura 3.7. (a) Intensitat de fluorescència relativa observada per als sistemes dansil@HSA (4×10^{-5} M, 1/1 proporció molar) a $\lambda_{em} = 492$ nm per a DA@HSA i 475 nm per a DG@HSA, després d'afegir-hi (S)-IBP i Warfarina. **(b)** Resultats per als experiments anàlegs utilitzant els substrats **1b** i **1c** com a agents desplaçants.

La mateixa metodologia va ser aplicada utilitzant **1b** i **1c** com a agents desplaçants de DG i DA (Figura 3.7b). Els canvis en la fluorescència dels sistemes DG@HSA o DA@HSA en presència de **1b** eren comparables als observats per a (S)-IBP; de la mateixa manera, les propietats de desplaçaments d'**1c** eren similars a les de la warfarina. Així doncs, es va concloure que els substrats **1b** i **1c** estaven localitzats en el lloc II i I de la HSA, respectivament.

Seguint aquest mateix patró explicat, es va determinar també el lloc d'unió de cadascun dels substrats **1b** i **1c** en BSA i RSA. En la primera, es van obtenir uns resultats similars que els presentats per a HSA, de manera que **1b** i **1c** també es localitzaven en els llocs II i I de la BSA, fet esperable ja que són llocs d'unió similars per a ambdues albúmines. En RSA, en canvi, ambdós dansils són desplaçats del lloc d'unió de la proteïna tant per (S)-IBP com per warfarina, cosa que assenyala la presència de només un sol lloc d'unió (Figura 3.8a). De la mateixa manera, tant **1b** com **1c** desplacen ambdós dansils del complex amb la proteïna (Figura 3.8b).

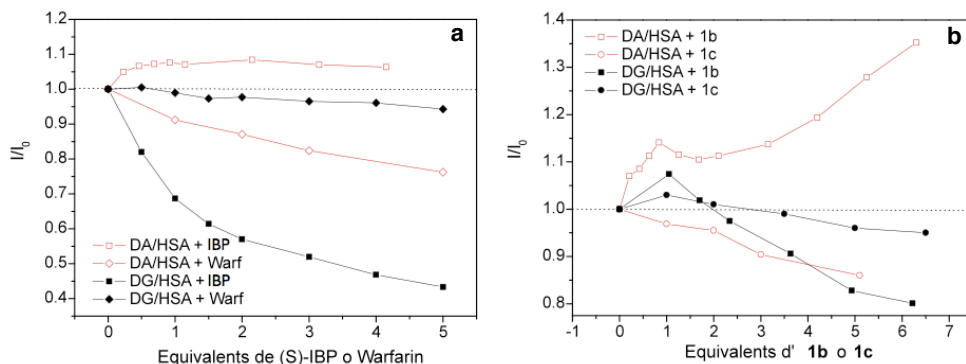


Figura 3.8. (a) Intensitat de fluorescència relativa observada per als sistemes dansil@RSA (4×10^{-5} M, 1/1 proporció molar) a $\lambda_{em} = 505$ nm per a ambdós derivats de dansil, després d'afegir-hi (S)-IBP i Warfarina. (b) Resultats per als experiments anàlegs utilitzant els substrats **1b** i **1c** com a agents desplaçants.

Amb aquests experiments es calcularen també les constants d'unió dels substrats **1b** i **1c** amb les proteïnes. Com que de la bibliografia es coneixen les constants d'unió de la warfarina (3.3×10^5 M $^{-1}$) i de l'(S)-IBP (2.7×10^6 M $^{-1}$)^[28], aquestes s'utilitzaren per a obtenir, tal com s'ha explicat anteriorment, les constants d'unió (K) dels substrats de foto-Fries a les proteïnes. A continuació es presenta una taula amb els valors obtinguts (Taula 3.1).

Proteïna	K(1b) / M ⁻¹	K(1c) / M ⁻¹
HSA	6.0 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁵
BSA	6.8 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁵
RSA	1.0 × 10 ⁵	8.6 × 10 ⁴

Taula 3.1. Constants d'unió calculades dels substrats **1b** i **1c** amb cadascuna de les proteïnes

3.5. REACCIÓ DE FOTO-FRIES EN DISTINTES ALBÚMINES SÈRIQUES

3.5.1. Determinació dels rendiments quàntics de la reacció

Després d'establir els paràmetres d'unió substrat@proteïna es va estudiar el reordenament de foto-Fries en presència de les albúmines HSA, BSA i RSA i es van comparar aquests estudis amb el que succeïa en dissolució de PBS i ACN. Per fer això, s'irradiaren monocromàticament ($\lambda = 321\text{nm}$) els substrats **1b** i **1c** en presència de cadascuna de les proteïnes (en una proporció molar 1:1); el substrat **1b** s'irradià també en PBS (no així l'**1c**, ja que no era soluble). Es monitoritzà la cinètica de foto-Fries mitjançant l'enregistrament d'espectres d'absorció, atès que els productes de partida **1** i els fotoproductes **2** presentaven diferències característiques en els seus espectres. Cal destacar que, en dissolució de PBS, s'obtenia una ampla banda d'absorció amb un màxim al voltant de 600 nm (Figura 3.9a) que es corresponia amb els productes d'oxidació del naftol (que és subproducte de la fotoreacció). Això no passava en les proteïnes, on la reacció era més neta (en la inserció de la Figura 3.9a en tenim una prova per a la reacció en HSA).

Per mitjà del seguiment de la cinètica de la reacció per espectroscopia ultraviolada (UV) d'absorció (Figura 3.9b) es determinaren també els rendiments quàntics de formació (Φ_R) de **2b** i **2c** en els diferents medis, utilitzant *N*-metildifenilamina com a actinòmetre (Taula 3.2). Dels resultats obtinguts es podia extraure, d'una banda, que la presència d'HSA afectava significativament la formació del fotoproducte. Per exemple, en el cas de **2b**, el rendiment quàntic de la reacció en HSA era un 37% del valor en PBS i un 31% del valor en ACN. Pel que fa a **2c**, en canvi, el rendiment quàntic en HSA era similar a l'obtingut en ACN ($\Phi_R = 0.14$), però no es va poder comparar amb el de PBS ja que, en aquest medi, **1c** presentava una baixa solubilitat i no es va poder fer la mesura. En comparar ambdós rendiments en HSA, es podia observar que la reacció era 2.3 vegades més eficient per a la

formació de **2c** que de **2b** (Taula 3.2). Això, tenint en compte que els substrats **1b** i **1c** es localitzaven en llocs diferents de l'albumina, implicava que el reordenament de foto-Fries tenia una dependència marcada del lloc d'unió de la proteïna on succeïa la reacció.

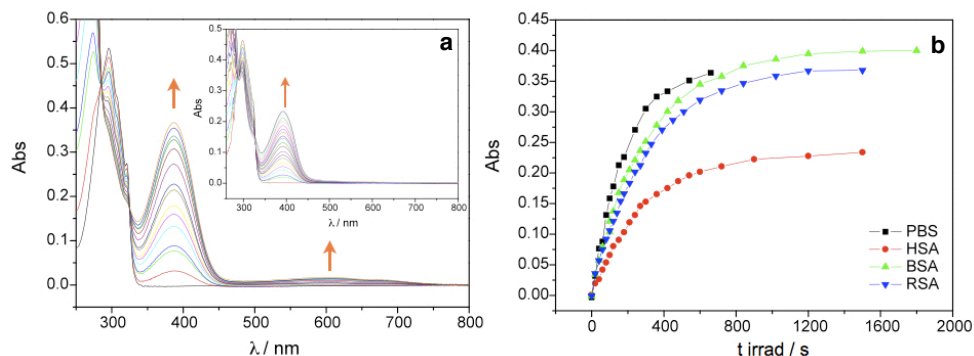


Figura 3.9. Espectres d'absorbància del compost **1b** irradiat amb llum monocromàtica a 321 nm en (a) PBS (de 0 a 11 minuts, 8.6×10^{-5} M) i (a - inserció) en HSA (de 0 a 25 minuts, 8.3×10^{-5} M). (b) Canvis en l'absorbància que mostren la formació del fotoproducte **2b** en PBS ($\lambda_{\max} = 387$ nm), HSA ($\lambda_{\max} = 392$ nm), BSA ($\lambda_{\max} = 397$ nm), RSA ($\lambda_{\max} = 394$ nm)

Pel que fa a l'estudi de la reacció en BSA, s'observà igualment una dependència del lloc d'unió. Tot i això, aquesta vegada la dependència era menor ja que la reacció era 1.5 vegades més eficient per a **2b** que per a **2c**. D'aquesta diferència amb HSA es podia deduir que, tot i que ambdues proteïnes tenen grans similituds estructurals, la fotoreacció depenia de l'espècie de proteïna que es considera. En RSA el rendiments quàntics obtinguts per a **2b** i per a **2c** eren iguals, cosa que correlacionava bé amb els resultats anteriors que mostraven que **1b** i **1c** s'unien a un mateix lloc en aquesta proteïna.

Medi	$\Phi_R(2b)$	$\Phi_R(2c)$	$\Phi_R(2c) / \Phi_R(2b)$
ACN	0.19	0.14	0.74
PBS	0.16	N.D. ^a	N.D. ^a
HSA	0.06	0.14	2.3
BSA	0.12	0.18	1.5
RSA	0.09	0.09	1

Taula 3.2. Rendiments quàntics (Φ_R) de formació de **2b** i **2c** en diferents medis de reacció. ^a En PBS no es va poder determinar el Φ_R de **2c** perquè el substrat **1c** no era soluble.

3.5.2. Determinació dels rendiments de la reacció per a **1b** en PBS i HSA

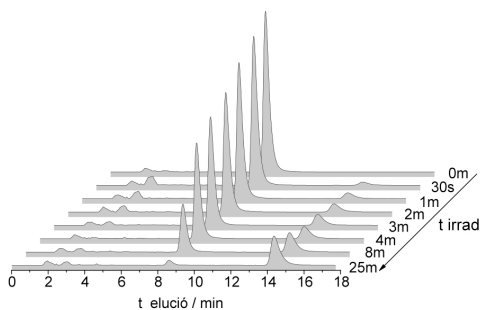


Figura 3.10. Traces d'HPLC obtingudes durant la irradiació monocromàtica ($\lambda = 321 \text{ nm}$) d'**1b** ($1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$) en presència d'HSA. $\lambda_{\text{detecció}} = 254 \text{ nm}$

Mitjançant la tècnica d'HPLC es van determinar els percentatges de conversió i els rendiments de la reacció de foto-Fries per al substrat **1b** tant en PBS com en HSA. Per raons de sensibilitat, s'utilitzaren dissolucions més concentrades ($1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$). Els cromatogrames obtinguts foren enregistrats a $\lambda = 240 \text{ nm}$ (Figura 3.10, exemple d'**1b** irradiat en presència de HSA) i aquests mostraven que, tant en presència com en

absència de proteïna, el fotoproducte majoritari obtingut era l'*orto*-substituït. En la Figura 3.11, s'observa que la conversió a **2b** fou més ràpida en PBS i s'arribà a un rendiment del 50%. Per contra, la degradació fou més lenta en presència de HSA i BSA amb uns rendiments totals del 40% i del 70% respectivament. Així doncs, es pot dir que la proteïna BSA proporcionava un bon entorn per a la reorganització de foto-Fries, cosa que permetia millorar la selectivitat de la reacció respecte la dissolució de PBS. Pel que fa a la formació de **2b** en els diferents medis respecte al temps d'irradiació, els ratios obtinguts en els diferents pendents inicials de la Figura 3.11b es corresponien bé amb els rendiments quàntics presentats en la Taula 3.2.

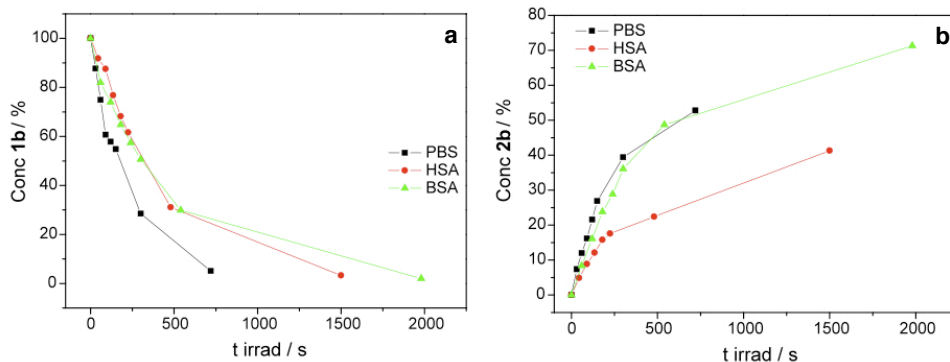


Figura 3.11. (a) Percentatge de degradació del compost **1b** irradiat amb llum monocromàtica a 321 nm ($1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$) en PBS, HSA i BSA. (b) Cinètica de formació del fotoproducte **2b** en PBS, HSA i BSA. Ambdues cinètiques s'extrauen del seguiment per HPLC de la reacció.

3.6. CONCLUSIONS

El reordenament de foto-Fries és una reacció ben coneguda que pot ser utilitzada com a sonda dels microentorns que proporcionen els llocs d'unió de les proteïnes. Aquest fotoreordenament s'ha estudiat a l'interior d'albúmines sèriques de diferents espècies (humana, bovina i de conill) i amb distints substrats que tenen afinitat per als diferents llocs d'unió de les proteïnes. S'ha demostrat que l'eficiència de la reacció depèn de quin és el lloc d'unió de la proteïna pel qual el substrat té més afinitat. Així doncs, l'eficiència ha resultat ser major quan el substrat té afinitat pel lloc d'unió I de l'albumina sèrica, lloc on predominen les interaccions de tipus hidrofòbic. Un avantatge pràctic d'això és que la reacció de foto-Fries intraproteïca pot ser convenient per treballar en medi aquós si es tenen com a substrats arilèsters d'escassa solubilitat. A més, també s'ha obtingut una eficiència major per a l'albumina sèrica bovina.

3.7. PART EXPERIMENTAL

3.7.1. Síntesi dels naftils èsters

Per a la síntesi dels compostos **1a** i **1b**^[22] es va dissoldre 4-metoxi-1-naftol (2.5 mmol) en una solució aquosa d'hidròxid sòdic freda i submergida en gel (2.5 mmol en 50 mL). Després es va afegir l'anhidrid succínic o glutàric (2.5 mmol) i la mescla va ser agitada durant 5 minuts i acidificada amb àcid clorhídric fins a pH = 3. El precipitat resultant va ser filtrat, assecat i recristallitzat amb tolué.

Hidrogensuccinat de 4-metoxi-1-naftil (1a). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.26 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.04 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 6.5 Hz, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 174.7, 172.5, 153.7, 140.2, 127.7, 126.8, 126.2, 125.5, 122.0, 121.1, 117.8, 102.8, 55.0, 28.9, 28.6. HRMS-ES⁺: calculat per C₁₅H₁₄O₅: 274.0841; trobat: 274.0852.

Hidrogenlutarat de 4-metoxi-1-naftil (1b). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.29 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.16 (d, 1H, J = 8.29 Hz), 6.79 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 2.86 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.62 (t, 7.4 Hz, 2H), 2.21 (m, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃, 75 Hz): δ 177.7, 171.8, 153.5, 139.8, 127.4, 127.0, 126.2, 125.7, 122.5, 120.8, 117.7, 102.8, 55.7, 33.1, 32.7, 19.9;. HRMS-ES⁺: calculat per C₁₆H₁₆O₅ [M + H⁺]: 288.0988; trobat: 288.0990.

Per a la síntesi d'**1c**^[23] es tractà 4-metoxi-1-naftol (4.5 mmol) amb clorur d'acetil en excés en medi àcid i acetonitril com a dissolvent. La barreja s'agità durant 2h a temperatura ambient i es portà a reflux durant 1h. El producte es rotavaporà, es redissolgué en acetat d'etil, es rentà amb aigua bicarbonatada i s'assecà amb sulfat de magnesi anhidre. Després de filtrar el sulfat de magnesi, el solvent es destil·là al buit i es purificà per cromatografia de columna amb sílica *flash* utilitzant com a eluent una mescla de dissolvents que contenia el 80% d'hexà i el 20% d'acetat d'etil.

3.7.2. Síntesi, separació i caracterització dels fotoproductes.

Per a la síntesi dels fotoproductes **2a** i **2b**, es van dissoldre aproximadament 1 mg de compost en 500 mL d'acetat d'etil i es va irradiar amb el fotoreactor Rayonet utilitzant 8 làmpares de $\lambda_{exc}=300$ nm. Es va separar el fotoproducte per HPLC utilitzant una columna semipreparativa Kromasil 100 C18 (1 × 25 cm, 5 μ M) amb un fluxe d'1 mL/min utilitzant una barreja de 70% d'acetonitril i 30% d'aigua àcida (pH=3). Sota aquestes condicions, el fotoproducte s'aïllava al voltant dels 25 minuts.

Àcid 4-(1-hidroxi-4-metoxi-2-naftil)-4-oxobutanoic (2a). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.35 (m, 1H), 8.15 (m, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): $\delta = 206.2, 177.3, 157.9, 149.3, 131.8, 131.0, 128.0, 127.4, 125.4, 123.3, 113.3, 101.86, 56.6, 35.2, 29.4$. HRMS-ES⁺: calculat per C₁₅H₁₅O₅ [M + H⁺]: 275.0919; trobat: 275.0929.

Àcid 5-(1-hidroxi-4-metoxi-2-naftil)-4-oxopentanoic (2b). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.42 (m, 1H), 8.39 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.10 (m, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): $\delta = 205.7, 175.5, 156.3, 147.3, 129.9, 129.1, 126.0, 125.6, 123.6, 121.4, 111.4, 100.2, 54.7, 33.3, 32.4, 19.4$. HRMS-ES⁺: calculat per C₁₆H₁₇O₅ [M + H⁺]: 289.1076; trobat: 289.1077.

Per al càlcul de les cinètiques amb perfil de concentració, va ser necessari calcular el coeficient d'extinció molar del fotoproducte **2b** en cadascun dels medis utilitzats. Els valors foren: $\epsilon = 5700 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (en PBS a 387 nm), $5200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (en HSA a 393 nm), $5900 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (en BSA a 397 nm), $6000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (en RSA a 392 nm).

3.7.3. Equipament: Absorció, emissió i sistemes de fotoirradiació.

L'equipament específic per a realitzar les mesures d'absorbància i de fluorescència es detalla en el capítol 6 en l'apartat 6.1.1. Per a les irradiacions preparatives s'utilitzà un fotoreactor multilàmpada les especificitats del qual estan indicades en l'apartat 6.1.4. Les característiques del sistema d'irradiació monocromàtica es detallen en el punt 6.1.3.

3.7.4. Cinètiques de degradació i de fotòlisi d'1a.

La reacció d'hidròlisi del compost **1a** (1.7×10^{-4} M) en dissolucions acabades de preparar de PBS (0.1 mM, pH = 7.4) i HSA (amb una relació molar d'1:1) va ser monitoritzada per espectroscopia d'absorció UV-Vis a 337 nm a 298 K. Els coeficients d'extinció molar de 3050 i 4300 $M^{-1} \times cm^{-1}$ van ser calculats i considerats per calcular la concentració del 4-metoxi-1-naftol en PBS i HSA, respectivament. En tots els casos es van obtenir cinètiques de primer ordre.

Per a les proves de fotòlisi d'1a (1.0×10^{-4} M) es van irradiar amb llum monocromàtica de $\lambda = 321$ nm (amb una escletxa amb un ample de banda de 2.5 nm) dissolucions acabades de preparar del substrat en PBS i HSA (amb relació molar 1:1 respecte al substrat) i es va monitoritzar la fotòlisi mitjançant la realització d'espectres d'absorció UV-Vis.

3.7.5. Rendiments quàntics de reacció i cinètiques de degradació d'1b i 1c.

Per tal de dur a terme les cinètiques de fotòlisi de les mostres es van preparar dissolucions d'1b en PBS i d'1b i 1c en ACN, HSA i BSA (aproximadament 80 μ M) i de *N*-metildifenilamina (aproximadament 160 μ M) en metilciclohexà (que té un rendiment quàntic de 0.42 a temperatura ambient i sota condicions de saturació en aire^[29]) en cubetes de quars de 10 \times 10 mm. Les absorbàncies s'ajustaren a $\lambda = 321$ nm (aproximadament a una absorbància de 0.35), longitud d'ona a la qual es va dur a terme la irradiació, monocromàticament i amb una escletxa amb ample de banda de 2.5 nm.

La cinètica de formació del fotoproducte en PBS es va obtenir seguint l'absorbància del sistema a 387 nm al llarg del temps d'irradiació. També es van preparar dissolucions d'1b i 1c (aproximadament 80 μ M) amb les proteïnes (HSA, BSA i RSA) fent servir una relació molar 1:1 respecte al substrat. En aquest cas es va obtenir la cinètica del

sistema seguint l'absorbància a 393 nm, 397 nm o 392 nm en HSA, BSA o RSA, respectivament. Per tal de poder calcular els rendiments quàntics, es va utilitzar com a actinòmetre *N*-metildifenilamina en metilciclohexà [29, 30].

3.7.6. Tractament de mostra per a calcular els rendiments de reacció d'1b.

Tal com s'explicava en l'apartat corresponent, els rendiments de la reacció de foto-Fries en els diferents medis es calculen a partir de les cinètiques de la reacció controlades per HPLC. D'aquesta manera, es pot conèixer la conversió de la mostra i traduir-ho així en rendiment.

Així doncs, diverses dissolucions d'1b (d'una concentració d' 1.7×10^{-4} M tant en absència com en presència de proteïna) van ser irradiades monocromàticament a una longitud d'ona de 321 nm durant diversos temps d'irradiació per tal d'obtenir una cinètica. Després del tractament pertinent (especificat en l'apartat 6.2 del capítol 6 d'aquesta tesi) s'injectaren les mostres irradiades al cromatògraf de líquids i amb les dades que proporcionaren els cromatogrames resultants es calcularen els rendiments de la reacció.

Per a l'anàlisi per HPLC s'utilitzà una columna Kromasil 100 C18 (0.4 × 25 cm, 5 μM) un fluxe d'1 mL/min d'una barreja de 50% d'acetonitril i 50% d'aigua àcida (pH=3).

3.8. BIBLIOGRAFIA

- [1] M. A. Miranda, F. Galindo, in *Molecular and Supramolecular Photochemistry, Vol. 9*, Marcel Dekker, **2003**, pp. 43.
- [2] M. A. Miranda, F. Galindo, in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed., CRC Press LLC, **2004**, pp. 42/1.
- [3] K. G. Davenport, in *EP251552A2*, **1988**.
- [4] A. Commarieu, W. Hoelderich, J. A. Laffitte, M. P. Dupont, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2002**, *182*, 137.
- [5] S. Koodanjeri, A. R. Pradhan, L. S. Kaanumalle, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 3207.
- [6] R. Q. Xie, Y. C. Liu, X. G. Lei, *Research on Chemical Intermediates* **1992**, *18*, 61.
- [7] H. S. Banu, K. Pitchumani, C. Srinivasan, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9601.
- [8] M. S. Syamala, B. N. Rao, V. Ramamurthy, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7234.
- [9] A. V. Veglia, A. M. Sanchez, R. H. de Rossi, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 4083.
- [10] A. V. Veglia, R. H. de Rossi, *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 4941.
- [11] D. R. Corbin, D. F. Eaton, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 4848.
- [12] L. S. Kaanumalle, C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, V. Ramamurthy, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 236.
- [13] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd, **2009**.
- [14] K. Pitchumani, M. Warriar, C. Cui, R. G. Weiss, V. Ramamurthy, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6251.
- [15] V. Ramamurthy, D. R. Corbin, D. F. Eaton, N. J. Turro, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 5833.
- [16] V. Ramamurthy, J. V. Caspar, D. R. Corbin, B. D. Schlyer, A. H. Maki, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 3391.
- [17] B. Borecka, A. D. Gudmundsdottir, G. Olovsson, V. Ramamurthy, J. R. Scheffer, J. Trotter, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 10322.
- [18] M. A. Hepp, V. Ramamurthy, D. R. Corbin, C. Dybowski, *Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 2629.

- [19] K. Pitchumani, M. Warriar, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9428.
- [20] L. S. Kaanumalle, J. Nithyanandhan, M. Pattabiraman, N. Jayaraman, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8999.
- [21] S. Arumugam, D. R. Vutukuri, S. Thayumanavan, V. Ramamurthy, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13200.
- [22] E. Gaetjens, H. Morawetz, *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 5328.
- [23] R. W. Stoughton, *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57*, 202.
- [24] G. O. Andres, A. B. Pierini, R. H. de Rossi, *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 7650.
- [25] C. Y. Huang, *Methods in Enzymology* **1982**, *87*, 509.
- [26] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Molecular Pharmacology* **1976**, *12*, 1052.
- [27] D. E. Epps, T. J. Raub, F. J. Kezdy, *Analytical Biochemistry* **1995**, *227*, 342.
- [28] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1607.
- [29] E. W. Foerster, K. H. Grellmann, H. Linschitz, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 3108.
- [30] M. Yamaji, C. Paris, M. A. Miranda, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *209*, 153.

4. Derivats d'avobenzona en albúmina sèrica

4.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

4.1.1. Els filtres solars i l'avobenzona

La radiació solar ultraviolada pot tenir efectes adversos sobre la pell tant a curt termini (cremades) com a llarg termini (fotoenvelliment cutani, fotocarcinogènesi, etc.). Això és perquè la radiació UV pot arribar a perjudicar de manera dràstica la cèl·lula i les funcions dels teixits^[1-8] (danys sobre membranes cel·lulars, danys sobre proteïnes, etc). Així doncs, pot desencadenar-se el que es coneix com *fitodermatosi*, que comprén un conjunt de malalties de la pell originades a causa de la irradiació solar^[8]. Aquestes malalties es classifiquen bàsicament en quatre grups: fitodermatosi mediades immunològicament, fotosensibilitat induïda per agents químics i fàrmacs, fitodermatosi degudes a reparacions deficientes de l'ADN i fitodermatosi agravades.

Així doncs, és important protegir la pell d'aquesta radiació per evitar tots aquests efectes. Per fer-ho, sovint s'utilitzen filtres solars. Un filtre solar, per complir la seua funció, ha de tenir unes determinades característiques. D'una banda, ha de tenir un gran potencial per absorbir llum UV, cosa que en la pràctica es tradueix en un elevat coeficient d'extinció molar en la zona de l'UV. A més, també necessita que el seu espectre d'absorció en la zona UV siga ampli, de manera que pugui cobrir tota la zona de l'UVA (400 nm - 320 nm), de l'UVB (320 nm - 280 nm) o ambdues zones (en aquest darrer cas es parlaria d'un filtre d'ampli espectre). Per últim, el filtre solar quan absorbeix llum UV i s'excita, ha de ser capaç de tornar a l'estat fonamental mitjançant processos no radiatius (Esquema 4.1) ja que els estat excitats d'aquests filtres podrien interaccionar amb els components de la pell i fer així de mediadors en processos de fototoxicitat i/o fotoal·lèrgia i/o donar lloc a la fotodegradació del filtre. No obstant això, si aquests estats excitats tornen a l'estat fonamental per mitjà de mecanismes no radiants, es poden evitar tots aquests processos i, com a conseqüència, el filtre és, d'una banda, segur per a la pell, i de l'altra, com que en relaxar-se es torna a tenir la molècula en estat fonamental, és estable i pot tornar a començar el cicle (Esquema 4.1) ^[9].



Esquema 4.1. Funcionament general d'un filtre solar.

L'avobenzona (*tert*-butilmetoxidibenzoilmetà, també coneguda com Parsol 1987, etc. i abreviada **AB**) és un filtre que protegeix de la radiació solar en la zona de l'UVA de l'espectre i és un dels filtres més utilitzats en la formulació de protectors solars^[10]. En dissolució i en estat fonamental, l'**AB** està en forma d'equilibri entre una dicetona i el seu corresponent enol quelat (Figura 4.1a), de manera que, en general, la forma enòlica és predominant respecte de la dicetònica^[11]. Tal com es mostra en la Figura 4.1b, la forma enòlica té una banda intensa d'absorció en la zona UVA (amb un màxim al voltant de 355 nm i un $\epsilon = 32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[12]) mentre que la forma cetònica absorbeix en la zona UVB (màxim al voltant de 260 nm i ϵ moderadament menor^[12]).

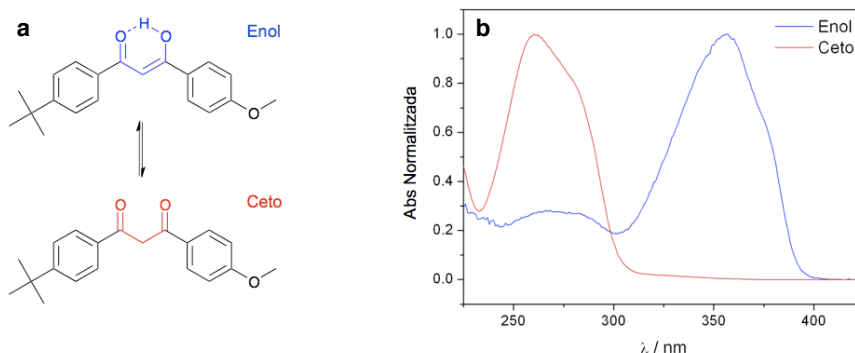
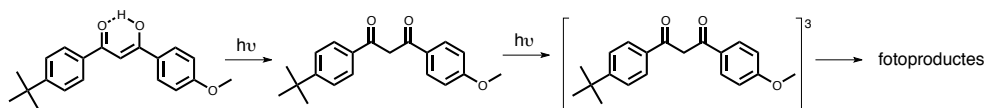


Figura 4.1. (a) Esquema de l'equilibri ceto-enòlic de l'**AB**. (b) Espectres d'absorbància normalitzats de la forma cetònica i enòlica de l'**AB**

4.1.2. Estabilitat de l'avobenzona i fotodegradació. La forma dicetònica

Tot i que l'avobenzona és un filtre molt utilitzat, no és del tot fotoestable. En essència, la degradació de l'avobenzona consisteix en el fet que, al sotmetre-la a irradiació en la zona UVA, es dona una fotoisomerització a la forma dicetònica (Esquema 4.2). Aquest tautòmer dicetònic és, de fet, l'agent fotoactiu que dona lloc a la fotodegradació ja que, des del seu triplet, es produeix una reacció de Norrish tipus I. A partir d'aquesta, es desencadenen processos que formen, de manera irreversible, distints fotoproductes estables tals com àcid benzoic, benzaldehids, acetofenones, benzils i arilglioxals^[13, 14] (Esquema 4.2). Aquesta descomposició fa que, d'una banda, les propietats de fotoprotecció de l'avobenzona es perden^[15] i, de l'altra, que puguen causar efectes de fototoxicitat i/o fotoal·lèrgia^[16].



Esquema 4.2. Mecanisme de fotodegradació de l'avobenzona.

La fotoquímica de l'avobenzona és complexa i moltes vegades difícil d'entendre ja que, a banda de l'equilibri ceto-enòlic, també té lloc la presència de tautòmers i rotàmers de la forma enòlica que posseeixen distintes propietats i poden intervenir també en l'equilibri ceto-enòlic^[11, 13, 17, 18]. Malgrat tota aquesta complexitat, en aquest treball es vol emfatitzar la rellevància de la forma dicetònica, a causa de les conseqüències negatives que comporta, com s'ha explicat anteriorment^[13-16].

En el nostre grup s'han estudiat alguns exemples en els quals s'ha blocat la forma dicetònica de l'avobenzona, cosa que permet estudiar la fotoquímica d'aquest tautòmer de manera aïllada^[12, 15]. D'aquesta manera, és possible estudiar -sense interferències dels altres tautòmers i rotàmers- els possibles efectes adversos que aquest tautòmer dicetònic pot tindre. D'aquests treballs s'obtenen resultats molt interessants. D'una banda, l'estudi de la forma dicetònica metil·lada de l'avobenzona^[15] (**MeAB** en l'Esquema 4.3) permet definir el triplet d'aquest tautòmer. Aquest, quan interacciona amb l'avobenzona enòlica en estat fonamental, és capaç de formar el triplet d'aquesta darrera (per transferència d'energia T-T) i, a partir d'aquest, es poden generar processos secundaris no desitjats per a un filtre solar. A més, el triplet de l'avobenzona dicetònica pot generar ¹O₂ que, a la vegada, és capaç de degradar l'avobenzona enòlica i això, com s'ha vist, portaria irreversiblement a la formació de diversos fotoproductes. Finalment, aquest triplet dicetònic pot interaccionar amb diversos nucleòsids i aminoàcids, de manera que resulta perjudicial quan entra en contacte amb certs medis biològics.

En un altre treball del grup^[12] s'ha estudiat també l'avobenzona funcionalitzada amb un propil, de manera que queda fixada també la forma dicetònica (**PrAB** en l'Esquema 4.3). En l'estudi es demostra que el caràcter del triplet és n,π* i que, a partir d'aquest, té lloc una reacció de Norrish tipus II en la qual s'obté avobenzona com a producte final. Així doncs, es pot considerar que el **PrAB** és capaç d'actuar com a profiltre.

Es tracta, doncs, de diferents comportaments de la forma dicetònica de l'avobenzona que donen lloc a triplets estables, formació d' ¹O₂ i reaccions secundàries que en cap cas són propietats desitjables per a un filtre solar.

4.1.3. Antecedents: avobenzona en sistemes supramoleculars

En la bibliografia s'han trobat alguns exemples en els quals s'estudia l'avobenzona a l'interior de sistemes supramoleculars, tot i que no existeixen estudis similars de la forma dicetònica blocada.

Gran part dels estudis han investigat el comportament de l'avobenzona en presència de ciclodextrines (CDs). Les CDs, en essència, són oligosacàrids cíclics i s'han utilitzat sovint en la formulació de productes farmacèutics per tal d'alterar la solubilitat, estabilitat i biodisponibilitat d'alguns fàrmacs^[19]. Estudis fets amb avobenzona mostren que aquesta és capaç de complexar-se amb les CDs. Atés que la solubilitat en aigua de la molècula és molt limitada, la complexació amb CD fa que siga més apta per a l'ús tòpic. Així doncs, la inclusió de les CDs com a complexants de l'avobenzona en formulació de filtres solars augmenta la impregnació del filtre en la pell, i millora així l'efecte fotoprotector. A més, aquesta complexació disminueix la fotodescomposició del filtre, cosa que augmenta també la capacitat de fotoprotecció^[20-23].

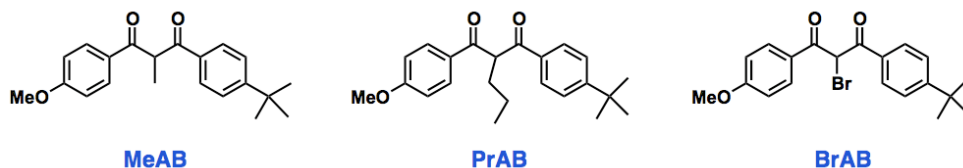
A banda d'això, també s'han trobat força patents referents a l'encapsulació de l'avobenzona en aquestes ciclodextrines^[24-27] però també en liposomes^[28, 29], microcàpsules de sol-gel^[30, 31], resines^[32-34], etc. Això mostra que l'encapsulació de l'avobenzona a l'interior de diversos tipus d'estructures supramoleculars és factible d'utilitzar-se en la formulació real de filtres solars ja que, en general, milloren l'estabilitat i les propietats dels filtres.

4.1.4. Objectius

El present treball ha centrat l'interés en la influència que l'albumina sèrica humana té sobre les propietats fotoquímiques i fotofísiques de les β -dicetones.

D'una banda, s'ha volgut estudiar una vegada més l'interés de la proteïna com a sistema supramolecular. De l'altra, s'ha volgut aplicar aquest estudi a l'efecte concret que la proteïna té en diferents derivats de l'avobenzona. El motiu és que, com s'ha vist, aquesta molècula, en la seua forma enòlica, presenta un interés especial degut al seu ús com a filtre solar. No obstant això, s'han considerat certs derivats que presenten l'avobenzona en la seua forma β -dicetònica, ja que és aquest tautòmer el que pot provocar problemes de fototoxicitat i/o fotoal·lèrgia. Així doncs, es pretén investigar com es comporten aquests derivats en medis biològics confinats i quin efecte té la proteïna sobre les propietats (negatives i positives des del punt de vista de fotoprotecció) d'aquests.

Per tal d'assolir aquest propòsit, doncs, s'han estudiat tres derivats diferents d'avobenzona funcionalitzats en la posició α . D'aquesta manera, la conformació de dicetona queda fixada i se'n poden estudiar, separadament de la forma enòlica, les seues propietats i els seus efectes en presència de la proteïna. Els tres derivats que s'han estudiat: la **MeAB** (1,1-(4-*tert*-butilbenzoil)-(4'-metoxibenzoil)età), la **PrAB** (1,1-(4-*tert*-butilbenzoil)-(4'-metoxibenzoil)butà) i la **BrAB** (4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilbromometà) (Esquema 4.3).



Esquema 4.3. Derivats dicetònics utilitzats en el present estudi.

Tal com s'ha comentat a l'apartat 4.1.2, certes característiques que la **MeAB** i la **PrAB** presenten en dissolució s'han estudiat ja en anteriors treballs del grup^[12, 15]. La **BrAB**, però, és un substrat nou; per això, abans de fer res més, es va realitzar un estudi de caracterització d'aquesta molècula en dissolució. Seguidament, a partir del comportament fotoquímic i fotofísic de tots tres substrats en dissolució, es va estudiar com la presència de la proteïna influïa en aquests i també en les reaccions fotoquímiques que podien tindre lloc.

4.2. CARACTERITZACIÓ DE **BrAB** EN DISSOLUCIÓ

4.2.1. Propietats d'emissió i d'absorció de **BrAB**

Tal com s'observa en la Figura 4.2, el substrat **BrAB** presentava la típica banda d'absorció de la forma dicetònica dels dibenzoilmetans amb un màxim al voltant de 260-270 nm^[12]. No s'observava cap emissió de fluorescència en ACN a 295 K. No obstant això, es va enregistrar un espectre de fosforescència del substrat en EtOH i a 77 K amb un màxim centrat a 440 nm en el qual s'observava l'estructura vibracional de l'estat excitat. Es va determinar l'energia del triplet més baix (E_T) que va resultar ser de 68.3 kcal·mol⁻¹ des de l'origen 0-0 de l'espectre de fosforescència. Així doncs, les dades espectroscòpiques obtingudes eren similars a les descrites prèviament per als compostos **MeAB** i **PrAB** (Taula 4.1) ^[12, 15].

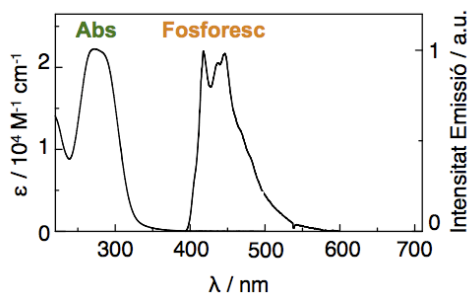


Figura 4.2. Espectres d'absorbància i fosforescència de **BrAB** en ACN a 295 K i en EtOH a 77 K, respectivament

Compost	λ_{\max} / nm	ϵ / $M^{-1} \times cm^{-1}$	E_T / kcal $\times mol^{-1}$
MeAB	260	21000 ^{a,b}	70.7 ^{a,b}
PrAB	269	26900 ^b	70.7 ^b
BrAB	270	22100	68.3

^a Dades de la ref. 15. ^b Dades de la ref. 12.

Taula 4.1. Propietats fotofísiques dels derivats dicetònics de l'avobenzona

4.2.2. Fotòlisi de flaix làser de BrAB

Per tal d'investigar els intermedis de reacció generats per fotòlisi de la **BrAB** en dissolució, es va realitzar un estudi de fotòlisi de flaix làser utilitzant un làser excímer de Xe/Cl polsat, amb una $\lambda_{exc} = 308$ nm. Com a resultat, es va observar un màxim d'absorbància a 370 nm corresponent a una espècie transitòria (Figura 4.3a). El decaïment corresponent mostrarà una cinètica de primer ordre amb un temps de vida de 70 μs , sota atmosfera de nitrogen. Aquest espectre d'absorció transitòria s'ha atribuït al radical de l'avobenzona (**ABR**), que s'hauria produït a causa de la desbromació de la **BrAB** en l'estat excitat.

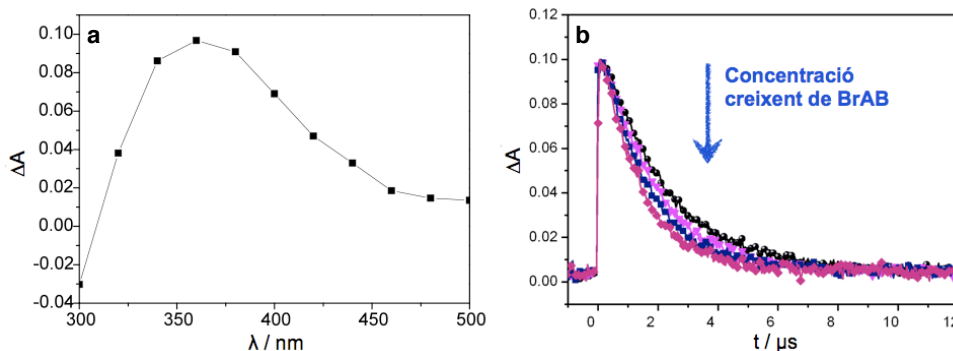


Figura 4.3. (a) Espectre d'absorció transitòria de **BrAB** obtingut per fotòlisi de flaix làser a $\lambda_{exc} = 308$ nm, en ACN, 3 μs després del pols del làser **(b)** Perfils cinètics de l'absorció triplet-triplet de la xantona, monitoritzats a 612 nm en presència de quantitats creixents de **BrAB** (de 0 a 1.6×10^{-5} M)

Per caracteritzar de manera més extensa les espècies excites de la **BrAB**, es va utilitzar el triplet de la xantona com a fotosensibilitzador. El que s'esperava era que, en

excitar la xantona amb el làser, s'obtinguera el triplet d'aquesta. Si s'afegira **BrAB** a aquest sistema, s'esperava la formació de $^3\text{BrAB}$ a través d'una transferència d'energia triplet-triplet, de manera que el triplet de la xantona es desactivaria. Així doncs, es va realitzar un experiment de desactivació del triplet de la xantona mitjançant la **BrAB**. La desactivació va resultar ser eficient (Figura 4.3b) amb una constant de l'ordre de la de difusió ($k_q \sim 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$). No obstant això, en desactivar el triplet de la xantona, no es van detectar noves espècies transitòries. És a dir, no es va veure el senyal del $^3\text{BrAB}$ que s'esperava. Això podia ser a causa de que el temps de vida d'aquest triplet era massa curt per poder ser detectat amb el nostre sistema de fotòlisi de flaix làser, o de que el seu coeficient d'extinció molar era molt baix o de totes dues coses.

En aquest experiment de fotosensibilització del $^3\text{BrAB}$ es pot destacar, a més, que no s'observa el senyal de l'espècie **ABR** (amb un espectre com el que es veu en la Figura 4.3a i un temps de vida llarg de 70 μs en ACN). Com que en excitar directament la **BrAB** amb el làser sí que s'observa aquesta espècie (veure Figura 4.3a), aquest fet suggereix que el procés de fotodeshalogenació que té lloc per fotòlisi directa de la **BrAB** es produeix a partir de l'estat excitat singlet, i no del triplet.

Per últim, amb l'objectiu d'acabar de caracteritzar el $^3\text{BrAB}$, es va realitzar un experiment de fotòlisi de flaix làser a $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$ i a baixa temperatura. Per fer-ho es va mesurar una dissolució de **BrAB** en una matriu d'EtOH a 77 K. Com a resultat, es va obtenir un espectre transitori amb un màxim al voltant dels 400 nm (Figura 4.4), que es va assignar al $^3\text{BrAB}$ per comparació amb el senyal d'absorbància T-T d'altres derivats dicetònics.

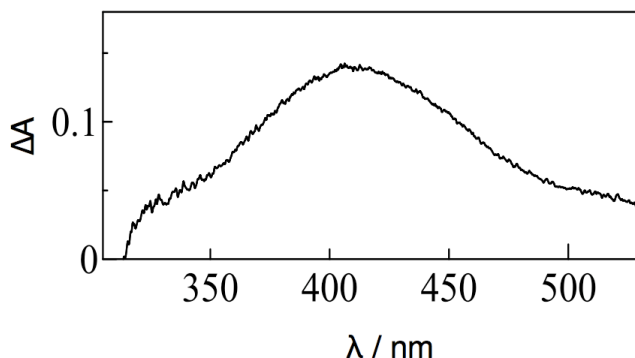


Figura 4.4. Espectre d'absorció transitori de **BrAB** obtingut per fotòlisi de flaix làser a $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$, en EtOH a 77 K, 100 ns després del pols del làser

4.3. INTERACCIÓ DE MeAB, PrAB i BrAB AMB ALBÚMINA SÈRICA HUMANA

Es prepararen dissolucions de **MeAB**, **PrAB** i **BrAB** en presència d'HSA amb una proporció molar 1:1 i en atmosfera d'aire i es mesuraren mitjançant fotòlisi de flaix làser a 308 nm. Els resultats obtinguts es compararen amb els resultats que aquests derivats d'**AB** donaven en dissolucions d'ACN (també sota atmosfera d'aire), ja que la solubilitat dels compostos en PBS era molt limitada.

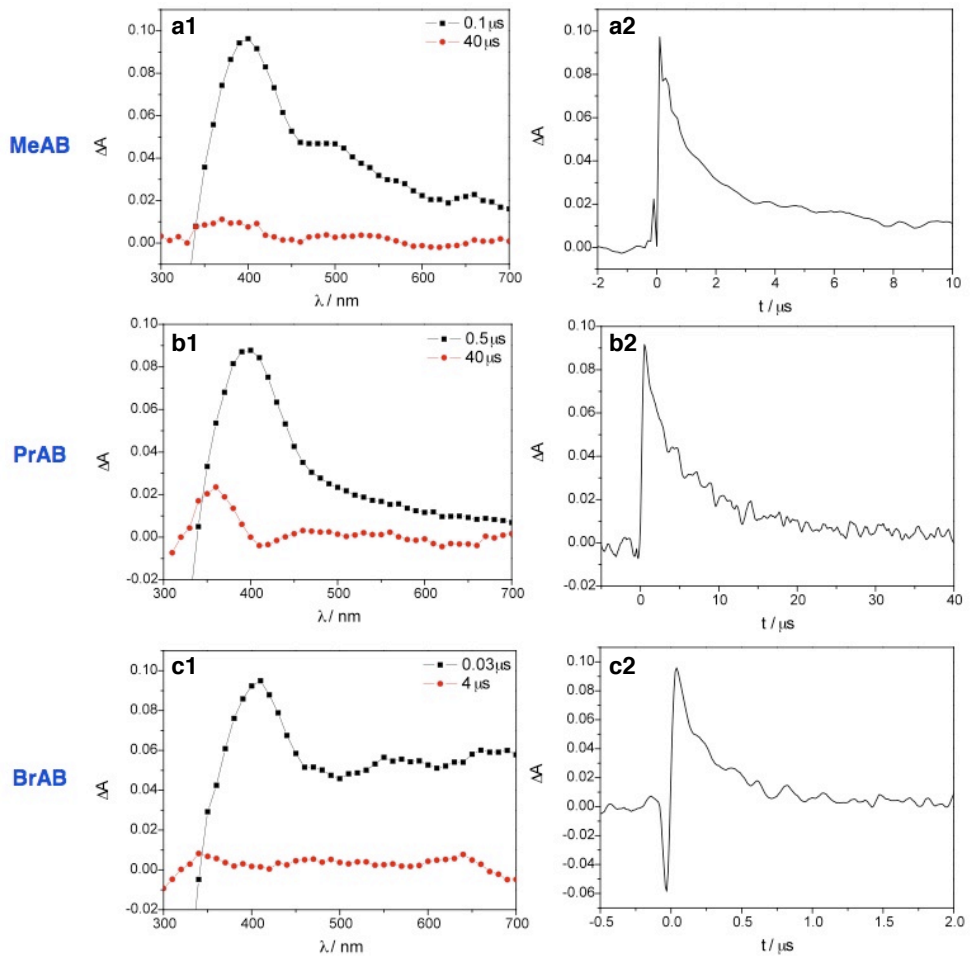


Figura 4.5. Espectres d'absorció transitoria de **(a1) MeAB** (2.8×10^{-4} M), **(b1) PrAB** (2.5×10^{-4} M), **(c1) BrAB** (3.8×10^{-5} M) en PBS i en presència de HSA (relació molar 1:1) després del pols del làser de 308 nm. Decaiments temporals corresponents de **(a2) MeAB**, **(b2) PrAB** i **(c2) BrAB** monitoritzats a 400 nm.

Pel que fa als espectres d'absorció transitòria, s'observa que els obtinguts per als compostos **MeAB**, i **PrAB** en presència d'HSA són similars. En ambdós casos es va detectar l'estat excitat triplet de la forma dicetònica de l'avobenzona (corresponent a la banda centrada al voltant dels 400 nm de la Figura 4.5 a1 i b1). A més, tal com s'havia observat també en dissolució d'acetonitril, el ³**PrAB** donava lloc a la formació d'una banda d'absorció centrada a 350 nm que va ser atribuïda a l'espècie **AB**. Així doncs, es pot deduir que a partir del ³**PrAB** es produïa una reacció de Norrish tipus II que acabava formant avobenzona (Figura 4.5 b1). En canvi, en el decaïment dels triplets dels altres dos compostos ³**MeAB** i ³**BrAB** no es va detectar la formació de cap altre intermedi.

Una altra observació important és que els perfils cinètics de decaïment de les espècies transitòries de tots tres compostos eren més lents quan l'HSA estava present (Taula 4.2, Figures 4.5 a2, b2 i c2). Aquests resultats estaven en concordança amb el ja conegut efecte de protecció que la HSA presenta front a l'autodesactivació (en anglès *self-quenching*) i front a l'atac de l'oxigen^[35-37]. Així doncs, l'HSA estabilitza els estats excitats triplets de **MeAB**, **BrAB** i **PrAB**.

Compost	$\tau_{ACN} / \mu s$	$\tau_{HSA} / \mu s$	Relació τ_{ACN} / τ_{HSA}
³ MeAB	0.13	2.4	18
³ PrAB	0.14	6.0	43
³ BrAB	<i>N.D.</i>	0.3	-

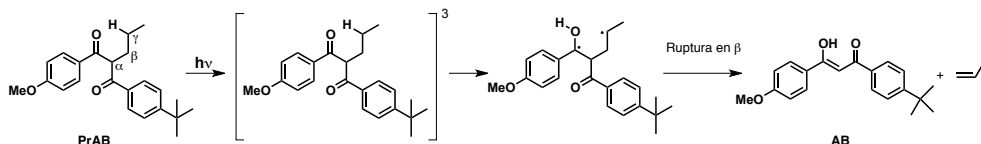
Taula 4.2. Temps de vida de l'estat excitat triplet dels compostos **MeAB**, **PrAB** i **BrAB** en presència d'HSA i en dissolució d'acetonitril (ACN). Relació entre ambdós temps de vida.

És interessant el fet que en el cas de la **BrAB** es van observar diferents fenòmens quan es comparava el compost en dissolució d'acetonitril i en presència de proteïna. En albúmina serica, s'obtingué una espècie transitòria amb un màxim d'absorció al voltant dels 400 nm i un temps de vida molt curt (Taula 4.2, Figura 4.5 c2). Aquest senyal es corresponia a l'espectre d'absorció transitòria triplet-triplet de la **BrAB** (Figura 4.5 c1). Per contra, aquest ³**BrAB** no es va poder detectar en dissolució a temperatura ambient. Les úniques condicions en les quals es va poder enregistrar el triplet en dissolució van ser en EtOH cristal·litzat a 77 K (Figura 4.4). Aquests fets demostren que un microentorn confinat

com el de la proteïna produeixen efectes similars als d'una matriu rígida com pot ser un dissolvent cristal·litzat a baixa temperatura.

4.4. FOTOQUÍMICA DE PrAB UNIDA A PROTEÏNA. NORRISH II

Després d'investigar el comportament fotofísic dels derivats de l'avobenzona en presència d'HSA, es va voler estudiar l'efecte de la proteïna en la fotoreactivitat d'aquests compostos. Per fer-ho, es va prendre com a model la reacció de Norrish tipus II observada per al compost **PrAB**, ja que es tractava d'una reacció neta (no ho era tant la fotodegradació dels altres derivats **MeAB** i **BrAB**) i fàcil de monitoritzar a través dels canvis espectroscòpics a la zona de l'UV. A l'Esquema 4.4 es descriu la reacció Norrish tipus II del substrat.



Esquema 4.4. Fotoreacció de Norrish tipus II per a la **PrAB**.

Així doncs, es van realitzar cinètiques d'irradiació monocromàtica ($\lambda_{irr} = 305 \text{ nm}$) en dissolucions de **PrAB** tant en acetonitril com en presència d'HSA (relació molar 1:1). Aquestes cinètiques es van seguir per espectroscopia d'absorció UV. Tal com es mostra en la Figura 4.6a, es produïa un decreixement de la banda d'absorció de la **PrAB** de 260 nm en ambdós medis concomitant amb la formació d'una nova banda centrada a 357 nm; aquesta darrera banda es va assignar a la forma enòlica de l'avobenzona^[12]. Així doncs, si es comparaven les cinètiques de formació de l'avobenzona en ambdós medis (Figura 4.6b), s'observava que la fotoreacció de Norrish tipus II per a la **PrAB** era significativament més lenta en presència de la proteïna. Això és consistent, d'una banda, amb els rendiments quàntics de formació d'avobenzona obtinguts (ϕ_R , calculats utilitzant la *N*-metildifenilamina com a actinòmetre). El rendiment era 2.8 vegades més petit en proteïna que en acetonitril ($\phi_R = 1.4 \times 10^{-2}$ i 3.9×10^{-2} per a HSA i acetonitril, respectivament). A més, aquests ϕ_R es correlacionaven bé amb el fet que el temps de vida del ³PrAB fóra més llarg quan el compost estava complexat amb la proteïna: en ser més llarg el triplet, és més estable i, per tant, reacciona menys.

Així doncs, sembla que la conformació requerida per a l'abstracció intramolecular de l'hidrogen γ a partir de l'estat excitat del carbonil (Norrish II; veure Esquema 4.4) està desafavorida en el medi confinat proporcionat per l'HSA. No obstant això, és interessant destacar que, després de llargs temps d'irradiació, els rendiments d'avobenzona formada (al voltant del 50%) acaben sent molt similars tant en proteïna com en dissolució d'acetonitril (Figura 4.6b). És a dir, que en proteïna la reacció tarda més a produir-se, però arriba a donar-se en unes proporcions similars que en dissolució.

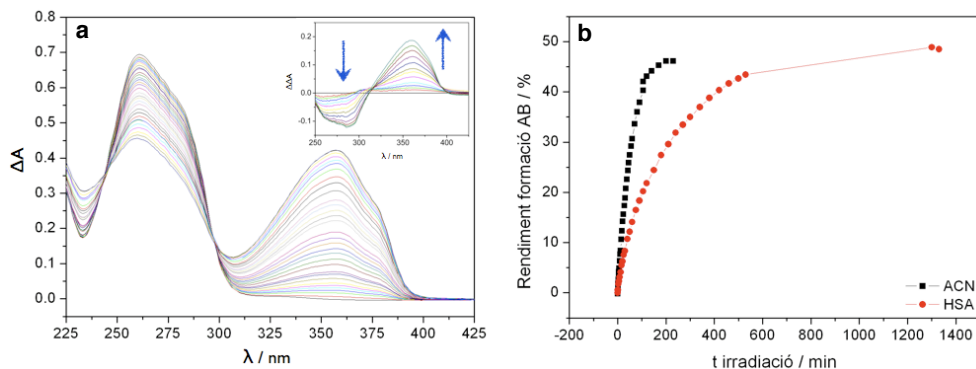


Figura 4.6. (a) Seguiment per espectroscopia d'absorbància UV de la fotoreacció de Norrish tipus II per a la **PrAB** en ACN (2.85×10^{-5} M) irradiada amb llum monocromàtica ($\lambda = 305$ nm) fins a 230 minuts. **Inserció:** Diferència respecte a l'espectre inicial sense irradiar que mostra la variació d'absorbància al llarg del temps d'irradiació (b) Rendiments de formació de l'**AB** determinats a partir dels canvis d'absorció (seguits a $\lambda = 357$ nm) provocats per la irradiació monocromàtica de la **PrAB** en ACN i en HSA (relació molar 1:1).

Cal esmentar en aquest punt que ha estat comprovat per HPLC que l'únic fotoproducte format a l'irradiar la **PrAB** és l'avobenzona, tant en ACN com en proteïna. Això reafirma definitivament que l'única fotoreacció possible que es dona en aquest cas és la Norrish tipus II.

4.5. CONCLUSIONS

En aquest treball, tres derivats d'avobenzona han estat considerats per tal d'investigar la influència de l'HSA en el seu comportament. Des d'un punt de vista fotofísic, l'increment del temps de vida de l'estat excitat triplet de la **PrAB** i la **MeAB** reflecteix l'efecte protector que proporciona la cavitat de la proteïna. Un altre resultat interessant és la detecció de l'estat excitat triplet de la **BrAB** que, en absència d'HSA, només era observat en matrius de dissolvents a baixa temperatura. Així doncs, el medi confinat que confereix la

proteïna és similar a aquest efecte matriu. Des del punt de vista fotoquímic, el resultat més remarcable és la diferent fotoreactivitat que presenta la **PrAB** en la reacció de Norrish tipus II quan el compost està complexat amb proteïna respecte al compost en dissolució. Aquesta diferència és probablement deguda a les restriccions conformacionals que confereix l'HSA.

4.6. PART EXPERIMENTAL

4.6.1. Emissió, absorció, fotòlisi de flaix làser i sistemes d'irradiació

Les mesures d'absorbància i la major part de les mesures de fotòlisi de flaix làser van ser enregistrades utilitzant els equips que es descriuen en el capítol 6 (apartats 6.1.1 i 6.1.2). Els espectres d'emissió de fosforescència van ser mesurats en un espectrofotòmetre de fluorescència Hitachi F-4010.

Pel que fa a la fotòlisi de flaix làser es va utilitzar, a més, un segon sistema per registrar espectres d'absorció transitòria de **BrAB** en EtOH i a 77 K. La font de llum d'excitació del làser es va obtenir del quart harmònic (266 nm) d'un làser de Nd³⁺: YAG (JK Lasers HY-500; amplada de pols de 8 ns). Més característiques del sistema de detecció s'han detallat en altres treballs^[38]. Els espectres d'absorció transitòria es van mesurar amb un sistema USM-554 d'Unisoku, el qual és capaç d'obtenir un espectre d'absorció transitòria amb un sol pols de làser.

Totes les mostres de les quals es va mesurar l'absorció transitòria van ser preparades en la foscor. Les dissolucions d'HSA amb els derivats de l'avobenzona (relació molar 1:1) van ser preparades en PBS i equilibrades també en la foscor durant 1h. A més, es va comprovar que, en tots els casos en què les proteïnes estaven presents al medi, aquestes no donaven senyal d'absorció transitòria per elles mateixes.

A banda, la fotòlisi en estat estacionari es va dur a terme utilitzant un sistema d'irradiació monocromàtic com el que es descriu a l'apartat 6.1.3 del capítol 6 a una longitud d'ona d'irradiació de 305 nm.

4.6.2. Desactivació de l'estat excitat triplet de la xantona per la **BrAB**

Es va preparar una dissolució de xantona en acetonitril sota atmosfera d'argó, amb una absorbància de ~ 0.3 a $\lambda_{exc} = 308$ nm (làser Xe/HCl). Es va utilitzar una dissolució mare de **BrAB** de la qual es van afegir petites alíquotes a la dissolució de xantona per tal

d'obtenir les concentracions apropiades de desactivador (de 0 a 1.6×10^{-5} M). La constant de desactivació del triplet de la xantona (màxim d'absorció transitòria a 612 nm) va ser obtinguda a partir d'un ajust seguint l'equació de Stern-Volmer (Equació 4.1).

$$k_{obs} = k_o + k_q \times [Q] \qquad \text{Equació 4.1}$$

En aquesta equació k_{obs} i k_o són les constants de decaïment del triplet en presència i en absència de desactivador en unitats de s^{-1} , k_q és la constant de desactivació en $M^{-1} \times s^{-1}$ i $[Q]$ és la concentració de desactivador en M.

4.6.3. Cinètiques de fotodegradació de PrAB

Utilitzant cubetes de quars de 10 mm \times 10 mm es van preparar dissolucions sota atmosfera d'aire de **PrAB** en acetonitril (2.85×10^{-5} M) i en PBS en presència d'HSA (relació molar 1:1 amb el compost). La irradiació es va dur a terme sota llum monocromàtica a 305 nm amb un ample de banda de les esclatxes de llum de 2.5 nm. La cinètica de formació del fotoproducte va ser obtinguda ajustant l'absorbància a 375 nm front al temps d'irradiació. Per tal d'obtenir el perfil cinètic de concentracions, es van calcular els coeficients d'absorció molar de l'avobenzona a $\lambda = 359$ nm que van ser de $32200 M^{-1} \times cm^{-1}$ i de $18500 M^{-1} \times cm^{-1}$ per a acetonitril i HSA, respectivament.

El flux de fotons incident sobre la mostra (a 305 nm) va ser determinat utilitzant *N*-metildifenilamina en metilciclohexà com a actinòmetre químic. El rendiment quàntic per a la formació de *N*-metilcarbazol a partir de la *N*-metildifenilamina havia estat establert en 0.42^[39]. El procediment per determinar els rendiments quàntics a partir dels canvis d'absorbància va ser el mateix que el descrit a la bibliografia^[40]. Totes les mostres van ser preparades en la foscor i a l'interior de les cubetes de quars utilitzades per a les mesures.

4.7. BIBLIOGRAFIA

- [1] H. Soehnge, A. Ouhtit, H. N. Ananthaswamy, *Frontiers in Bioscience* **1997**, *2*, D538.
- [2] R. J. H. Davies, *Biochemical Society Transactions* **1995**, *23*, 407.
- [3] J. Moan, M. J. Peak, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1989**, *4*, 21.
- [4] J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *Comprehensive Series in Photosciences* **2001**, *3*, 207.
- [5] B. A. Gilchrest, M. S. Eller, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **1999**, *4*, 35.
- [6] G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees, *Nature* **1996**, *379*, 335.
- [7] J. E. Cleaver, E. Crowley, *Frontiers in Bioscience* **2002**, *7*, D1024.
- [8] Z. D. Draelos, H. W. Lim, A. Rougier, in *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection, Vol. 43*, Informa Healthcare, **2009**, pp. 83.
- [9] H. W. Lim, Z. D. Draelos, Editors, *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection, Vol. 43*, Informa Healthcare, **2009**.
- [10] F. P. Gasparro, M. Mitchnick, J. F. Nash, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *68*, 243.
- [11] A. Cantrell, D. J. McGarvey, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2001**, *64*, 117.
- [12] M. Yamaji, C. Paris, M. A. Miranda, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *209*, 153.
- [13] W. Schwack, T. Rudolph, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1995**, *28*, 229.
- [14] N. M. Roscher, M. K. O. Lindemann, S. Bin Kong, C. G. Cho, P. Jiang, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1994**, *80*, 417.
- [15] C. Paris, V. Lhiaubet-Vallet, O. Jimenez, C. Trullas, M. A. Miranda, *Photochemistry and Photobiology* **2009**, *85*, 178.
- [16] A. Goossens, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2004**, *20*, 121.
- [17] A. Aspee, C. Allaga, J. C. Scaiano, *Photochemistry and Photobiology* **2007**, *83*, 481.

- [18] I. Andrae, A. Bringhen, F. Böhm, H. Gonzenbach, T. Hill, L. Mulroy, T. G. Truscott, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, *37*, 147.
- [19] A. C. Williams, S. R. S. Shatri, B. W. Barry, *Pharmaceutical Development and Technology* **1998**, *3*, 283.
- [20] J. Yang, C. J. Wiley, D. A. Godwin, L. A. Felton, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *69*, 605.
- [21] S. Scalia, S. Villani, A. Scatturin, M. A. Vandelli, F. Forni, *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *175*, 205.
- [22] S. Simeoni, S. Scalia, H. A. E. Benson, *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *280*, 163.
- [23] É. Fenyvesi, K. Otta, I. Kolbe, C. Novák, J. Szejtli, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2004**, *48*, 117.
- [24] C. Carola, A. Toullec, H. Buchholz, in *WO2006056308A2*, **2006**.
- [25] O. Scheel, H. Gers-Barlag, R. Kroepke, in *EP875240A2*, **1998**.
- [26] H. Matsuda, K. Ito, A. Taki, O. Uejima, in *JP03058906A*, **1991**.
- [27] H. Matsuda, K. Ito, A. Taki, O. Uejima, in *EP366154A2*, **1990**.
- [28] W. Zhang, Q. Niu, L. Cao, in *CN101406442A*, **2009**.
- [29] S. Zhou, in *CN101278894A*, **2008**.
- [30] K. S. Chodorowski, F. X. Quinn, in *FR2842419A1*, **2004**.
- [31] N. Lapidot, S. Magdassi, D. Avnir, C. Rottman, O. Gans, A. Seri-Levy, in *US20020037261A1*, **2002**.
- [32] R. U. Rojas-Wahl, A.-L. Kuo, S. K. Rajaraman, in *US20050249690A1*, **2005**.
- [33] C. A. Bonda, A. B. Pavlovic, in *US20050186153A1*, **2005**.
- [34] M. Kondo, K. Takarabe, S. Kuwamura, H. Ozawa, in *JP62093220A*, **1987**.
- [35] V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 423.
- [36] V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9538.
- [37] I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- [38] M. Yamaji, Y. Aihara, T. Itoh, S. Tobita, H. Shizuka, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 7014.
- [39] E. W. Foerster, K. H. Grellmann, H. Linschitz, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 3108.

[40] M. Hoshino, M. Koizumi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1972**, *45*, 2731.

5. Fotoelectrociclació [6π] a l'interior d'albúmines sèriques

5.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

5.1.1. Fotoelectrociclacions [6 π]

Quan hom parla de fotoelectrociclacions, es refereix a reaccions que impliquen un tancament pericíclic intramolecular de manera que, mitjançant el reordenament d'electrons π , es forma una molècula cíclica amb un enllaç σ nou. Generalment aquestes fotoreaccions van seguides d'una oxidació de l'anell de manera que el sistema s'aromatitza. En la Figura 5.1 es mostra un exemple típic: la fotociclació de l'estilbé per a formar fenantré^[1]. D'entre aquest tipus de reaccions, les més importants són les fotoelectrociclacions [4 π] i [6 π]. Les darreres són les que ocuparan la nostra atenció en aquest capítol.

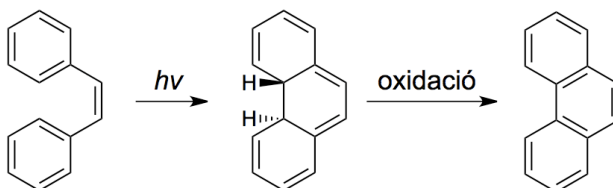


Figura 5.1. Esquema de la fotociclació [6 π] de l'estilbé per formar fenantré.

Les fotociclacions [6 π] es poden classificar segons el tipus de substrat que hi intervé. Així doncs, en la gran majoria d'aquestes reaccions estan involucrats substrats del tipus 1,3,5-triens (Figura 5.2a) que acaben generant carbocicles, enamides (Figura 5.2b) que formen distints productes heterocíclics o també substrats del tipus representat en la Figura 5.2c (on X=O, NR) que poden acabar donant pirrolines, indols, carbazols, etc. Generalment, són reaccions que tenen lloc des del primer estat excitat singlet (π, π^*) i en un sol pas^[2].

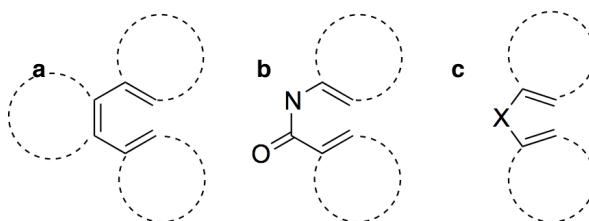


Figura 5.2. Representació general dels tipus de substrats que poden donar fotociclacions [6 π].

5.1.2. Interés i rellevància de les fotoelectrociclacions [6 π]. Aplicacions

Les electrociclacions fotoquímiques [6 π] han estat utilitzades com a eina habitual per a la síntesi de gran varietat de compostos carbocíclics o heterocíclics^[2, 3]. En aquest context, és una fotoreacció molt utilitzada, per exemple, en síntesi de productes naturals. Així doncs, la fotoelectrociclació [6 π] és un pas clau en la síntesi de l'aspidofractinina^[4-6], que és un alcaloide que presenta excel·lents propietats insecticides contra la *Plutella xylostella* (insecte molt comú que colonitza regions productores de plantes crucíferes com poden ser: bròcoli, cols de Brusel·les, col-i-flor, naps, etc.); també de la dicentrina^[7] (utilitzada en el tractament de la hipertensió, arítmia, trombosi i arteriosclerosi) i de la xilopinina^[8] (pertanyent a les protoberberines, que són una família d'alcaloides d'estructura característica que actuen com a precursors d'uns altres alcaloides que tenen propietats antimicrobianes, antileucèmiques, antitumorals i antiinflamatòries).

Aquest tipus de reacció també té aplicacions en el camp de l'actinometria. Hom es refereix a la reacció de fotociclació [6 π] que té lloc en la *N*-metildifenilamina per a formar *N*-metilcarbazol (Figura 5.4), que en ser una reacció molt neta i de rendiment quàntic establert, s'utilitza com a model per calcular rendiments quàntics d'altres reaccions^[9, 10].

Les fotoelectrociclacions [6 π] tenen també aplicacions en fotocromisme^[11-14]. És el cas del treball del professor Irie^[12], en el qual s'observa un fotocromisme a nivell de fluorescència. La responsable d'aquest és una reacció de fotoelectrociclació [6 π] que es dona en una unitat de diarileté característica del substrat. Aquesta canvia l'estructura electrònica del sistema i, per tant, la seua fluorescència. Són també destacables els seus treballs sobre el fotocromisme en cristalls de diarileté^[12, 13]. En aquests descriu el canvi de color que sofreixen els cristalls quan són sotmesos a irradiació, canvi degut a una fotoelectrociclació [6 π] que té lloc en la mateixa unitat de diarileté (Figura 5.3).

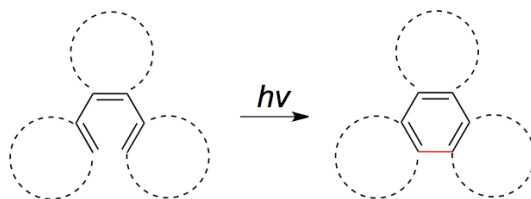


Figura 5.3. Unitat de diarileté sobre la qual té lloc una fotoelectrociclació [6 π] que varia l'estructura electrònica del sistema i per tant la fluorescència de la molècula, o bé el color del cristall^[12, 13].

¹ S'entén per fotocromisme quan una espècie Y, sota irradiació, es transforma de manera reversible (generalment) en una altra espècie Z que té un espectre d'absorció diferent.

Una altra de les aplicacions destacables d'aquestes fotoreaccions són els dispositius moleculars^[13, 15, 16]. S'han descrit nombrosos exemples en els quals les reaccions de fotoelectrociclació són clau per al disseny d'endolls moleculars^[13, 15, 16], dispositius per a augmentar la memòria òptica dels discs dels ordinadors^[13], etc.

5.1.3. Fotoelectrociclació [6 π] de la *N*-metildifenilamina. Mecanisme

Un cas d'especial interès és el de la fotoelectrociclació [6 π] que té lloc en les difenilamines (en el nostre cas, estudiem la *N*-metildifenilamina, abreviada **MeDPA** o **A** en el diagrama de la Figura 5.4). Aquesta reacció, contràriament al que és habitual, té lloc a través d'un mecanisme complex de diversos passos que no parteix de l'estat excitat singlet, sinó que implica l'encadenament de dos estats excitats triplet. Tal com es veu en la Figura 5.4, el mecanisme de la reacció per al substrat **A** comença quan es forma l'estat excitat triplet corresponent (**³A***, amb un rendiment quàntic molt elevat: $\Phi_{ISC} = 0.8 - 0.9$ ^[17-19]) a partir de l'excitació lumínica del substrat **MeDPA** (**A**). Aquest triplet pot decaure a l'estat fonamental **A**, o bé evolucionar cap a un tancament adiabàtic d'anell per donar el triplet del *N*-metil-4a,4b-dihidrocarbazol (**³B***) que acaba decaient al seu estat fonamental (**B**). En aquest punt, l'oxigen del medi actua oxidant el dihidrocarbazol **B** a *N*-metilcarbazol (**C**). No obstant això, en condicions anaeròbies **B** pateix una obertura molt eficient de l'anell i torna, d'aquesta manera, a l'estat fonamental inicial **A** (això succeeix en gairebé un 100% de rendiment en dissolvents no polars)^[2, 17].

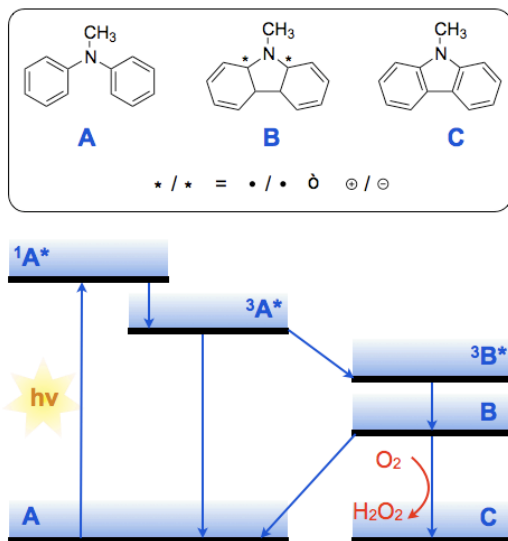


Figura 5.4. Estructures de la *N*-metildifenilamina (**A**), *N*-metil-4a,4b-dihidrocarbazol (**B**) i *N*-metilcarbazol (**C**) junt al diagrama d'energies que descriu el mecanisme de la reacció.

Cal remarcar, doncs, que l'oxigen actua en aquest mecanisme com una arma de doble tall, és a dir, juga un paper dual. D'una banda, com ja s'ha vist, és necessari perquè la reacció es produísca ja que intervé com a reactiu en el darrer pas del mecanisme. Malgrat això, l'oxigen desfavoreix a la vegada la reacció ja que desactiva l'estat excitat triplet de l'amina^[20]. Un control d'aquests dos processos, doncs, podria permetre una bona optimització de la reacció per tal d'augmentar al màxim el seu rendiment.

5.1.4. Fotoelectrociclacions en sistemes supramoleculares

A la bibliografia s'han trobat també nombrosos exemples en els quals s'estudien reaccions de fotociclació a l'interior de sistemes supramoleculares diversos. En aquest apartat se'n mostraran alguns.

Existeixen alguns treballs interessants del professor Ramamurthy *et al.* en els quals s'estudien reaccions de fotociclació $[4\pi]$ a l'interior de zeolites^[21, 22]. Tot i que no són el tipus de fotoelectrociclació que ens ocupa en aquest capítol, s'ha trobat adient comentar-ne els resultats per tal de descriure l'efecte que les zeolites poden tenir en les fotoelectrociclacions en general. Es descriuen, per exemple, fotoelectrociclacions $[4\pi]$ en derivats de tropolones i en presència de zeolites^[21, 22]. Aquestes reaccions donen, depenent del cas, productes enantiòmers o diastereòmers (en la Figura 5.5 se'n mostra un exemple) i l'objectiu dels treballs és estudiar l'efecte que les zeolites tenen en l'excés enantiomèric o diastereomèric dels productes, tenint en compte diferents condicions d'inducció quiral. Els treballs són molt complets, però com a conclusió general es pot destacar que les zeolites confereixen un espai confinat que pot "forçar" la reacció de manera que s'obtenen productes més rics enantiomèricament o diastereomèricament del que s'obté en dissolució. També, una vegada més (tal com s'ha comentat en diversos exemples al llarg d'aquesta tesi), el tipus de cations que coordinen les zeolites juga un paper important en la selectivitat de la reacció.

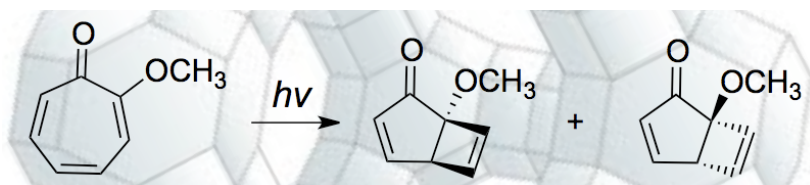


Figura 5.5. Exemple general de la fotociclació $[4\pi]$ de la metilètrropolona que es descriu en els treballs de Ramamurthy *et al.*^[21, 22] i que s'estudia a l'interior de zeolites.

Cal destacar també un treball del nostre grup en el qual s'estudia la fotoelectrociclació [4π] que es produeix en la colquicina (COL) per donar lumicolquicina (LC) a l'interior d'HSA i BSA^[23]. La COL és un producte natural d'especial interès en la recerca bàsica del càncer ja que inhibeix la polimerització de la tubulina (proteïna clau en el desenvolupament de la malaltia). Per això les interaccions COL-tubulina són objecte de nombrosos estudis. En aquest treball s'han volgut estudiar les interaccions COL-proteïna en vista de les importants conseqüències que impliquen aquestes en la investigació bàsica del càncer i s'han pres algunes SA com a model. D'una banda, l'estudi mostra que quan s'irradia la COL s'obtenen diferents isòmers de LC i que la formació d'aquests no depèn de la presència de proteïnes en el medi. A més, l'estudi mitjançant la fotòlisi de flaix làser de dissolucions irradiades de COL@SA revela la presència d'un senyal que s'ha assignat al triplet de la LC. Aquest triplet només es detecta en presència de proteïna. En absència d'aquesta, no s'observa cap espècie transitòria per a dissolucions de COL no irradiades ni per a dissolucions de COL irradiades en absència de proteïna. Per tant, la fotoisomerització *in situ* de COL a LC realitzada prèviament a les mesures de làser, resulta una eina interessant ja que contempla l'ús dels estats triplets de les LCs com a sondes. Aquest fet és destacable a l'hora d'estudiar des d'altres punts de vista les interaccions COL-tubulina.

Hi ha també alguns estudis sobre fotoelectrociclacions [6π] a l'interior de ciclodextrines (CDs). És el cas d'un dels estudis del professor Irie *et al.* que impliquen substrats que contenen una unitat de diarilet^[24] (Figura 5.3). A grans trets, l'efecte que tenen les CDs és que augmenten el rendiment de la fotoelectrociclació en aquests substrats. El motiu és que les CDs forcen el substrat a prendre una conformació determinada que és la que acaba donant el fotoproducte de ciclació.

En altres treballs s'ha estudiat també la fotociclació de la difenilamina per a l'obtenció del carbazol^[25, 26]. Així doncs, després de comprovar la inclusió del compost a l'interior de diferents CDs (amb estequiometria 1:1), es detecta una disminució en la velocitat de la reacció quan la supramolècula hi és present; aquesta disminució depèn del tipus de CD utilitzada i és atribuïda a certes restriccions que la CD aporta al medi i que acaben influïnt en la velocitat de la fotociclació.

Una reacció similar de la *N*-metildifenilamina per a l'obtenció de *N*-metilcarbazol (que és just la reacció objecte d'estudi en aquest capítol) s'ha estudiat també a l'interior de micel·les^[27]. A grans trets, el que s'obté és que, a l'interior d'aquestes, el rendiment quàntic de la reacció no varia respecte de la dissolució aquosa. Això s'explica per què la concentració d'oxigen no varia a l'interior de les micel·les respecte a l'exterior (veure en

l'apartat 5.1.3 l'explicació del mecanisme de la reacció), malgrat que aquestes confereixen al substrat un medi orgànic en el qual es podria pensar que la concentració d'O₂ és distinta. Reforça aquesta idea la comparació amb un dissolvent orgànic (hexà) en el qual, com que conté una concentració d'oxigen més elevada, té un rendiment de reacció més baix. A més de tot això, les micel·les no semblen conferir un confinament propici perquè la reacció es desenvolupi amb més facilitat.

5.1.5. Objectius

" A causa de la seua importància en el camp de l'actinometria i atès que és una reacció neta que no forma subproductes i fàcil de seguir per mètodes espectroscòpics, s'ha triat la fotoelectrociclació [6#] de la *N*-metildifenilamina com a objecte d'estudi en aquest capítol.

" Sota encapsulació en una supramolècula, el fotocomportament de les molècules hostes pot ser modulat no només per restriccions conformacionals, sinó també per una difusió distinta de l'oxigen respecte a la difusió en dissolució. En aquest context, les albúmines sèriques podrien representar un microambient favorable per tal d'optimitzar l'eficiència d'aquesta fotociclació, millorant els antecedents d'altres supramolècules^[27]. I és que, d'una banda, els llocs d'unió d'aquestes proteïnes poden actuar com a microreactors de la fotoreacció aportant certes restriccions al medi i influint en els temps de vida de les distintes espècies transitòries implicades en el mecanisme. I, de l'altra, les proteïnes poden aportar també un control subtil dels paràmetres cinètics de la reacció, ja que al seu interior l'oxigen difon de manera molt distinta que en dissolució i aquest té un paper important en el mecanisme de la reacció^[28-31]. Tots aquests factors poden acabar tenint un efecte en el rendiment quàntic de la reacció.

" És per això que l'objectiu principal d'aquest capítol ha estat investigar la fotociclació de la *N*-metildifenilamina a l'interior de dues albúmines sèriques: la humana i la bovina. Per fer-ho, s'han estudiat detalladament tots els factors cinètics i de rendiment sobre els quals la proteïna té un efecte diferent respecte a la dissolució. D'aquesta manera, s'ha pogut realitzar una anàlisi bastant completa de l'efecte que la inclusió del substrat a l'interior de la biomolècula pot tenir sobre la reacció de fotoelectrociclació que ens ocupa.

5.2. RENDIMENTS QUÀNTICS DE LA REACCIÓ EN DIFERENTS MEDIS

Per a comprovar l'eficiència de la fotoelectrociclació, s'han calculat els rendiments quàntics de la reacció a partir de les cinètiques d'irradiació del substrat **MeDPA (A)** en diferents medis (acetonitril, PBS, PBS en presència d'albumina sèrica en proporció 1:1 respecte del substrat) i sota atmosfera d'aire i oxigen. La irradiació s'ha realitzat monocromàticament amb una longitud d'ona de 323 nm. El seguiment de la formació del carbazol **C** s'ha realitzat alhora tant per absorbància com per fluorescència, per tal de comprovar la bondat dels resultats. Per al càlcul dels rendiments quàntics, s'ha utilitzat com a actinòmetre el mateix substrat **MeDPA** en acetonitril i atmosfera d'aire, condicions en les quals el rendiment de la fotociclació és conegut i de 0.45^[17]. A continuació s'exposaran breument els procediments i es descriuran els resultats. Per a tindre un major detall en els procediments, és convenient consultar la part experimental.

5.2.1. Seguiment cinètic de la reacció per absorbància i per fluorescència.

El seguiment de la formació del carbazol **C** per espectroscopia d'absorció UV-Vis a partir de la irradiació monocromàtica de **MeDPA** es fa mesurant l'absorbància a $\lambda = 345$ nm. Aquesta longitud d'ona correspon al màxim d'una banda característica del carbazol final, que no se solapa amb cap altra banda del producte inicial. En els espectres d'absorció s'observa un punt isobèstic, tal com s'espera en processos nets (Figura 5.6a). Es pot obtenir un perfil cinètic de concentració de **C** format front al temps d'irradiació (Figura 5.6b) utilitzant el perfil cinètic de l'absorbància a $\lambda = 345$ nm i el coeficient d'extinció molar a aquesta λ per a la conversió a concentració (Llei de Beer-Lambert). Comparant els perfils cinètics amb un de rendiment conegut^[17], s'han obtingut els rendiments quàntics de la reacció (ϕ_C) per a cada medi (Taula 5.1).

A banda, també s'utilitza alhora l'espectroscopia d'emissió per tal de fer el seguiment de les mateixes cinètiques d'irradiació del compost **A** i obtenir d'una manera alternativa els rendiments quàntics de la fotociclació (es pot consultar la part experimental). Per obtenir els perfils cinètics es representa front al temps la intensitat d'emissió màxima del carbazol **C** ($\lambda_{\max} = 367$ nm). Aquesta mesura és neta ja que l'altre compost present en el sistema, el substrat **A**, no té emissió. Aquestes cinètiques de fluorescència han estat corregides amb el rendiment quàntic de fluorescència de **C** per a cada medi per tal de poder calcular els rendiments quàntics de la reacció.

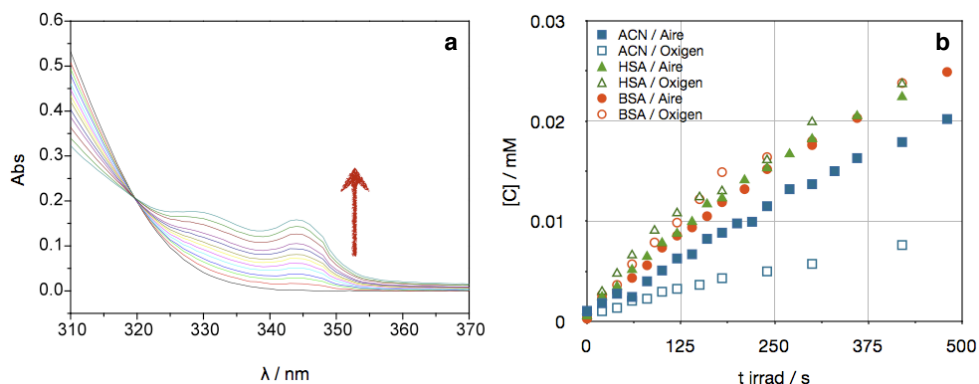


Figura 5.6. (a) Canvis en l'espectre d'absorbància d'una dissolució del compost **A** sotmés a irradiació monocromàtica a $\lambda = 323$ nm de 0 a 30 minuts. **(b)** Concentració de carbazol **C** (obtinguda a partir dels canvis en l'absorbància del sistema monitoritzats a 345 nm) format per irradiació del substrat **A** (8.25×10^{-5} M) en: acetonitril (quadrats blaus), HSA (triangles verds) i BSA (cercles taronja) sota atmosfera d'aire (símbols sòlids) i oxigen (símbols oberts).

Així doncs, els rendiments quàntics calculats de la fotoelectrociclació (ϕ_C) es mostren també en la Taula 5.1. Es pot observar que els resultats obtinguts per ambdós mètodes són altament coincidents, cosa que ens reafirma l'adequació dels mètodes utilitzats. Pel que fa als valors, és altament remarcable que els ϕ_C són bastant més alts en presència de les albúmines sèriques (des de 1.4 fins a 4.6 vegades més grans). És interessant el fet que el valor major obtingut siga de 0.84 per al sistema BSA/O₂ ja que aquest valor és probablement un límit superior imposat pel creuament intersistema de l'amina inicial **A** que té un valor d'entre 0.8 - 0.9^[17-19]. Aquest és, doncs, possiblement, el coll d'ampolla que limita el rendiment total de la reacció.

	PBS - ACN (3:1)	ACN	HSA	BSA
ϕ_C (aire)	0.46 (0.44)	0.45 (0.45) ^a	0.63 (0.61)	0.65 (0.67)
ϕ_C (O ₂)	0.55 (0.52)	0.18 (0.19)	0.73 (0.72)	0.83 (0.84)

^aValor estàndard pres de la referència [17]

Taula 5.1. Rendiments quàntics de fotoelectrociclació determinats per absorbància UV-Vis i, entre parèntesi, els valors obtinguts pel mètode que utilitza la fluorescència estacionària

5.2.2. Seguiment cinètic de la reacció per HPLC

Per tal d'assegurar-nos que, tal com es descriu a la literatura, la reacció de fotociclació de la **MeDPA** siga un procés net que només dóna el carbazol **C**, s'han realitzat

cinètiques d'irradiació i s'han comprovat els productes formats mitjançant la tècnica d'HPLC (a l'apartat de part experimental se n'expliquen els detalls). Les cinètiques s'han realitzat tant en ACN com en proteïna. En la Figura 5.7 es mostren els cromatogrames obtinguts al llarg del temps d'irradiació del substrat **A** en presència d'HSA, de manera que s'observa la degradació d'aquest i la formació del fotoproducte corresponent al carbazol **C**, que és l'únic que es forma de manera significativa.

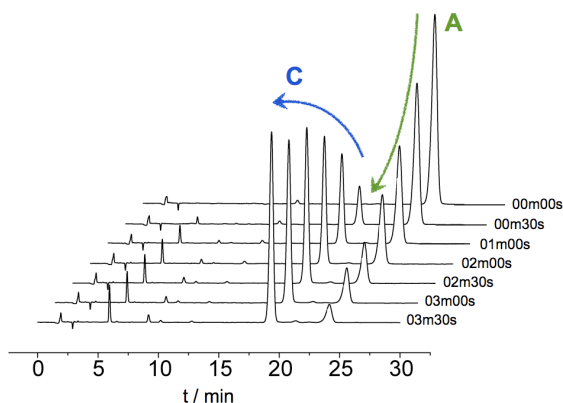


Figura 5.7. Perfils cinètics dels cromatogrames obtinguts durant la cinètica d'irradiació monocromàtica ($\lambda = 323 \text{ nm}$) d'**A** ($1.65 \times 10^{-4} \text{ M}$) en presència equimolar d'HSA i medi PBS.

5.3. ESTUDI DELS INTERMEDIS DE REACCIÓ PER FOTÒLISI DE FLAIX LÀSER

Tal com s'ha comentat a l'apartat anterior, els resultats dels ϕ_C obtinguts per a la fotoelectrociclació són significativament més elevats en presència de les proteïnes. Per tal d'entendre la influència d'aquestes, s'han estudiat els intermedis de la reacció mitjançant la tècnica de fotòlisi de flaix làser. En aquest context, la formació i el decaïment del dihidrocarbazol **B** és adient per tal de realitzar aquest estudi. El motiu d'això és, d'una banda, que és una espècie clau en el mecanisme ja que la seua formació reflexa el decaïment del seu precursor $^3\mathbf{A}^*$, i el seu decaïment està involucrat directament en la formació del carbazol **C** (veure la Figura 5.4). D'altra banda, a més, l'espècie **B** és fàcilment detectable ja que la seua absorció transitòria té un màxim a 610 nm que no se solapa amb cap altre senyal i un temps de vida fàcil d'observar per ser relativament llarg a diferència del

de les altres espècies, sovint amb una vida massa curta per poder-se observar mitjançant fotòlisi de flaix làser en l'escala de nanosegons^[17].

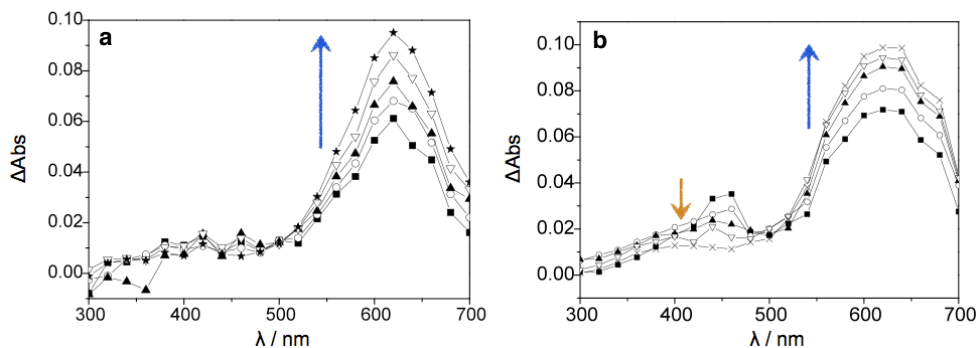


Figura 5.8. Espectres d'absorció transitoria d'**A** en (a) acetonitril (4.1×10^{-5} M) sota atmosfera d'Ar obtinguts de 0.2 a 2.3 μ s després del pols de làser ($\lambda_{exc} = 308$ nm) i (b) dissolució de PBS i presència equimolar d'HSA (4.1×10^{-5} M) sota atmosfera d'aire obtinguts de 0.4 a 4 μ s després del pols de làser ($\lambda_{exc} = 308$ nm).

Així doncs, es realitzaren mesures de fotòlisi de flaix làser del substrat **A** en diferents medis: acetonitril, i PBS en presència i absència de les proteïnes HSA i BSA. Les diferències entre la dissolució en presència i absència de proteïna de seguida es varen fer paleses. En els espectres d'absorció transitoria del compost **A** en dissolució d'acetonitril i PBS en absència de SA només es detecta la formació i el decaïment de l'espècie **B**. En canvi, en presència de proteïna es detecta, a més, una espècie amb un màxim d'absorció transitoria a 440 nm que disminueix paral·lelament a la formació del senyal de 610 nm. Aquest nou senyal, segons la bibliografia, s'assigna a l'espècie ${}^3\mathbf{B}^*$ ^[9, 17], que decau per a formar **B**. En la Figura 5.8 es troba un exemple d'aquests espectres d'absorció transitoria per a acetonitril (Figura 5.8a) i HSA (Figura 5.8b). La detecció d'aquesta espècie ${}^3\mathbf{B}^*$ només en presència de proteïna s'atribueix al fet que les albúmines confereixen un medi confinat al sistema, de manera que les espècies que en dissolució decauen ràpidament a causa de les col·lisions amb el dissolvent, en proteïna poden observar-se ja que es mantenen protegides d'aquestes col·lisions. Això, com s'ha anat veient al llarg de l'aquesta tesi, sol tenir conseqüències rellevants en el sistema d'estudi.

Seguint amb aquest concepte, doncs, els temps de vida (τ) de les espècies que s'observen en dissolució s'allarguen en proteïna. Se'n troba un exemple en la Figura 5.9, on es compara el senyal de 610 nm PBS, HSA i BSA en atmosfera d'aire. Tal com es comptabilitzarà després (apartat 5.4.1), el τ s'allarga unes 30 vegades en HSA i unes 25 en BSA.

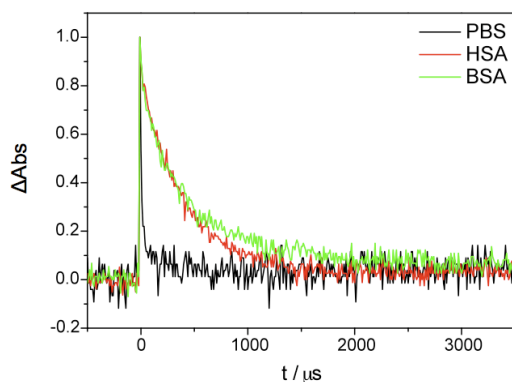


Figura 5.9. Decaïments normalitzats monitoritzats a 610 nm per a **A** en PBS (negre) o en presència d'HSA (roig) i BSA (verd) en proporcions equimolars.

5.4. INTERACCIÓ SUBSTRAT-PROTEÏNA

Després d'estudiar mitjançant la tècnica de fotòlisi de flaix làser els intermedis de reacció en absència i en presència de proteïna, s'ha considerat convenient utilitzar aquesta tècnica per estudiar, d'una banda, la formació del complex proteïna-substrat (**SA@A**) i determinar-ne l'estequiometria i, de l'altra, establir el lloc d'unió on el substrat s'ancora a l'albumina.

5.4.1. Determinació de l'estequiometria del complex

Tenint en compte els resultats de l'apartat anterior (Apartat 5.3) sembla evident que existeix una unió entre el substrat **A** i les proteïnes HSA i BSA. Per tal de determinar en quina proporció molar s'uneix el substrat a les albumines es farà servir la tècnica de fotòlisi de flaix làser.

Tal com s'ha comentat anteriorment, en dissolució de PBS i absència de proteïna el decaïment exponencial del senyal de 610 nm segueix una cinètica de primer ordre (Equació 5.1) i té un temps de vida de $\tau = 15 \mu\text{s}$. En presència de proteïna, en canvi, els ajustos del decaïment temporal són més complexos ja que es dona la presència de dos components en el temps de vida ($\tau_f = 15 \mu\text{s}$ i $\tau_b = 451 \mu\text{s}$ per a HSA i $\tau_f = 15 \mu\text{s}$ i $\tau_b = 384 \mu\text{s}$ per a BSA). Per tal d'ajustar els decaïments en aquest cas s'han fet anàlisis de regressió de les corbes seguint l'Equació 5.2.

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad \text{Equació 5.1}$$

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-\frac{t}{\tau_f}} + a_b \times e^{-\frac{t}{\tau_b}} \quad \text{Equació 5.2}$$

El fet que s'observen dos temps de vida quan al medi hi ha presència de proteïna està relacionat amb el fet que hi ha dues localitzacions del substrat en dos medis diferents. El valor de 15 μ s, obtingut per al temps de vida més curt (τ_f), correspon a l'intermedi **B** quan està lliure en dissolució (cal denotar que ja s'havia obtingut aquest valor en mesurar el substrat **A** en PBS). Els valors més llargs de temps de vida (τ_b), en canvi, reflecteixen una estreta interacció amb una de les dues cavitats conegudes de les proteïnes (lloc d'unió I o II^[32, 33]). En aquest context, s'han preparat diverses dissolucions amb distintes proporcions de [SA]/[**A**] i s'han mesurat els decaïments a 610 nm. En ajustar cada decaïment, s'ha obtingut un valor determinat per als factors preexponencials a_f i a_b (veure Equació 5.2) i s'han utilitzat aquests valors per estimar, en cada cas, quina és la proporció de substrat **A** que queda lliure o unit a la proteïna. En la Figura 5.10 es mostra el percentatge de substrat complexat respecte als equivalents corresponents de proteïna presents al medi. Com s'observa, quan la proporció entre **A** i SA és d' 1:1, la quantitat de substrat localitzat a l'interior de la proteïna està al voltant del 90% en ambdues albúmines. Així doncs, l'estequiometria del complex SA@**A** és d' 1:1. Per això s'ha utilitzat aquesta proporció per a realitzar tots els experiments en presència de les SA.

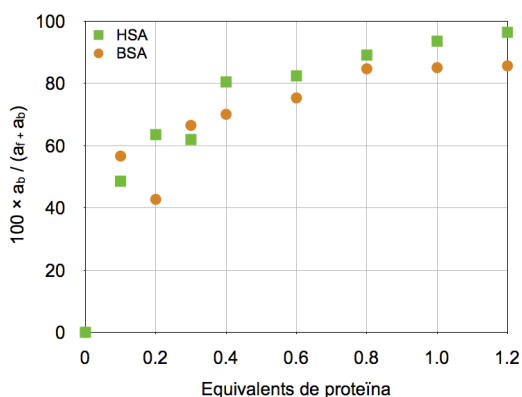


Figura 5.10. Percentatge de substrat complexat en funció dels equivalents de proteïna ([SA]/[**A**]) per a HSA (quadres verds) i BSA (cercles taronja)

5.4.2. Determinació del lloc d'unió del substrat a l'interior de la proteïna

Per tal de completar la caracterització dels complexos SA@A, s'ha volgut determinar el lloc d'unió al qual el substrat A s'uneix a la proteïna. Per fer-ho, s'han preparat dissolucions equimolars de SA@A i se li han afegit quantitats creixents d'àcid oleic (OA) d'una banda i (S)-ibuprofén (IBP) de l'altra, com a sondes específiques del lloc d'unió I i II, respectivament. De cada dissolució s'ha mesurat el senyal de fotòlisi de flaix làser a 610 nm.

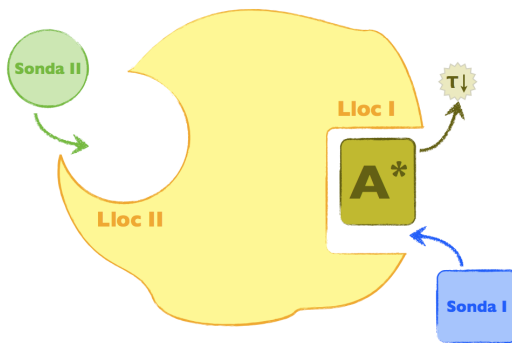


Figura 5.11. Esquema hipotètic en el qual la Sonda I desplaça el substrat A* del lloc I de la proteïna i disminueix així el temps de vida d'aquest. En canvi, la Sonda II no té cap efecte sobre el substrat perquè aquest no es troba localitzat en el lloc II.

D'aquesta manera, si la sonda fóra capaç de desplaçar el substrat A del seu lloc d'unió, a mesura que s'anara augmentant la concentració d'aquesta en el medi augmentaria la proporció d'A a l'exterior de la proteïna i disminuiria a l'interior. Aquestes proporcions es podrien obtenir, tal com s'ha explicat anteriorment, ajustant els decaïments temporals del sistema a 610 nm i extraient els factors preexponencials a_f (el corresponent al $\tau_f = 15 \mu\text{s}$) i a_b (corresponent al $\tau_b = 451 \mu\text{s}$ per a HSA i al $\tau_b = 384 \mu\text{s}$ per a BSA), segons l'Equació 5.2. Si, per contra, la sonda no fóra capaç de desplaçar el substrat del lloc d'unió, la proporció entre els factors preexponencials a_f i a_b romandria constant. Així doncs, s'establiria com a lloc d'unió del substrat A aquell pel qual té afinat la sonda que ha estat capaç de desplaçar A. En la Figura 5.11 es mostra un exemple hipotètic d'aquests experiments de desplaçament.

Després de realitzar els experiments de desplaçament descrits utilitzant les sondes específiques indicades, s'ha obtingut que, a mesura que s'han anat afegint al medi quantitats creixents d'àcid oleic, aquest ha estat capaç de desplaçar el substrat de la proteïna, ja que s'ha observat la disminució de la proporció d'A a l'interior d'aquesta. Per contra, l'(S)-ibuprofén no tenia cap efecte en la població del substrat a l'interior i exterior de

la proteïna. En la Figura 5.12 es poden observar els resultats per a HSA (els resultats per a BSA són similars). Com que és conegut que l'àcid oleic té afinitat pel lloc I de la proteïna, es pot assumir que el substrat **A** es localitza en aquest mateix punt.

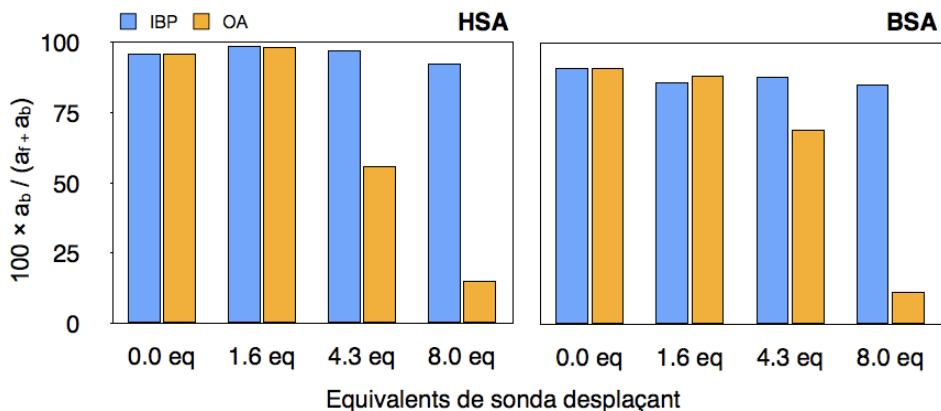


Figura 5.12. Percentatge de substrat complexat en proporció (1:1) amb HSA (esquerra) i BSA (dreta) en funció dels equivalents afegits dels agents desplaçants (*S*)-ibuprofén (IBP) i àcid oleic (OA)

5.5. AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DE LA REACCIÓ. EL PAPER DE L'O₂

L'absorció transitòria de l'intermedi dihidrocarbazol **B** a 610 nm es pot utilitzar també com a indicador de l'eficiència de la reacció ja que la formació d'aquest intermedi correspon a la ciclació pròpiament dita (veure Figura 5.4). Així doncs, en aquest apartat s'avaluarà, a partir d'aquest senyal, quina és l'eficiència de la ciclació i el paper que pot tenir l'oxigen en el mecanisme.

Si s'analitza la formació del senyal de 610 nm en acetonitril, per a dissolucions normalitzades òpticament, s'observa una clara diferència per a dissolucions bombollejades amb argó, aire i oxigen. Tal com es veu en la Figura 5.13a, la formació de **B** està dramàticament desafavorida quan al medi hi ha presència d'oxigen. Això s'atribueix al fet que, en dissolució, l'oxigen és capaç de desactivar el ³A*, que és el precursor d'aquest intermedi **B**. Com a conseqüència, la quantitat de **B** formada en dissolució és menor i, per tant, menor la quantitat del carbazol **C** obtinguda.

Per contra, en presència de proteïna la formació de l'intermedi **B** és independent de la concentració d'oxigen present al medi (a les Figures 5.13b i 5.13c es veu l'exemple amb la HSA i la BSA, respectivament).

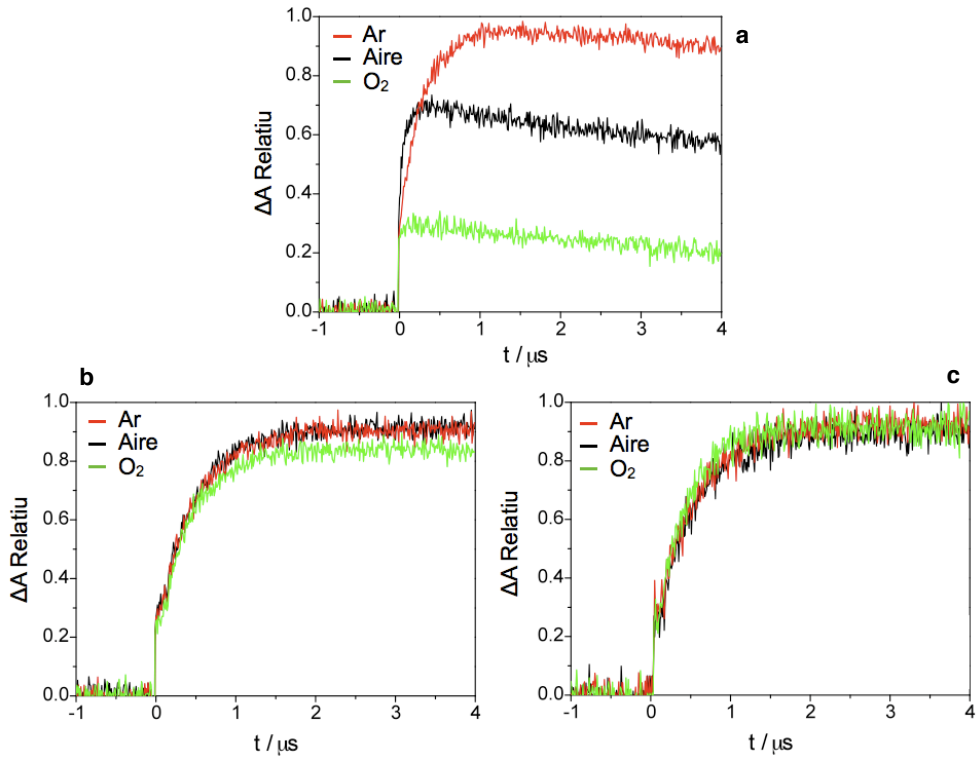


Figura 5.13. Creixements transitoris d'absorció monitoritzats a 610 nm del substrat **A** (5.5×10^{-5} M) en (a) acetonitril, (b) HSA i (c) BSA (ambdues proteïnes en proporció 1:1 respecte del substrat), en tots els casos sota atmosfera d'argó (roig), aire (negre) i oxigen (verd)

S'han determinat també les constants de desactivació per oxigen de l'espècie **B** (que absorbeix a 610 nm), a l'interior de la proteïna. Els valors estimats són de $5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ per a HSA i $8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ per a BSA (assumint que la concentració d'oxigen a l'interior de la proteïna és similar a la de l'aigua). Aquest valor és al voltant de 2 ordres de magnitud més baix que la difusió de l'oxigen a l'interior del lloc d'unió I de la proteïna^[28] (on s'ancora el substrat **A** i on té lloc, doncs, la reacció), que és d'aproximadament $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ^[31]. Això explica per què la deshidrogenació final del carbazol **C** no es veu afectada quan la reacció té lloc a l'interior de la proteïna, ja que l' O_2 present al medi és capaç de produir-la sense dificultat.

5.6. CONCLUSIONS

Les proteïnes aporten un medi molt adient per tal d'optimitzar la fotoelectrociclació [6π] de les diarilamines a carbazols, i això s'ha vist reflexat en els excel·lents rendiments quàntics obtinguts. Aquesta optimització s'aconsegueix mitjançant una modulació subtil dels paràmetres cinètics que aporten les albúmines estudiades i això s'obté com a resultat de dos factors: un són les restriccions geomètriques que les cavitats d'unió aporten i l'altre el control sobre la difusió de l'oxigen, que intervé de manera clau en el mecanisme de la reacció fent que la formació de carbazol **C** siga més efectiva. En aquest sentit, és remarcable el cas de la BSA en atmosfera saturada d'oxigen, en el qual s'obté un rendiment quàntic de 0.84, només limitat pel creuament intersistema de l'amina inicial **A**.

5.7. PART EXPERIMENTAL

5.7.1. Productes químics

L'*N*-metildifenilamina (**A**), *N*-metilcarbazol (**C**), albúmina sèrica humana i bovina (HSA i BSA), (*S*)-ibuprofén (IBP), àcid oleic (OA) i les pastilles de tampó fosfat (PBS, 0.137 mM, pH = 7.4) van ser adquirits a Sigma.

5.7.2. Equipament: Absorció, emissió, fotoirradiació i fotòlisi de flaix làser

Per a realitzar les mesures d'absorció, d'emissió estacionària i de fotòlisi de flaix làser s'utilitzaren els equips que es descriuen al capítol 6 (6.1.1 i 6.1.2). Per a obtenir les cinètiques d'irradiació monocromàtica es va fer servir la làmpada del mateix fluorímetre que es descriu a l'apartat 6.1.1.

Per a realitzar les cinètiques d'irradiació de les mostres que posteriorment es monitoritzaren per HPLC es va fer servir el fotoreactor multilàmpada descrit a l'apartat 6.1.4 amb únicament dos tubs fluorescents (amb longitud d'ona màxima al voltant de 300 nm) situats als laterals. L'equip d'HPLC utilitzat per a monitorització va ser un Agilent Technologies, model 1220 LC System.

5.7.3. Cinètiques monocromàtiques. Càlcul dels rendiments quàntics de la fotoelectrociclació

Per tal de calcular els rendiments quàntics de la fotoelectrociclació d'**A** es van preparar dissolucions 8.25×10^{-5} M de substrat en acetonitril, PBS-acetonitril (en proporció 3:1 on el PBS és 0.1 mM i amb pH = 7.4), HSA i BSA (ambdues preparades en dissolució de PBS i concentració 8.25×10^{-5} M per ser equimolar amb el substrat) i bombollejades en atmosfera d'aire i d'oxigen. Aquestes dissolucions es van irradiar monocromàticament a una $\lambda_{irr} = 323$ nm amb el mateix ample de banda de l'esclatxa i la cinètica es va monitoritzar utilitzant, consecutivament per a cada mesura, dues tècniques: espectroscopia d'absorció UV-Vis i espectroscopia d'emissió de fluorescència.

Per tal d'obtenir el perfil cinètic d'absorbància de la formació del carbazol **C** es va representar l'absorbància dels sistemes a 345 nm front al temps d'irradiació i per obtenir el perfil cinètic de fluorescència es va representar la fluorescència a 367 nm front al temps d'irradiació. Tots dos valors són característics del carbazol resultant per a absorbància i fluorescència, respectivament.

Càlcul dels rendiments quàntics mitjançant les dades d'absorbància

Amb els perfils cinètics d'absorbància i els valors calculats experimentalment dels coeficients d'extinció molar del carbazol **C** en tots els medis i condicions utilitzats (Taula E.1) s'obtingueren els perfils cinètics de concentració de carbazol format front al temps d'irradiació. Es calcularen les velocitats inicials de la reacció per mitjà de l'ajustament de rectes en la part inicial de les cinètiques i comparant aquestes velocitats entre elles i prenent el valor del rendiment quàntic de la reacció en ACN i atmosfera d'aire com a referència actinomètrica ($\phi = 0.45$) es van calcular els rendiments quàntics de la reacció en els altres medis i condicions.

Medi	ϵ (345 nm) / $\text{cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$
ACN	3830
HSA	3800
BSA	4330
PBS-ACN (3:1)	3450

Taula E.1. Coeficients d'extinció molar (ϵ) del producte **C** per a diferents medis a $\lambda = 345$ nm

Càlcul dels rendiments quàntics mitjançant les dades de fluorescència

S'utilitzaren els valors calculats experimentalment dels rendiments quàntics de fluorescència del carbazol **C** en tots els medis i condicions utilitzats (Taula E.2) per tal de normalitzar els perfils cinètics de fluorescència obtinguts. D'aquesta manera es pogueren calcular les velocitats inicials de les reaccions de manera similar al realitzat amb els perfils anteriors. Comparant aquestes velocitats entre elles i prenent el valor del rendiment quàntic de la reacció en ACN i atmosfera d'aire com a referència actinomètrica ($\phi = 0.45$) es van calcular els rendiments quàntics de la reacció en els altres medis i condicions.

Medi	ϕ_F (aire)	ϕ_F (O ₂)
ACN	0.216	0.075
HSA	0.251	0.228
BSA	0.270	0.239
PBS-ACN (3:1)	0.022	0.015

Taula E.2. Rendiments quàntics de fluorescència (ϕ_F) del producte **C** per a diferents medis a $\lambda = 367$ nm

5.7.4. Cinètiques de la fotociclació monitoritzades per HPLC

Per tal de seguir les cinètiques de la fotoelectrociclació mitjançant la tècnica d'HPLC es preparen dissolucions de substrat **A** (1mL, 1.65×10^{-4} M, sota atmosfera d'aire) en acetonitril, HSA i BSA (les de proteïna amb una proporció 1:1 respecte a la quantitat de substrat present al medi). Les diverses dissolucions s'irradien amb un fotoreactor multilàmpada tal com s'ha indicat al punt 5.7.2, durant un temps d'irradiació concret.

Les diferents mostres irradiades s'injecten al cromatògraf després de fer el tractament corresponent segons si al medi hi ha absència o presència de proteïna, tal com es detalla en el capítol 6 d'aquesta tesi (apartats 6.2.1 i 6.2.2 respectivament). Per a la separació de la mostra s'utilitza una columna C18 Kromasil 100, 5 μ m (de Teknokroma) amb un fluxe d'1 mL/min, una $\lambda_{\text{detecció}} = 295$ nm i utilitzant aigua-acetonitril (40:60) com a eluent. En aquestes condicions, l'*N*-metildifenilamina (**A**) ix a 23.5 minuts i l'*N*-metilcarbazol (**C**) a 18 minuts en el cromatograma.

5.7.5. Determinació de l'estequiometria del complex. Condicions experimentals

Per tal de determinar l'estequiometria del complex SA@**A** es prepararen dissolucions d'**A** amb una Abs(308 nm) ~ 0.3, és a dir, 4.1×10^{-5} M i amb equivalents creixents de proteïna (fins a 1.2 equivalents, és a dir, fins a una concentració aproximada de 5×10^{-5} M). De cada mostra se'n mesurà el senyal transitori a 610 nm i els decaïments temporals s'ajustaren amb les equacions 5.1 i 5.2, tal com s'ha explicat a l'apartat 5.4.1. Els factors preexponencials de les equacions indicaren quin percentatge de substrat hi havia a dins i a fora de la proteïna.

5.7.6. Determinació del lloc d'unió a la proteïna. Condicions experimentals

Per tal de determinar a quin lloc d'unió s'uneix el substrat **A** a la proteïna, es prepararen dissolucions 4.1×10^{-5} M d'**A** en PBS i en presència de proteïna (amb una proporció equimolar respecte d'**A**), de manera que l'Abs(308 nm) ~ 0.3. A continuació es feren els experiments de desplaçament amb (S)-ibuprofén (IBP) i àcid oleic (OA), tal com s'indica a l'apartat 5.4.2, mesurant els senyals transitoris del sistema a 610 nm i analitzant-los com a l'apartat anterior. Els factors preexponencials indicaven si l'agent desplaçant feia que el substrat **A** isquera a fora de la proteïna i això és el que acabà determinant el lloc d'unió.

5.8. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Gilbert, in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed., CRC Press, **2004**, pp. 33/1
- [2] T. Bach, J. P. Hehn, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1000.
- [3] A. Albini, M. Fagnoni, *Handbook of Synthetic Photochemistry*, Wiley VCH Verlag GmbH & Co KGaA, **2010**.
- [4] J. C. Gramain, H. P. Husson, Y. Troin, *Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 5517.
- [5] M. Dufour, J. C. Gramain, H. P. Husson, M. E. Sinibaldi, Y. Troin, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 3429.
- [6] H. Kinoshita, T. Ohnuma, T. Oishi, Y. Ban, *Chemistry Letters* **1986**, 927.
- [7] M. P. Cava, P. Stern, K. Wakisaka, *Tetrahedron* **1973**, *29*, 2245.
- [8] G. R. Lenz, *Journal of Organic Chemistry* **1974**, *39*, 2846.
- [9] E. W. Foerster, K. H. Grellmann, H. Linschitz, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 3108.
- [10] T. Yoshihara, M. Yamaji, T. Itoh, J. Nishimura, H. Shizuka, S. Tobita, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2001**, *140*, 7.
- [11] H. Bouas-Laurent, H. Durr, *Pure and Applied Chemistry* **2001**, *73*, 639.
- [12] M. Irie, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2010**, *9*, 1535.
- [13] M. Irie, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1685.
- [14] S. Fukumoto, T. Nakashima, T. Kawai, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1565.
- [15] T. A. Golovkova, D. V. Kozlov, D. C. Neckers, *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 5545.
- [16] M. M. Russew, S. Hecht, *Advanced Materials* **2010**, *22*, 3348.
- [17] H. Gorner, *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 1245.
- [18] I. Tanaka, H. Shizuka, Y. Takayama, T. Morita, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 7270.
- [19] H. Shizuka, Y. Takayama, T. Morita, S. Matsumoto, I. Tanaka, *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 5987.
- [20] G. Fischer, E. Fischer, K. H. Grellmann, H. Linschitz, A. Temizer, *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96*, 6267.

- [21] A. Joy, L. S. Kaanumalle, V. Ramamurthy, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 3045.
- [22] J. Shailaja, J. Sivaguru, S. Uppili, A. Joy, V. Ramamurthy, *Microporous and Mesoporous Materials* **2001**, *48*, 319.
- [23] P. Bartovsky, R. Tormos, M. A. Miranda, *Chemical Physics Letters* **2009**, *480*, 305.
- [24] M. Takeshita, M. Irie, *Chemical Communications* **1997**, 2265.
- [25] D. Sur, P. Purkayastha, N. Chattopadhyay, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, *134*, 17.
- [26] D. Sur, P. Purkayastha, S. C. Bera, N. Chattopadhyay, *Journal of Molecular Liquids* **2000**, *89*, 175.
- [27] N. Roessler, T. Wolff, *Photochemistry and Photobiology* **1980**, *31*, 547.
- [28] R. Alonso, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *Organic Letters* **2011**, *13*, 3860.
- [29] V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9538.
- [30] V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 423.
- [31] I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- [32] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Molecular Pharmacology* **1975**, *11*, 824.
- [33] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Molecular Pharmacology* **1976**, *12*, 1052.

6. Part experimental comuna

6.1. EQUIPAMENT

Per a totes les mesures òptiques es van utilitzar cubetes de quars de 10 × 10 mm i uns 4 mL de capacitat.

6.1.1. Absorció i emissió estacionària

Per a la mesura dels espectres d'absorció s'utilitzà un espectrofotòmetre de doble feix Varian UV-Vis, model Cary 300. Per a les mesures de fluorescència estacionària es va fer servir un fluorímetre Photon Technology International (PTI) LPS-220, equipat amb una làmpada de Xenon amb una potència de 75 W.

6.1.2. Fotòlisi de flaix làser

Per a les mesures amb la tècnica de fotòlisi de flaix làser s'ha utilitzat un sistema basat en un làser Excimer polsat de Xe/HCl (LEXTRA 50 Lambda Physik LaserTechnik) amb una longitud d'ona d'excitació de 308 nm (40 mJ per pols, 10 ns per pols). En el sistema de detecció s'utilitzava una làmpada de Xenon Lo225 Oriel com a font de llum. A més, el sistema contenia un monocromador (Oriol, model 77200), un sistema fotomultiplicador (Oriol, model 70705) i un oscil·loscopi Tektronix TDS-640A. El senyal sortint de l'oscil·loscopi era transferit a un ordinador personal. La concentració dels compostos fou ajustada per a que l'absorbància a la longitud d'ona d'excitació (308 nm) fóra ~0.3.

En cas que s'haja utilitzat un altre mètode o que haja calgut destacar alguna característica concreta, s'ha especificat en l'apartat del capítol corresponent.

6.1.3. Sistemes d'irradiació monocromàtica

En general, per a les irradiacions amb llum monocromàtica s'utilitzà un sistema Microbeam (model L-201), que incloïa una làmpada de Xenon de 150 W acoplada amb un monocromador (model 101).

En cas que s'haja utilitzat un altre sistema d'irradiació o que haja calgut destacar alguna característica concreta, s'ha especificat en l'apartat del capítol corresponent.

6.1.4. Sistemes d'irradiació multilàmpada

El sistema d'irradiació multilàmpada utilitzat en aquesta tesi consisteix en un fotoreactor Luzchem (model LZC 4V). En general, les làmpades que s'empren quan s'utilitza aquest fotoreactor són tubs fluorescents amb una longitud d'ona màxima al voltant de 300 nm (també de Luzchem, model LZC-UVB).

En cas que s'haja utilitzat un altre sistema d'irradiació o que haja calgut destacar alguna característica concreta, s'ha especificat en l'apartat del capítol corresponent.

6.1.5. Equip d'HPLC

L'equip utilitzat per a l'anàlisi i separació de mostres en HPLC consisteix en una bomba Varian 9012Q, un injector Rheodyne i un espectròmetre policromàtic Varian 9065.

6.2. TRACTAMENT DE LA MOSTRA PREVI A LA INJECCIÓ EN HPLC

Per tal de fer les cinètiques de degradació seguides mitjançant la tècnica d'HPLC, se seguia una metodologia determinada que era diferent en el cas de que la mostra fóra o no irradiada en presència de proteïna.

6.2.1. Tractament de la mostra irradiada en absència de proteïna

Per a les mostres irradiades en dissolució (absència de proteïna), es preparava 1 mL de la mostra en qüestió a una concentració detectable en el sistema d'HPLC. Després s'irradiava amb les làmpades adequades i el temps corresponent i seguidament una alíquota de 20 µL de la dissolució irradiada s'injectava directament en l'HPLC sota les condicions apropiades per a la separació dels distints productes presents en la mescla resultant de la irradiació.

6.2.2. Tractament de la mostra irradiada en presència de proteïna

Per a les mostres irradiades en presència de proteïna, es preparava 1 mL de la mostra i la proteïna en les proporcions adequades (en tots els casos 1:1 substrat@proteïna) i s'irradiava amb les làmpades adequades i el temps corresponent. Per tal de precipitar la proteïna abans d'injectar la mostra a l'HPLC, s'afegien 4 mL d'acetona que estava a una temperatura menor a -30°C i es mantenia la barreja durant 1 hora al congelador a

temperatura menor de -30°C . Posteriorment, se centrifugava la mostra durant 20 minuts i a 6000 rpm i s'extreia acuradament la fase líquida amb una xeringa. Aquesta fase es filtrava amb un filtre de xeringa de Teflon de $0.45\ \mu\text{m}$ i es rotavaporava fins a sequedat. El residu sòlid es redissolia en 1 mL de dissolvent (metanol en el cas dels substrats de foto-Fries i ACN en el cas dels substrats de la fotoelectrociclació [6 π] de la *N*-metildifenilamina) i 20 μL de la dissolució resultant s'analitzaren per HPLC en les condicions apropiades per separar els components de la mescla. Per portar a terme aquest procediment de manera correcta es comprovava prèviament que tant els productes de partida com els fotoproductes no patien cap alteració al llarg de la seua aplicació i que es recuperava, doncs, la totalitat de les mostres.

Conclusions generals

Conclusions Generals

De la present tesi doctoral sobre l'ús d'albúmines sèriques com a amfitrions de reaccions fotoquímiques s'extrauen les següents conclusions:

- (1) Les albúmines sèriques fan de matriu del sistema, de manera que són capaces de confinar els substrats i "protegir-los" del medi. D'aquesta manera les proteïnes modulen el comportament dels hostes allargant els temps de vida de les espècies intermèdies d'aquests i fins i tot permetent que n'apareguen de noves que no s'observaven en dissolució. Un clar exemple d'això és el cas dels derivats de l'avobenzona, l'encapsulació dels quals provoca un increment en el temps de vida dels triplets de la **PrAB** i la **MeAB** i la detecció de l'estat excitat triplet de la **BrAB** a temperatura ambient (en absència de proteïna aquest només és observat en matrius de dissolvent a baixa temperatura).
- (2) El medi confinat aportat per les albúmines sèriques pot afectar la fotoquímica de les reaccions en dissolució de manera que la selectivitat, la velocitat o els rendiments de les fotoreaccions poden veure's modificats. Això s'ha observat clarament en la fragmentació de Norrish tipus II que té lloc en el substrat **PrAB**. En aquesta, malgrat que el rendiment final acaba sent el mateix, la velocitat de la fotoreacció és 2.8 vegades més lenta a l'interior de la proteïna HSA que en dissolució d'acetonitril. Aquest fet s'ha atribuït al fet que la conformació necessària perquè es done la reacció de Norrish tipus II està desafavorida a l'interior de la cavitat proteica. Per contra, en el cas de la reacció de foto-Fries es produeix una millora en la selectivitat per al derivat de l'àcid glutàric en BSA; aquest fet mostra la importància de l'efecte caixa proporcionat per la cavitat de l'albúmina.
- (3) La matriu proteica pot influir sobre el nivell d'oxigen del medi i afectar així la fotoquímica de les reaccions. Un exemple interessant és el que succeeix en la fotoelectrociclació [6π] de la *N*-metildifenilamina. Ací l'oxigen juga un paper clau i doble en el mecanisme ja que, d'una banda, desafavoreix la reacció desactivant l'estat triplet de l'amina que inicia la ciclació i, de l'altra, és necessària la seua presència en el darrer pas oxidatiu del procés. Com a resultat, els rendiments quàntics en dissolució són remarcablement menors que en proteïna. Això s'atribueix

sobretot al fet que, en canviar la constant de difusió de l'oxigen a dins de la proteïna, aquest no desactiva el triplet de l'amina inicial (que té un temps de vida molt curt); d'aquesta manera s'optimitza el procés de ciclació en presència d'oxigen i és possible una oxidació eficient en el pas final. Aquest control tan subtil dels paràmetres cinètics implicats permet l'optimització del rendiment quàntic de la reacció a l'interior de l'albúmina. En aquest sentit, és remarcable el cas de la BSA en medi saturat d'oxigen, en el qual el rendiment quàntic de la fotoelectrociclació és el màxim possible, ja que només està limitat pel rendiment de creuament intersistema de l'amina inicial, que és el coll d'ampolla.

(4) Els distints llocs d'unió de les albúmines poden afectar de manera diferent el rendiment de les fotoreaccions, tal com ha quedat ben il·lustrat en el cas de la reorganització de foto-Fries. De fet, l'ús de substrats específicament dissenyats per a tindre afinat per a cada lloc d'unió de les albúmines (humana i bovina) ha demostrat que l'eficiència de la fotoreacció varia segons el lloc d'unió on succeeix. Concretament en el cas d'estudi, la foto-Fries és més eficient en el lloc I, on predominen les interaccions hidrofòbiques.

(5) Les proteïnes, a través del seu efecte d'encapsulació, permeten estudiar en medi aquós aril èsters poc solubles en aigua. Això es demostra en el cas de l'acetat de naftil que és solubilitzat en medi aquós a través de l'encapsulació en el lloc I de l'albúmina sèrica i al seu interior dóna una gran eficiència de la reacció de foto-Fries.

Així doncs, el treball presentat en aquesta tesi ha demostrat que s'han de tenir en compte les albúmines com a amfitrions biòtics de les reaccions fotoquímiques, ja que es tracta de macromolècules complexes que poden aportar molts matisos als mecanismes, rendiments quàntics, etc. de les fotoreaccions que no es poden aconseguir amb supramolècules sintètiques. A més, ha permès també definir les característiques importants de les albúmines com a amfitrions. D'aquesta manera, s'ha aportat una base sòlida per a la selecció de substrats i fotoreaccions adequades per al desenvolupament de l'ús de les albúmines sèriques com a fotocatalitzadors.

General Conclusions

The use of albumins as hosts of photochemical reactions has been tackled in the present doctoral thesis. The main conclusions are given next:

- (1) Serum albumins act as matrixes since they are able to confine substrates by protecting them from the media. By this way, proteins modulate guest photobehavior by lengthening intermediate species lifetimes and/or allowing the appearance of new species not observed in solution. A clear example consists in the case of the avobenzene derivatives. Indeed, upon encapsulation, **PrAB** and **MeAB** suffer a significant increase of their triplet lifetimes. Thus, **BrAB** triplet excited state is detected at room temperature while, in the absence of protein, it is only observed in solvent matrix at low temperature.
- (2) The confined medium supplied by serum albumins can affect the photochemistry of reactions occurring in bulk solution by modifying their selectivity, kinetics or yield. This has been clearly illustrated in the Norrish type II fragmentation suffered by **PrAB**. For this substrate, in spite of the final yield being the same, the rate of photoreaction is 2.8 times slower inside the HSA than in acetonitrile solution. This is attributed to the fact that the conformation required for the Norrish type II photoreaction is disfavored inside the protein cavity. By contrast, in the photo-Fries rearrangement, the reaction selectivity for the glutaric acid derivative is improved in BSA; this supports the importance of the cage effect provided by the albumin cavity.
- (3) The protein matrix influences the level of oxygen in the media. An interesting example relies on the [6π] photoelectrocyclization of the *N*-methyldiphenylamine. Here oxygen plays an important and dual role: on the one hand it disfavors the reaction by quenching the amine triplet excited state and, on the other hand, it is necessary in the last oxidative step of the process. Thus, quantum yields in solution are remarkably lower than in protein. This is attributed to the fact that, as the diffusion rate constant of oxygen is different inside the protein, the initial amine triplet excited state (that has a very short lifetime) is hardly quenched; in this way, the cyclization process is optimized in presence of oxygen and the final oxidation is still possible. This very subtle control of the involved kinetic parameters allows optimizing the reaction

quantum yield inside the albumin, the highest being obtained in BSA under oxygen saturated conditions. Remarkably, it corresponds to an upper limit imposed by the intersystem crossing of the starting amine, which is bottleneck.

- (4) The binding site location can affect the outcome of the photoreactions as demonstrated during the photo-Fries rearrangement. Indeed, the use of specially designed substrates with specific affinity for each one of the protein binding sites establishes, both for human and bovine serum albumin, a site dependent quantum yield of product formation. Specifically, the photo-Fries rearrangement is more efficient in binding site I, where hydrophobic interactions prevail.

- (5) The intraprotein medium can be advantageous to study hardly soluble aryl esters in aqueous media. The naphthyl acetate is solubilized through encapsulation within serum albumin site I, where it exhibits a high photo-Fries reaction efficiency.

In conclusion, the work shown in this thesis has proven that albumins should be taken into account as biotic hosts for photochemical reactions. The specific properties provided by these complex biomolecules allow controlling many properties that affect the outcome of the photoreactions (selectivity, quantum yields, etc.), that can not be obtained with synthetic supramolecules. Moreover, this work has also assessed the most important features of albumins as hosts. It provides a solid background for the selection of suitable substrates and photoreactions, and for the future development of serum albumin use as photocatalysts.

Resums

Resum

La fotoquímica supramolecular és una eina molt utilitzada per a controlar la selectivitat, la reactivitat i l'avanç de les reaccions fotoquímiques. Amb ella s'aprofita l'estructura tridimensional de l'amfitrió per a canalitzar la conformació dels estats excitats dels substrats que intervenen en la reacció. En la bibliografia es troben nombrosos casos de reaccions fotoquímiques canalitzades per supramolècules com zeolites, ciclodextrines, micel·les, etc. No obstant això, els exemples amb amfitrions biològics són escassos.

En aquest context, l'objectiu principal de la present tesi doctoral ha estat estudiar reaccions fotoquímiques clàssiques al si de biomolècules ja que, en general, aquestes han demostrat que presenten certs avantatges respecte de les supramolècules abiòtiques. Així doncs, les biomolècules poden proporcionar una interacció molt estreta amb el substrat, cosa que es reflexa en una millora important de la selectivitat i el rendiment de la reacció. Això pot també notar-se a nivell d'estereoselectivitat, atés el caràcter quirals dels llocs d'unió. Aquestes característiques són difícils de trobar en compostos abiòtics a causa del nivell de complexitat que comporta el seu disseny.

Aprofitant l'experiència del nostre grup, s'han escollit les albúmines sèriques com a amfitrions biòtics. Aquesta elecció s'ha basat en dos propietats clau d'aquestes biomolècules: (i) són proteïnes transportadores que actuen com a vehicle d'una àmplia varietat de substàncies endògenes i exògenes; (ii) posseeixen generalment dos llocs d'unió diferenciats: el lloc I (on els substrats s'uneixen majoritàriament a través d'interaccions hidrofòbiques) i el lloc II (en el qual les interaccions predominants són de tipus electrostàtic i per pont d'hidrogen).

La reorganització de foto-Fries va ser la primera reacció model abordada. Concretament, es va dedicar una atenció especial a la influència que podria tenir el lloc d'unió i la classe d'albúmina (HSA, BSA o RSA) sobre el resultat de la reacció (rendiments quàntics i químics). Amb aquesta finalitat, es van considerar com a substrats el succinat i el glutarat del 4-metoxi-1-naftil i hidrogen (**1a** i **1b**) i també l'acetat del 4-metoxi-1-naftil (**1c**) amb motiu de la seua possible interacció específica amb l'albúmina en els llocs II i I, respectivament. Estudis cinètics preliminars van demostrar que el compost **1a** era inestable en tampó fosfat a causa d'una hidròlisi catalitzada intramolecularment. Malgrat que es donava certa estabilització en presència de proteïna, aquest compost es va descartar i es va considerar només el substrat **1b** per als posteriors estudis. Així doncs, es va determinar que els complexos substrat@proteïna tenien una estequiometria de 1:1 per a ambdós

compostos (**1b** i **1c**) amb les tres proteïnes. A més, en el cas de l'HSA i de la BSA, estudis de desplaçament amb sondes fluorescents confirmaren que **1b** i **1c** interaccionaven amb el lloc II i I, respectivament. Existeix, però, una diferència marcada per a la RSA on ambdós substrats desplacen indistintament les sondes corresponents al lloc I i II. Finalment, l'espectroscopia UV-Vis i l'anàlisi per HPLC van demostrar que els rendiments de formació dels fotoproductes (**2b** i **2c**) depenien del lloc d'interacció i també de la classe d'albúmina utilitzada. Així doncs, la reacció era més eficient per al lloc II (substrat **1b**) que per a l'I (substrat **1c**) i per a la BSA que per a l'HSA. En el cas particular de la RSA, es determinaren uns rendiments similars en els dos compostos, cosa que apuntava cap a la presència d'un sol lloc d'unió en aquesta proteïna o de llocs d'unió amb propietats molt semblants, tal com es postula a la bibliografia.

En la segona part, s'estudiaren alguns derivats d'avobenzona (**AB**, un filtre solar àmpliament utilitzat) substituïts en la posició α dels carbonils amb un brom (**BrAB**), un grup metil (**MeAB**) o un propil (**PrAB**). Com que no existien dades sobre les propietats fotofísiques i fotoquímiques de la **BrAB**, inicialment es va realitzar un estudi complet de caracterització d'aquesta. Les mesures d'absorbància i fosforescència junt a la caracterització per RMN demostraren que la **BrAB**, així com els altres derivats **MeAB** i **PrAB**, només existeix sota la seua forma β -dicetònica. A més, mitjançant la fotòlisis de flaix làser s'observà la formació del radical de l'**AB**, que procedia de la fotodeshalogenació de la **BrAB**. La transició triplet-triplet no es va detectar a 295 K en dissolució, però s'obtingué en experiments a baixa temperatura (77 K). La fotòlisi en estat estacionari va donar lloc a la formació d'una barreja complexa de fotoproductes, entre aquests l'**AB**. Seguidament s'estudià l'efecte de la interacció dels tres derivats d'**AB** amb HSA sobre els seus estats excitats. Així doncs, en presència de proteïna es detectà, a 295 K, l'absorció transitòria corresponent al triplet de la **BrAB**; s'observà també un augment del temps de vida de l'estat triplet de la **MeAB** i la **PrAB**. Aquests resultats reflecteixen l'efecte protector de la cavitat proteica front a l'atac per oxigen i front al procés d'autodesactivació dels substrats; a més, també reflecteixen l'entorn confinat proporcionat per l'albúmina que, en el cas de la **BrAB**, arriba a mimetitzar la matriu rígida obtinguda a baixa temperatura. Pel que fa a fotoreacció, s'estudià la fragmentació de Norrish tipus II de la **PrAB** que donava lloc a la formació d'**AB**. Així doncs, es determinà que la reacció és més lenta en presència d'albúmina, tal com ho demostra el rendiment quàntic, que és 2.8 vegades menor ($\phi_R = 1.4 \times 10^{-2}$ i 3.9×10^{-2} en presència d'HSA i en acetonitril, respectivament). Aquestes dades es correlacionen amb l'augment del temps de vida de l'estat triplet de la **PrAB** complexat amb l'HSA. Per tant, la

conformació necessària per al procés intramolecular d'abstracció de l'hidrogen en γ pel carbonil (reacció de Norrish II) sembla estar desafavorida en la cavitat proteica.

Per últim, s'estudià la fotoelectrociclació [6 π] de la *N*-metildifenilamina (**A**). Aquest tipus de reaccions són de gran importància per a aplicacions com la síntesi de productes naturals, fotocromisme, dispositius moleculars i actinometria. La reacció, en el cas particular d'**A**, té lloc a través d'un mecanisme complex que involucra el seu estat triplet ($^3\mathbf{A}^*$). A partir d'aquest, es produeix un tancament adiabàtic de l'anell per a formar el triplet de l'*N*-metildihidrocarbazol ($^3\mathbf{B}^*$), el qual decau al seu estat fonamental (**B**), que posteriorment és oxidat per l'oxigen del medi per a donar l'*N*-metilcarbazol (**C**) amb un rendiment quasi quantitatiu. Així doncs, l'oxigen juga un paper doble: d'una banda, desafavoreix la reacció perquè desactiva l'estat triplet de l'amina ($^3\mathbf{A}^*$), a partir del qual es desencadena tot el procés; però, de l'altra, aquest oxigen és requerit com a oxidant en l'últim pas. Les cinètiques de fotoreacció, determinades mitjançant mesures d'absorbància i de fluorescència, demostraren que els rendiments quàntics eren majors en presència d'albúmina. L'estudi dels intermedis de reacció per fotòlisi de flaix làser reafirmà l'efecte matriu aportat per la proteïna, ja que les espècies observades tenien un temps de vida major en presència de la biomolècula. En aquest sentit, es va centrar l'atenció en el senyal de l'estat fonamental de **B** ja que proporcionava informació sobre la interacció substrat@proteïna (sobre l'estequiometria del complex i sobre el lloc d'unió) i també sobre l'eficiència del procés de ciclació. La fotociclació, doncs, es va maximitzar en el microentorn proporcionat pel lloc d'unió I de l'HSA i la BSA. Tant la determinació dels rendiments quàntics com la detecció de les espècies transitòries demostraren que l'encapsulació en la proteïna aportava un control subtil dels nivells d'oxigen; d'aquesta manera, es va poder assolir el límit superior en el rendiment quàntic, imposat pel creuament intersistema cap a l'estat excitat triplet de l'amina ($^3\mathbf{A}^*$).

Resumen

La fotoquímica supramolecular es una herramienta muy utilizada para controlar la selectividad, la reactividad y el avance de las reacciones químicas. Con ella se aprovecha la estructura tridimensional del anfitrión para canalizar la conformación de los estados excitados de los sustratos que intervienen en la reacción. En la literatura, se encuentran numerosos casos de fotorreacciones catalizadas por supramoléculas como zeolitas, ciclodextrinas, micelas, etc. No obstante, los ejemplos con biomoléculas son escasos.

En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis ha sido estudiar reacciones fotoquímicas clásicas en el seno de biomoléculas ya que, en general, éstas han demostrado presentar ciertas ventajas respecto a las supramoléculas abióticas. Así pues, las biomoléculas pueden proporcionar una interacción muy estrecha con el sustrato, cosa que se refleja en una mejora importante de la selectividad y del rendimiento de la reacción. Esto puede también notarse a nivel de estereoselectividad, debido al carácter quiral de los sitios de unión. Estas características son difíciles de encontrar en compuestos abióticos a causa de la complejidad que conlleva su diseño.

Aprovechando la experiencia de nuestro grupo, se han escogido las albúminas séricas como anfitriones bióticos. Esta elección se ha basado en dos propiedades claves de dichas biomoléculas: (i) son proteínas transportadoras que actúan como vehículo de una amplia variedad de sustancias endógenas y exógenas; (ii) poseen generalmente dos sitios de unión diferenciados: el sitio I (donde los sustratos se unen mayoritariamente a través de interacciones hidrofóbicas) y el sitio II (en el cual las interacciones predominantes son de tipo electrostático y por puente de hidrógeno).

La reorganización de foto-Fries fue la primera reacción modelo abordada. Concretamente, se dedicó una atención especial a la influencia que podría tener el sitio de unión y la clase de albúmina (HSA, BSA o RSA) sobre el resultado de la reacción (rendimientos cuánticos y químicos). Con este fin, se consideraron como sustratos el succinato y el glutarato del 4-metoxi-1-naftilo e hidrógeno (**1a** y **1b**) así como el acetato de 4-metoxi-1-naftilo (**1c**) por su posible interacción específica con la albúmina en los sitios II y I, respectivamente. Estudios cinéticos preliminares demostraron que el compuesto **1a** era inestable en tampón fosfato debido a una hidrólisis catalizada intramolecularmente. A pesar de que se daba cierta estabilización en presencia de proteína, este compuesto se descartó y se consideró sólo el sustrato **1b** para los posteriores estudios. Así pues, se determinó que los complejos sustrato@proteína tenían una estequiometría de 1:1 para ambos compuestos

(**1b** y **1c**) con las tres proteínas. Además, en el caso de la HSA y de la BSA, estudios de desplazamiento con sondas fluorescentes confirmaron que **1b** y **1c** interaccionaban con el sitio II y I, respectivamente. Existe, no obstante, una diferencia marcada para la RSA donde ambos sustratos desplazan indistintamente las sondas correspondientes al sitio I y II. Finalmente, la espectroscopía UV-Vis y el análisis por HPLC demostraron que los rendimientos de formación de los fotoproductos (**2b** y **2c**) dependen del sitio de interacción y también de la clase de albúmina utilizada. Así pues, la reacción era más eficiente para el sitio II (sustrato **1b**) que para el I (sustrato **1c**) y para la BSA que para la HSA. En el caso particular de la RSA, se determinaron unos rendimientos similares en los dos compuestos, apuntando hacia la presencia de un solo sitio de unión en esta proteína o de sitios con propiedades muy semejantes, tal como se postula en la literatura.

En la segunda parte, se estudiaron algunos derivados de avobenzona (**AB**, un filtro solar ampliamente utilizado) sustituidos en la posición α de los carbonilos con un bromo (**BrAB**), un grupo metilo (**MeAB**) o un propilo (**PrAB**). Al no existir datos sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de la **BrAB**, inicialmente se realizó un estudio completo de caracterización de ésta. Las medidas de absorbancia, y fosforescencia junto a la caracterización por RMN demostraron que la **BrAB**, como los otros derivados **MeAB** y **PrAB**, sólo existe bajo su forma β -dicetónica. Además, mediante fotólisis de destello láser se observó la formación del radical de la **AB**, que procedía de la fotodeshalogenación de la **BrAB**. La transición triplete-triplete no se detectó a 295 K en disolución, pero se obtuvo en experimentos a baja temperatura (77 K). La fotólisis en estado estacionario dio lugar a la formación de una mezcla compleja de fotoproductos, entre ellos la **AB**. Seguidamente se estudió el efecto de la interacción de los tres derivados de **AB** con HSA sobre sus estados excitados. Así pues, en presencia de proteína se detectó, a 295 K, la absorción transitoria correspondiente al triplete de **BrAB**; se observó también un aumento del tiempo de vida del estado triplete de la **MeAB** y la **PrAB**. Estos resultados reflejan el efecto protector de la cavidad proteica frente al ataque por oxígeno y frente al proceso de auto-desactivación de los sustratos; además también reflejan el entorno confinado proporcionado por la albúmina que, en el caso de la **BrAB**, alcanza a mimetizar la matriz rígida obtenida a baja temperatura. En cuanto a fotorreacción, se estudió la fragmentación de Norrish tipo II de la **PrAB** que daba lugar a la formación de **AB**. Así, se determinó que la reacción es más lenta en presencia de albúmina, tal y como lo demuestra el rendimiento cuántico, que es 2.8 veces menor ($\phi_R = 1.4 \times 10^{-2}$ y 3.9×10^{-2} en presencia de HSA y en acetonitrilo, respectivamente). Estos datos se correlacionan con el aumento del tiempo de vida del

estado triplete de la **PrAB** complejado con la HSA. Así, la conformación necesaria para el proceso intramolecular de abstracción del hidrógeno en γ por el carbonilo (reacción de Norrish II) parece estar desfavorecida en la cavidad proteica.

Por último, se estudió la fotoelectrociclación [6 π] de la *N*-metildifenilamina (**A**). Este tipo de reacciones son de suma importancia para aplicaciones como la síntesis de productos naturales, fotocromismo, dispositivos moleculares y actinometría. La reacción, en el caso particular de **A**, tiene lugar a través de un mecanismo complejo que involucra su estado triplete ($^3\mathbf{A}^*$). A partir de éste se produce un cierre adiabático del anillo para formar el triplete del *N*-metildihidrocarbazol ($^3\mathbf{B}^*$) el cual decae a su estado fundamental (**B**), que posteriormente es oxidado por el oxígeno del medio para dar el *N*-metilcarbazol (**C**) con un rendimiento casi cuantitativo. Así pues, el oxígeno juega un papel doble: por un lado desfavorece la reacción porque desactiva el estado triplete de la amina ($^3\mathbf{A}^*$), a partir de la cual se desencadena todo el proceso pero, por otro, dicho oxígeno es requerido como oxidante en el último paso. Las cinéticas de fotorreacción, determinadas mediante medidas de absorbancia y de fluorescencia, demostraron que los rendimientos cuánticos eran mayores en presencia de albúmina. El estudio de los intermedios de reacción por fotólisis de destello láser reafirmó el efecto matriz aportado por la proteína, ya que las especies observadas tenían un tiempo de vida mayor en presencia de la biomolécula. En este sentido, se centró la atención en la señal del estado fundamental de **B** ya que proporcionaba información sobre la interacción sustrato@proteína (acerca de la estequiometría del complejo y del sitio de unión) así como sobre la eficiencia del proceso de ciclación. La fotociclación, pues, se maximizó en el microentorno proporcionado por el sitio I de la HSA y la BSA. Tanto la determinación de los rendimientos cuánticos como la detección de las especies transitorias demostraron que la encapsulación en la proteína aportaba un control sutil de los niveles de oxígeno; de esta manera se pudo alcanzar el límite superior en el rendimiento cuántico, impuesto por el cruce intersistemas hacia el estado excitado triplete de la amina ($^3\mathbf{A}^*$).

Summary

The use of supramolecular photochemistry has been largely exploited to control the reactivity, selectivity and progress of chemical reactions. In this context, advantage has been taken of the host tridimensional structure to channel the conformation of the substrate excited states involved in the reaction. A number of photoreactions catalyzed by supramolecules such as zeolites, cyclodextrins, micelles, etc. have been reported in the literature. However, examples involving biomolecules are still scarce.

With this background, the main objective of this thesis has been to study classical photochemical reactions within biomolecules as they have generally demonstrated to present some advantages in the supramolecular interactions in comparison with abiotic hosts. Thus, biomolecules may provide a close interaction with the substrate, which could be reflected in an important increase of the reaction selectivity and quantum yield. In principle, the stereoselectivity can also be optimized as a result of the chiral character of binding sites. These characteristics are difficult to find in abiotic supramolecular compounds due to the high complexity of their design.

Taking advantage of our group experience, serum albumins have been selected as biotic hosts. This choice has been based on two key properties of albumins: (i) they are transport proteins and act as vehicles of a large variety of endogenous or exogenous substances, (ii) they possess generally two different binding sites called site I and site II, where the substrates bind mainly through hydrophobic and H-bond/electrostatic interactions, respectively.

Photo-Fries rearrangement was the first model reaction considered. Specifically, a special attention has been devoted to the influence that the binding site and the species of serum albumin (from human, bovine or rabbit source) should have on the reaction chemical and quantum yields. With this aim, 4-methoxy-1-naphthyl hydrogen succinate or glutarate (**1a** or **1b**) and 4-methoxynaphthyl acetate (**1c**) have been selected as substrates due to their potential interaction in site II and I, respectively. Preliminary kinetic studies demonstrated that an intramolecularly catalyzed hydrolysis renders compound **1a** unstable in phosphate buffer. Although **1a** suffered a weak stabilization in the presence of protein, this compound was ruled out and replaced by **1b**. A 1:1 stoichiometry was determined for the substrate@protein complexes for combination of substrates with each one of the three albumins. Thus, in the case of HSA and BSA, experiments using fluorescence probe displacement from HSA and BSA binding sites, confirmed that **1b** and **1c** mainly interact in

site II and I, respectively. However, a marked difference exists in the case of RSA, where both substrates displaced the specific probes from both sites. Finally, UV-Vis spectroscopy and HPLC analysis demonstrated that quantum yields of photoproducts formation (**2b** and **2c**) are dependent not only on the binding site but also on the albumin species used. Thus, the reaction was more efficient in site II (substrate **1b**) than in site I (substrate **1c**) and in BSA more than in HSA. In the special case of RSA, same quantum yields were determined for both compounds pointing to the presence of only one common binding site or of two sites with similar binding properties, as it is proposed in the literature.

In a second part, derivatives of avobenzone (**AB**, a largely used solar filter) substituted in the α position of the carbonyl moieties with a bromide (**BrAB**), a methyl (**MeAB**) or a propyl group (**PrAB**) were considered. Since no data were available concerning the photophysical and photochemical properties of **BrAB**, a complete spectroscopic characterization was performed. Absorption and phosphorescence together with NMR spectra demonstrated that **BrAB** exists only as its β -diketo form, like the other derivatives **MeAB** and **PrAB**. No triplet-triplet transition was detected by laser flash photolysis in solution at 295 K, but it was observed in low temperature experiments at 77 K. However, at room temperature, formation of **AB** radical arising from a photodehalogenation process was demonstrated. Steady-state photolysis showed the formation of a complex mixture of photoproducts, including **AB**. Then, the influence of protein encapsulation on the three **AB** derivatives excited states was investigated. Remarkably, the transient absorption corresponding to **BrAB** triplet excited state was detected in the presence of HSA at 295 K; an increase of **MeAB** and **PrAB** triplet excited state lifetimes was also observed. These results illustrate not only the protecting effect of the protein cavity towards oxygen attack and substrate selfquenching but also the confined environment provided by the albumin, which for **BrAB** could manage to mimic the rigid matrix at low temperature. Next, albumin effect on the Norrish type II fragmentation of **PrAB** leading to **AB** formation was considered. It was determined that the reaction quantum yield is 2.8 times lower in the presence of protein ($\phi_R = 1.4 \times 10^{-2}$ and 3.9×10^{-2} for HSA and acetonitrile, respectively). These data are in agreement with the increase of triplet excited state lifetime of encapsulated **PrAB**. Thus, the conformation required for the intramolecular γ hydrogen abstraction by the carbonyl group (Norrish II reaction) appears to be disfavored inside the protein cavity.

Finally, $[6\pi]$ photoelectrocyclization of *N*-methyldiphenylamine (**A**) was studied. This class of reactions is of paramount importance for applications such as natural product synthesis, photochromism, molecular devices and actinometry. The reaction, in the special

case of **A**, takes place through a complex mechanism that involves its triplet excited state ($^3\mathbf{A}^*$). At this point, an adiabatic ring closure occurs to form *N*-methyl-dihydrocarbazole in its triplet excited state ($^3\mathbf{B}^*$), which then decays to its ground state (**B**). The latter is subsequently oxidized by oxygen to give almost quantitatively *N*-methylcarbazole (**C**). Thus, oxygen plays a dual role: on the one hand it disfavors the reaction by quenching the amine triplet excited state ($^3\mathbf{A}^*$), and, on the other hand, it is required as an oxidant in the last step. Kinetics of reaction, determined by UV-Vis absorption and fluorescence emission, demonstrated that quantum yields are higher in the presence of albumin. Reaction intermediates monitored by laser flash photolysis exhibited a longer lifetime in the presence of albumin, which supports the matrix effect provided by the biomolecule cavity. The attention was especially centered on the signal corresponding to the ground state of **B**, because it is able to provide information not only on the substrate@protein interaction (complex stoichiometry, binding site) but also on the efficiency of the cyclization process. In this way, it was shown that photocyclization can be optimized in the microenvironment provided by site I of HSA and BSA. Determination of quantum yields, as well as detection of transient species, demonstrated that protein encapsulation contributes to a subtle control of the oxygen levels, which allowed us reaching the upper limit imposed by the intersystem crossing quantum yield to the amine triplet excited state $^3\mathbf{A}^*$.

Annex: Publicacions

Publicacions relacionades amb la present tesi doctoral

M. Marín, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda. "Site-Dependent Photo-Fries Rearrangement within Serum Albumins". *The Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, 115, 2910–2915.

M. Marín, V. Lhiaubet-Vallet, C. Paris, M. Yamaji, M. A. Miranda. "Photochemical and Photophysical Properties of Dibenzoylmethane Derivatives within Protein". *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2011**, 10, 1474–1479.

M. Marín, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda. "Enhanced Photochemical [6 π] Electrocyclization Within the Lipophilic Protein Binding Site". *Organic Letters*, **2012**, 14, 1788–1791.

Altres publicacions

V. Lhiaubet-Vallet, M. Marín, O. Jimenez, O. Gorchs, C. Trullas, M. A. Miranda. "Filter–Filter Interactions. Photostabilization, Triplet Quenching and Reactivity with Singlet Oxygen". *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2010**, 9, 552–558.

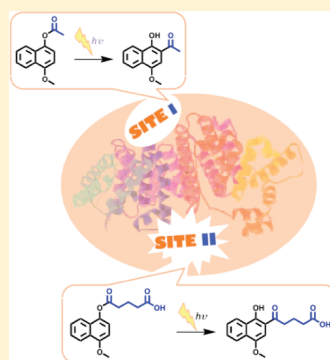
M. Marín, V. Lhiaubet-Vallet, O. Jimenez, O. Gorchs, C. Trullas, M. A. Miranda. "Interacció entre Filtres Solars". *Revista de la Societat Catalana de Química*, **2011**, 1, 66-72.

Site-Dependent Photo-Fries Rearrangement within Serum Albumins

Mireia Marin, Virginie Lhiaubet-Vallet,* and Miguel Angel 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

ABSTRACT: In the present work, the influence of serum albumins as biological hosts on the well-established photo-Fries rearrangement has been investigated. For this purpose, 4-methoxy-1-naphthyl hydrogen succinate and glutarate (1a,b) as well as the corresponding acetate (1c), have been selected as substrates. Special attention has been devoted to the effect of the binding site location and serum albumin species on the outcome of the reaction. In a first stage, the stabilizing effect of the biomacromolecule on the intramolecularly catalyzed hydrolysis of succinate 1a was observed. Then, 1b and 1c were considered for their interaction with proteins in site II and site I, respectively. Site assignment was confirmed by fluorescence displacement experiments with dansylamide and dansylglycine. Moreover, spectroscopic analysis showed a site dependent quantum yield of product formation for human and bovine serum albumin.



INTRODUCTION

The use of supramolecular systems to influence the outcome of organic photoreactions is an attractive approach that has been widely explored over the last 2 decades.¹ Noteworthy, in spite of the interesting properties of biological systems to act as supramolecular hosts in aqueous media, proteins have been rarely used in such applications. Indeed, the potential of light has been exploited by nature only in few enzymes. They correspond for example to the protochlorophyllide reductase involved in photosynthesis, or the two DNA repair enzymes that catalyze electron transfer induced fragmentation of thymine photodimers, namely DNA photolyase and (6-4)-photoproduct lyase.¹¹

Serum albumins (SA) bind a large variety of molecules; however their role as hosts for photochemical reactions remains practically unexplored. A few investigations have focused on stereoselective photoprocesses of 1,1'-binaphthol, ketoprofen and carprofen.² Photochirogenesis in the bimolecular [4 + 4] photodimerization of 2-anthracenecarboxylate has also been reported for human and bovine serum albumins (abbreviated HSA and BSA, respectively).³

Indeed, HSA contains numerous binding sites, but it is generally accepted that organic ligands bind in regions located in hydrophobic cavities of subdomains IIA and IIIA, the so-called site I (warfarin site) and site II (diazepam site) following Sudlow's classification.⁴ Binding to site I is dominated by strong hydrophobic interactions with most neutral, bulky heterocyclic compounds; by contrast, dipole-dipole, van der Waals and/or H-bonding interactions are mainly involved in ligand

interaction with site II.⁴ Thus, a high specificity is conferred to each binding cavity, so that a small chemical modification of the ligand can dramatically change its binding properties. Actually, the arylpropionic acid flurbiprofen mainly binds to site II, whereas its methyl ester is preferentially located in site I.⁵ Albumins of other species exhibit a high sequence similarity to HSA; however, the binding properties and the photophysical/photochemical behavior of guest molecules can differ significantly.^{5b}

In this work, the well-known photo-Fries rearrangement of aryl esters has been selected as a probe reaction to examine the influence of serum albumin as microheterogeneous medium, considering in particular the binding site interactions. Along this unimolecular photoreaction, homolytic cleavage of the aryl ester C-O bond occurs from the singlet excited state and gives rise to the typical *o*- and/or *p*-acyl phenols.⁶

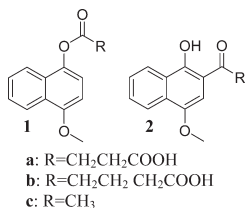
Specifically, compounds 1a, 1b, and 1c (Chart 1) have been selected in order to fulfill the following requirements: (i) selective irradiation of the naphthalene-derived substrate at $\lambda > 310$ nm where albumins do not absorb, (ii) reduction of the number of photo-Fries products due to 4-methoxy substitution, and (iii) affinity to different albumin binding sites associated with the presence or absence of a carboxylic acid in the side chain.

Received: January 28, 2011

Revised: February 7, 2011

Published: March 08, 2011

Chart 1. Structures of the Substrates (1a, 1b, and 1c) and Their Corresponding Photoproducts (2a, 2b, and 2c)



EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Fatty acid free albumins (with purity $\geq 98\%$), 4-methoxy-1-naphthol, glutaric and succinic anhydride, acetyl chloride, and solvents were purchased from Sigma-Aldrich.

Synthesis of Naphthyl Esters.⁷ 4-Methoxy-1-naphthol (2.5 mmol) was dissolved in an ice-cold aqueous solution of sodium hydroxide (2.5 mmol in 50 mL). Then, glutaric or succinic anhydride (2.5 mmol) was added, the mixture was stirred for 5 min and acidified with hydrochloric acid until pH = 3. The resulting precipitate was filtered, dried and recrystallized with toluene.

4-Methoxy-1-naphthyl Hydrogen Succinate (1a). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.26 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.04 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 6.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 174.7, 172.5, 153.7, 140.2, 127.7, 126.8, 126.2, 125.5, 122.0, 121.1, 117.8, 102.8, 55.0, 28.9, 28.6. HRMS- EI^+ : calculated for C₁₅H₁₄O₅, 274.0841; found, 274.0852.

4-Methoxy-1-naphthyl Hydrogen Glutarate (1b). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.29 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.16 (d, 1H, J = 8.29 Hz), 6.79 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 2.86 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.62 (t, 7.4 Hz, 2H), 2.21 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 Hz): δ 177.7, 171.8, 153.5, 139.8, 127.4, 127.0, 126.2, 125.7, 122.5, 120.8, 117.7, 102.8, 55.7, 33.1, 32.7, 19.9; HRMS- EI^+ : calculated for C₁₆H₁₆O₅, 288.0998; found, 288.0990.

Absorption and Emission. A double beam Varian UV-vis model Cary 300 Scan spectrophotometer was used to measure absorption spectra. Steady-state fluorescence experiments were carried out on a Photon Technology International (PTI) LPS-220B spectrofluorometer.

Kinetics of Degradation of 1a. Reactions of freshly prepared 1a (1.7×10^{-4} M) in PBS (0.1 mM, pH = 7.4) and HSA (1/1 molar ratio) were monitored by UV-vis absorption spectroscopy at 337 nm at 298 K. Molar absorption coefficients of 3050 and 4300 M⁻¹ cm⁻¹ were considered to calculate 4-methoxy-1-naphthol concentration in PBS and HSA, respectively. First order kinetics of hydrolysis was obtained in all cases.

Photoirradiation Systems. For preparative irradiation, a multilamp photoreactor equipped with UVB-lamps (maximum output at ca. 300 nm) was used. In the case of monochromatic irradiation for kinetic measurements, a Microbeam system (model L-201), including a 150 W xenon lamp coupled with a monochromator (model 101), was used.

Photorearrangement Quantum Yields and Irradiation Kinetics in Different Media. Solutions of 1b in PBS or 1b,c in

acetonitrile (ca. 80 μ M) and of *N*-methyl-diphenylamine (ca. 160 μ M) in methylcyclohexane (quantum yield of 0.42 at room temperature, under air saturated conditions⁸) were prepared in 10 mm \times 10 mm quartz cuvettes. Absorbances were matched at λ = 321 nm (ca. 0.35). Irradiation was carried out at the monochromatic wavelength of 321 nm with slit bandwidth of 2.5 nm. Kinetics of photoproduct formation was obtained by fitting absorbance at 387 nm versus irradiation time. Solutions of 1b,c (ca. 80 μ M) and the desired serum albumin were prepared at 1/1 molar ratio. Irradiation and quantitation of photoproduct formation were performed as described for PBS media. Kinetics of photoproduct appearance was obtained by plotting absorbance versus irradiation time at 393 nm, 397 or 392 nm in HSA, BSA, or RSA, respectively. *N*-Methyl-diphenylamine in methylcyclohexane was also used as an actinometer.

Solutions of 1b (1.7×10^{-4} M) in PBS alone and in the presence of HSA or BSA (1/1 molar ratio) were prepared and irradiated with monochromatic light at 321 nm. The reaction mixtures were analyzed by HPLC using a Kromasil 100 C18 (0.4 \times 25 cm, 5 μ m) with 50% water (acidified with acetic acid at pH = 3) and 50% acetonitrile as eluent, flow at 1 mL \times min⁻¹.

In the case of HSA or BSA solutions, the protein was precipitated before injection using the following procedure. After addition of cold acetonitrile (4 mL at -50 $^{\circ}$ C) to the albumin solution (1 mL), it was kept in the freezer (at -50 $^{\circ}$ C) for 1 h and then it was centrifuged at 6000 rpm during 45 min. The liquid phase was extracted carefully and evaporated under vacuum. The solid residue was dissolved in 1 mL of methanol, and 20 μ L of this solution were analyzed by HPLC. Samples of pure 1b and 2b, treated under identical conditions as described above, were used as standards to confirm complete recovery of the compounds and to determine conversion and product formation yields.

4-(1-Hydroxy-4-methoxy-2-naphthyl)-4-oxobutanoic Acid (2a). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.35 (m, 1H), 8.15 (m, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.41 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 6.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 206.2, 177.3, 157.9, 149.3, 131.8, 131.0, 128.0, 127.4, 125.4, 123.3, 113.3, 101.86, 56.6, 35.2, 29.4. HRMS- ESI^+ : calculated for C₁₅H₁₅O₅ [M + H⁺], 275.0919; found, 275.0929.

5-(1-Hydroxy-4-methoxy-2-naphthyl)-5-oxopentanoic Acid (2b). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.42 (m, 1H), 8.39 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.21 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.10 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 205.7, 175.5, 156.3, 147.3, 129.9, 129.1, 126.0, 125.6, 123.6, 121.4, 111.4, 100.2, 54.7, 33.3, 32.4, 19.4. UV: ϵ = 5700 M⁻¹ cm⁻¹ (in PBS at 387 nm), 5200 M⁻¹ cm⁻¹ (in HSA at 393 nm), 5900 M⁻¹ cm⁻¹ (in BSA at 397 nm), 6000 M⁻¹ cm⁻¹ (in RSA at 392 nm). HRMS- ESI^+ : calculated for C₁₆H₁₇O₅ [M + H⁺], 289.1076; found, 289.1077.

Fluorescence Displacement Experiments. Solutions of DG/SA and DA/SA (3×10^{-5} M, 1/1 molar ratio) were prepared in PBS. Then, increasing amounts of displacer (4×10^{-2} M stock solutions) were added to the cuvettes, and variation of the emission intensity (λ_{exc} = 350 nm) was followed at 475 and 492 nm for DG and DA solutions, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Esters 1a and 1b were synthesized by reaction of 4-methoxy-1-naphthol in basic aqueous solution with succinic and glutaric anhydride, respectively. Reaction of 4-methoxy-1-naphthol with acetyl chloride gave 1c as previously described.⁹

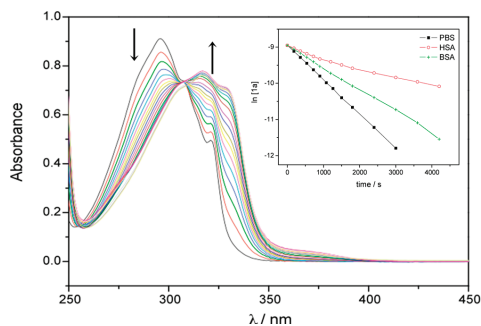


Figure 1. Room temperature decomposition of **1a** (1×10^{-4} M) in PBS (from 0 to 140 min). Inset: semilogarithmic plot of the decomposition of **1a** vs time under different conditions.

In a first stage, the succinic acid derivative **1a** was left stand in the dark in phosphate buffer (PBS), both in the presence and in the absence of HSA. Compound **1a** underwent a fast decomposition in PBS (Figure 1), while it became relatively stabilized in the presence of albumin. This dark process can be safely attributed to the previously described intramolecularly catalyzed hydrolysis of succinate or maleate esters through a 5-membered ring transition state.^{7,10} The course of the reaction was conveniently monitored by UV spectroscopy, through formation of 4-methoxy-1-naphthol at 337 nm. The kinetics of hydrolysis followed a first order law (Figure 1 inset), with rate constants of 9.5×10^{-4} and $3.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ in PBS and HSA, respectively. A similar effect was observed in BSA, where the rate constant was $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Thus, after 1500 s, the percentage of **1a** hydrolysis was roughly 70, 25, and 50% of in PBS, HSA and BSA, respectively. The stabilizing effect of the proteins can be attributed to the rigidity of the binding cavity that reduces the mobility of the succinic side chain, preventing formation of the 5-membered transition state required for the intramolecular reaction.

After establishing the dark reactivity of **1a**, this compound was irradiated at $\lambda = 321$ nm in PBS, alone and in the presence of HSA (1/1 molar ratio). A new band appeared at ca. 390 nm upon irradiation, which was assigned to photo-Fries product **2a** by comparison with the pure isolated compound. In the absence of albumin, the growth of a long-wavelength absorption band at ca. 600 nm was also observed. On the basis of HPLC analysis, it was assigned to naphthol oxidation byproducts. In contrast, the confined environment provided by serum albumins partially protected compound **1a** from intramolecularly catalyzed hydrolysis, thus improving the experimental conditions for a cleaner photo-Fries rearrangement in neutral aqueous solution.

In view of the experimental difficulties associated with the intramolecularly catalyzed hydrolysis of **1a**, the longer-chain glutaric acid derivative **1b** and the acetate **1c** were selected to investigate a possible site-dependence of photo-Fries rearrangement. Actually, when the stability of these compounds versus hydrolysis was checked, less than 2% of degradation was found after 200 min.

In a first stage, interaction between the substrates and albumin was investigated by means of spectroscopic measurements. Thus, absorption spectra of **1b** or **1c** (8×10^{-5} M) were run in the presence of increasing amounts of HSA; it was observed that the presence of the protein results in a bathochromic shift, together

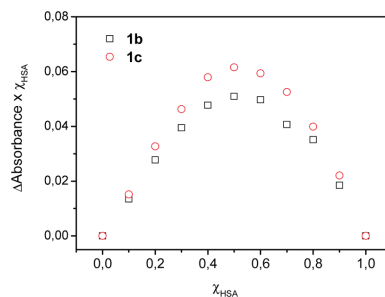


Figure 2. Job plots for complexes between HSA and **1b** or **1c**. Absorbance changes at 327 nm were plotted against the HSA molar fraction at a total concentration (**1** + HSA) of 1.0 and 1.2×10^{-4} M for **1b** and **1c**, respectively.

with a decrease of the absorbance at 327 nm. Then, the stoichiometry of the complexes was determined using the Job plot analysis. For this purpose, absorbance changes were plotted against the HSA molar fraction, keeping the total molar concentration (**1** + HSA) constant. As shown in Figure 2, a 1:1 complex is formed in both cases.

Next, binding site location and affinity constants were determined by an established methodology that consists in the displacement of specific fluorescent probes by non emitting compounds specific for the same binding site. Thus, dansylamide (DA) and dansylglycine (DG) were taken as site I and site II markers, respectively.¹¹

In HSA, selective excitation at 350 nm gave rise to fluorescence emission centered at 492 nm (DA) or 475 nm (DG). Figure 3A shows the changes observed upon addition of (*S*)-ibuprofen ((*S*)-IBP) or warfarin, well-known site II or site I ligands, respectively. As expected for a site II ligand, addition of increasing amounts of (*S*)-IBP to a DG/HSA solution (1/1 molar ratio) induced a characteristic decrease of its emission intensity. Thus, DG was displaced out of the protein exhibiting as a result a weaker and red-shifted emission. For DA/HSA, a similar behavior was observed with warfarin as displacer.

By contrast, only marginal emission changes were detected for the combination DG/HSA/warfarin. Indeed, DG located in site II is hardly displaced out of the protein by this site I ligand. A particular behavior was observed for the combination DA/HSA/(*S*)-IBP, where the increase of the fluorescence signal can be explained as the result of an allosteric effect, i.e. the binding of (*S*)-IBP with albumin in site II modifies site I interaction of DA. Similar examples of allosteric effects can be found in the literature.¹²

The same methodology was applied to **1b** and **1c** as displacers (Figure 3B). Fluorescence changes of DG/HSA or DA/HSA mixtures in the presence of **1b** were comparable to those observed for (*S*)-IBP, whereas the displacement capabilities of **1c** were similar to those found for warfarin. Therefore, it was concluded that **1b** and **1c** were located in site II and site I, respectively.

Then, binding constants of **1b** and **1c** were evaluated by a comparative methodology, considering the reported values of $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for ibuprofen and warfarin, respectively.¹³ Indeed, an average ratio of 6 was measured between ibuprofen and **1b**, which corresponds to a binding

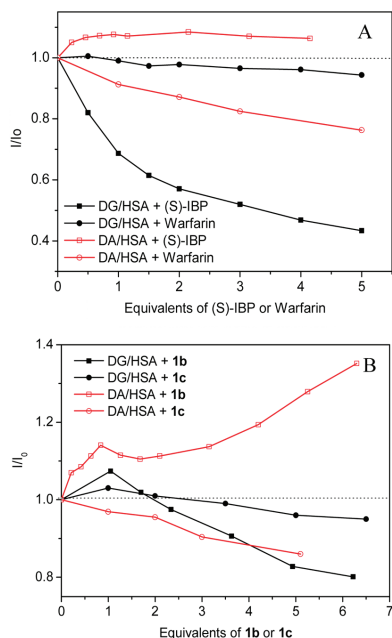


Figure 3. (A) Variation of relative fluorescence intensity observed for probe-albumin solutions (4×10^{-5} M, 1/1 molar ratio) at $\lambda_{em} = 492$ nm for DA-HSA and 475 nm for DG-HSA, upon addition of warfarin and (S)-IBP. (B) Analogous experiments using **1b** and **1c** as displacers.

constant $K(\mathbf{1b})$ of 6.0×10^5 M⁻¹. The same methodology applied to **1c**, taking warfarin as standard, gave $K(\mathbf{1c})$ of 2.3×10^5 M⁻¹.

Phosphate buffer solutions of **1b** and **1c** were UV-irradiated ($\lambda = 321$ nm) in the presence of HSA (1/1 molar ratio). Photorearrangement of water-soluble **1b** was also performed in PBS. The different absorption spectra of the starting compound **1** and their corresponding photo-Fries product **2** made it possible to monitor the photoreaction by UV-vis spectroscopy. The results obtained for **1b** in PBS (Figure 4A), showed a moderate increase of the long-wavelength absorption at ca. 600 nm, due to oxidation of naphthol, which was absent in the presence of HSA (Figure 4A, inset).

Quantum yields (ϕ_R) of **2b** and **2c** formation were determined using *N*-methylidiphenylamine as actinometer. As shown in Table 1 and in Figure 4B, the presence of HSA significantly affected photoproduct formation. Thus, the quantum yield of **2b** decreased down to 37% of the values in PBS. By contrast, photorearrangement of **1c**, which was only soluble in PBS upon addition of the protein, occurred with a quantum yield similar to that obtained in acetonitrile ($\phi_R = 0.14$).

Moreover, a remarkable difference was observed for HSA-mediated photoreaction of **1b** and **1c**, with compound **2c** being formed 2.3 times more efficiently than **2b**. These results, together with the displacement data, strongly support a site-dependent reactivity of the intraprotein photo-Fries rearrangement.

Different albumin microenvironments were considered by studying the effect of bovine and rabbit serum albumins (BSA

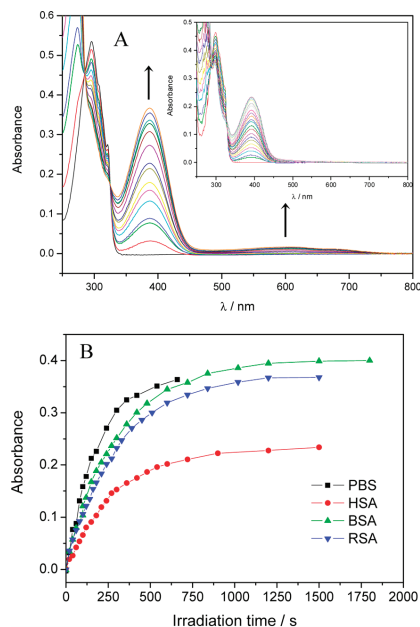


Figure 4. (A) UV-vis absorption spectra of compound **1b** (8.6×10^{-5} M) irradiated with monochromatic light at 321 nm in PBS (from 0 to 11 min). Inset: irradiation of **1b** in the presence of HSA (8.3×10^{-5} M), 1/1 molar ratio, from 0 to 25 min). (B) Absorbance changes showing formation of photoproduct **2b** in PBS ($\lambda_{max} = 387$ nm), HSA ($\lambda_{max} = 392$ nm), BSA (397 nm), or RSA (394 nm) versus irradiation time.

Table 1. Quantum Yields of **2b** and **2c** Formation in Different Media

	2b	2c	2c/2b
MeCN	0.19	0.14	0.74
PBS	0.16	N.D. ^a	N.D. ^a
HSA	0.06	0.14	2.3
BSA	0.12	0.18	1.5
RSA	0.09	0.09	1

^a Not determined as compound **2c** was not soluble in PBS.

and RSA) on the reaction of interest. The binding of **1b** and **1c** to BSA followed the same trends as those observed for HSA (see above). Thus, Job plot analysis revealed formation of 1:1 complexes, and the use of displacement probes confirmed a similar site location. The binding constants were found to be $K(\mathbf{1b}) = 6.8 \times 10^4$ M⁻¹ and $K(\mathbf{1c}) = 4.4 \times 10^5$ M⁻¹. As regards RSA, 1:1 complexes were also formed with *K* values in the same range (1.0×10^5 M⁻¹ for **1b** and 8.6×10^4 M⁻¹ for **1c**). Interestingly, both DA and DG were displaced by warfarin and ibuprofen (Figure 5A), pointing to the presence of only one binding site in this protein. Accordingly, **1b** and **1c** were also capable of displacing DA and DG from RSA (Figure 5B).

After establishing the binding behavior, the photo-Fries rearrangement in the presence of BSA and RSA was investigated.

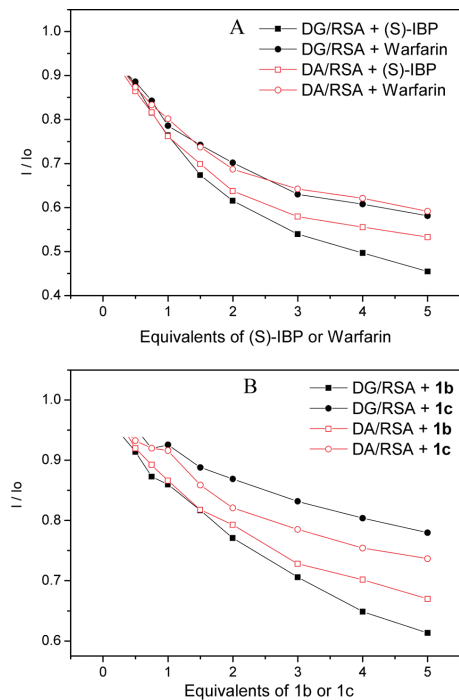


Figure 5. (A) Variation of relative fluorescence intensity observed for probe-albumin solutions (4×10^{-5} M, 1/1 molar ratio) at $\lambda_{\text{em}} = 505$ nm for DA-RSA and DG-RSA, upon addition of warfarin and (S)-IBP. (B) Analogous experiments using **1b** and **1c** as displacers.

The results, also summarized in Table 1, showed a clear species-dependence in spite of the close structural similarity between the employed albumins. In BSA, quantum yields were higher, but the reactivity differences between **1b** and **1c** ($\phi_{\text{R}}(2\text{c})/\phi_{\text{R}}(2\text{b})$) were smaller than in HSA (1.5 vs 2.3). Remarkably, with RSA the same photorearrangement quantum yields were obtained for both esters. This correlates well with the presence of **1b** and **1c** in a common binding site of RSA.

Conversion and product yields, in PBS alone and in the presence of HSA or BSA, were determined for **1b** by HPLC analysis. For sensitivity reasons more concentrated solutions were employed. The chromatographic traces obtained at 240 nm (see Figure 6A, for example) showed that **2b** was the major photoproduct detected regardless of the presence or absence of serum albumin. However, conversion of **1b** was faster in bulk solution, leading to formation of **2b** with an upper limit of ca. 50% yield (Figure 6, parts B and C). By contrast, **1b** consumption was slower in the presence of HSA and BSA, with chemical yields of **2b** ca. 40% and 70%, respectively. Thus, the latter protein provides a good microenvironment for photo-Fries rearrangement allowing an improvement in the selectivity of the reaction by respect with bulk solution. Concerning **2b** formation as a function of irradiation time in the different media, the ratios

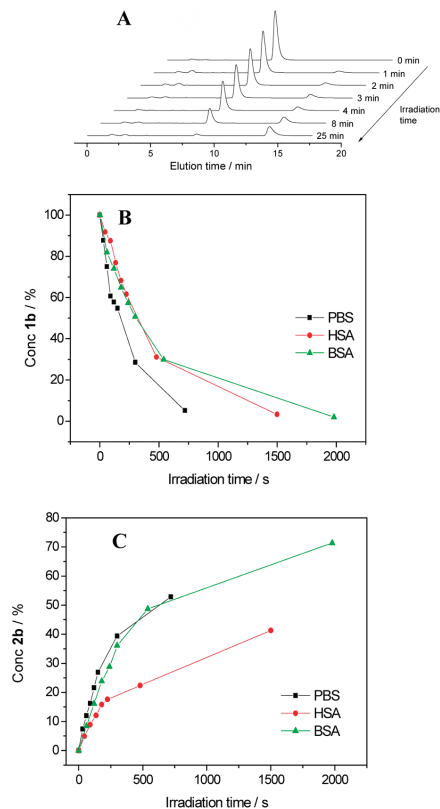


Figure 6. (A) HPLC trace obtained during monochromatic irradiation ($\lambda = 321$ nm) of **1b** (1.7×10^{-4} M), in the presence of HSA (1/1 ratio). (B) Conversion of **1b** and (C) formation of **2b** as a function of irradiation time.

obtained from initial slopes of Figure 6C were in reasonable agreement with the quantum yields reported in Table 1.

To conclude, the photo-Fries rearrangement is a well-known photochemical reaction, which may be used as a probe for the specific microenvironments provided by protein binding sites. The photorearrangement actually occurs inside serum albumins of different species, and its efficiency depends on the nature of the higher affinity binding sites for the specific substrates. The reaction efficiency seems to be higher within binding site I, where hydrophobic interactions predominate. As a practical advantage, the intraprotein photo-Fries rearrangement may be convenient to work in aqueous media with hardly soluble aryl esters.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Telephone: (+34)-963877807. Fax: (+34)-963877809. E-mail: lvirgini@itq.upv.es (V.L.-V) or mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.).

■ ACKNOWLEDGMENT

Spanish Government (CTQ2009-13699 project, Ramon y Cajal contract to V.L.-V. and JAE predoc contract to M.M.), Generalitat Valenciana (Prometeo Program 2008/090 and GV/2009/051 projects) and Universidad Politecnica de Valencia (PAID 06-08 project) are gratefully acknowledged for financial support.

■ REFERENCES

- (1) (a) Arumugam, S.; Vutukuri, D. R.; Thayumanavan, S. Ramamurthy, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13200–13206. (b) Bach, T.; Bergmann, H.; Grosch, B.; Harms, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7982–7990. (c) Cauble, D. F.; Lynch, V.; Krische, M. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 15–21. (d) Dickerson, T. J.; Tremblay, M. R.; Hoffman, T. Z.; Ruiz, D. I.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15395–15401. (e) Kaanumalle, L. S.; Nithyanandhan, J.; Pattabiraman, M.; Jayaraman N.; Ramamurthy, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8999–9006. (f) Koodanjeri, S.; Pradhan, A. R.; Kaanumalle, L. S.; Ramamurthy, V. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3207–3210. (g) Kawanami, Y.; Pace, T. C. S.; Mizoguchi, J.-i.; Yanagi, T.; Nishijima, M.; Mori, T.; Wada, T.; Bohne, C.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7908–7921. (h) Saphier, S.; Hu, Y.; Sinha, S. C.; Houk, K. N.; Keinan, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 132–145. (i) Saphier, S.; Piran, R.; Keinan, E. Photoenzymes and photoabzymes. In *Catalytic antibodies*; Keinan, E., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005; pp 350–369. (j) Saphier, S.; Sinha, S. C.; Keinan, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1378–1381. (k) Tanaka, K.; Fujiwara, T. *Org. Lett.* **2005**, *8*, 1501–1503. (l) Kaanumalle, L. S.; Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C.; Ramamurthy, V. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 236–238.
- (2) (a) Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423–431. (b) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538–9539. (c) Ouchi, A.; Zandomenighi, G.; Zandomenighi, M. *Chirality* **2002**, *14*, 1–11.
- (3) (a) Nishijima, M.; Pace, T. C. S.; Nakamura, A.; Mori, T.; Wada, T.; Bohne, C.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2707–2715. (b) Nishijima, M.; Wada, T.; Mori, T.; Pace, T. C. S.; Bohne, C.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3478–3479. (c) Pace, T. C. S.; Nishijima, M.; Wada, T.; Inoue, Y.; Bohne, C. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10445–10453. (d) Wada, T.; Nishijima, M.; Fujisawa, T.; Sugahara, N.; Mori, T.; Nakamura, A.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7492–7493.
- (4) (a) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052–1061. (b) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824–832.
- (5) (a) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Vaya, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134–10135. (b) Vaya, I.; Bueno, J. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015–1020.
- (6) Miranda, M. A.; Galindo, F. Photo-Fries reaction and related processes. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed.; Horspool, W.; Lenci, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.
- (7) Gaetjens, E.; Morawetz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5328–5335.
- (8) Forster, E. W.; Grellmann, K. H.; Linschitz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3108–3115.
- (9) Stoughton, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 202–204.
- (10) Andres, O. G.; Pierini, A. B.; deRossi, R. H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7650–7656.
- (11) (a) Jisha, V. S.; Arun, K. T.; Hariharan, M.; Ramaiah, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6024–6025. (b) Lucas, L. H.; Price, K. E.; Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14258–14266.
- (12) Epps, D. E.; Raub, T. J.; Kezdy, F. J. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 342–350.
- (13) Kosa, T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1607–1612.

Photochemical and photophysical properties of dibenzoylmethane derivatives within protein†

Mireia Marin,^a Virginie Lhiaubet-Vallet,^a Cecilia Paris,^a Minoru Yamaji^{a,b} and Miguel Angel Miranda^{a*}

Received 15th February 2011, Accepted 3rd April 2011

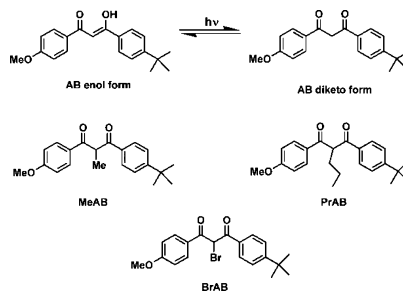
DOI: 10.1039/c1pp05072a

In the present work, three dibenzoylmethane derivatives in their β -diketo form have been selected to investigate their photophysical and photochemical behavior upon interaction with human serum albumin (HSA). In organic solvents, absorption and phosphorescence emission spectra of the α -bromo derivative of avobenzone (BrAB) were similar to those of the α -methylated and α -propyl analogs (MeAB and PrAB). However, laser flash photolysis experiments revealed a different transient species centered at 350 nm, assigned to the radical obtained from a singlet excited state dehalogenation process. Interestingly, the transient absorption spectrum of BrAB within HSA showed the typical features of the β -diketone triplet excited state. In the case of MeAB and PrAB derivatives, binding to HSA was associated with a significant increase of their triplet lifetimes as compared to acetonitrile. Finally, the Norrish type II process has been considered as a model to evaluate the influence of the protein microenvironment on the photoreactivity. In this context, photodegradation of PrAB in aerated solutions, to give avobenzone (AB), has been monitored by UV spectroscopy. Interestingly, the quantum yields of AB formation were markedly dependent on the reaction medium (1.4×10^{-2} in acetonitrile and 3.9×10^{-2} within albumin medium); by contrast, chemical yields of ca. 50% were obtained in both cases.

Introduction

Supramolecular photochemistry is an important research field. In this context, organized assemblies have been demonstrated to enhance the efficiency and selectivity of numerous photochemical reactions.^{1–10} During the last decade, special emphasis has been placed on serum albumins as host molecules, because of their ability to bind a large variety of compounds.^{11–18} The chiral environment provided by protein cavities has been exploited to achieve stereoselective photoprocesses, such as the photodegradation of 1,1'-binaphthol, ketoprofen and carprofen,^{12–13,19} or the bimolecular [4 + 4] photodimerization of 2-anthracene carboxylate.^{15–18} More recently, studies on 9-anthraceneacetic acid encapsulated within serum albumins have shown that proteins provide an important protection towards photooxidation.¹¹ Interestingly, in the photo-Fries rearrangement of naphthyl esters it has been found that the quantum yield of product formation depends not only on the serum albumin species but also on the binding site location of the substrate.¹⁴

It is well established that the photophysics and photochemistry of β -dicarbonyl compounds are governed by keto-enol tautomerization, with the chelated enol form predominating in solution. Typical examples of this family are 1,3-dibenzoylmethane (DBM) derivatives. Strong UVA absorption of the enol tautomer has been exploited in the field of solar protection with avobenzone (AB, 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane), which is recognized as one of the most representative UVA filters. Nevertheless, AB exhibits an important drawback; under UVA-irradiation extensive photoisomerization to the β -diketone takes place (Scheme 1). Indeed, this tautomer is photoactive giving rise to irreversible



Scheme 1 Structures of avobenzone (AB) and its α -methyl (MeAB), α -propyl (PrAB) and α -bromo (BrAB) derivatives.

^aInstituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Superior de Investigación Científicas, Avda de Los Naranjos, s/n, 46022, Valencia, Spain. E-mail: mmiranda@qim.upv.es; Fax: +34 963877807; Tel: +34 963877809

^bDepartment of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma, 376-8515, Japan. E-mail: yamaji@gunma-u.ac.jp; Fax: +81-277-301212; Tel: +81-277-301212

† This article is published as part of a themed issue in honour of Yoshihisa Inoue's research accomplishments on the occasion of his 60th birthday.

photodegradation by fragmentation and oxidation, and as a consequence the protoprotecting properties are lost.

We have previously investigated the photobehavior of two α -alkylated AB derivatives exhibiting the typical spectroscopic properties of the DBM in their β -diketonic forms, namely 1,1-(4-*tert*-butylbenzoyl)-(4'-methoxybenzoyl)ethane and 1,1-(4-*tert*-butylbenzoyl)-(4'-methoxybenzoyl)butane (MeAB and PrAB, respectively, Scheme 1).^{20–21} The former has been demonstrated to be a good model of the AB β -diketo form, not only for photophysical characterization of the triplet excited state, but also for the study of its reactivity towards biological targets like 2'-deoxyguanosine, thymidine, tyrosine or tryptophan.²⁰ As regards the latter, its most interesting feature is the ability to generate AB upon irradiation by a Norrish II reaction, behaving therefore as a pro-UV filter.²¹

In the present study, interest has shifted to the influence of human serum albumin on the photochemical and photophysical properties of β -diketones. For this purpose, we have selected as substrates MeAB, PrAB and the α -bromo AB derivative (4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylbromomethane; BrAB, Scheme 1). In principle, this compound is also expected to be in the keto-form in the ground state, and could undergo C–Br bond dissociation in the excited states, resulting in radical formation. Therefore, in a first stage, spectroscopic study of BrAB in solution will be presented. Then, the influence of human serum albumin (HSA) on the photobehavior of the three AB derivatives will be discussed.

Experimental

Chemicals

Avobenzone (4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane, AB) >99% purity was purchased from Fluka, and purified by recrystallizations from ethanol before use. Methylavobenzone (MeAB) was prepared and purified according to the previously reported procedure.²⁰ Bromoavobenzone (BrAB) was prepared according to the procedure reported for dibenzoylbromomethane.²² *N*-Methyldiphenylamine (MDPA) from Tokyo Kasei (TCI) was distilled under reduced pressure for purification before the use. Acetonitrile (ACN) was distilled for purification. Ethanol (EtOH, spectroscopy grade) from Kishida, methylcyclohexane (MCH, Spectrosol) from Dojin and isopentane (IP, for UV-spectroscopy) from Fluka were used without further purification. Solutions of phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.4) were prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets (Sigma) in deionized water.

Absorption and emission spectroscopy

Absorption spectra were recorded on a U-best 50 (JASCO) or a Cary 300 spectrophotometer, while emission spectra were measured on a Hitachi F-4010 fluorescence spectrophotometer. All the samples for transient absorption measurements were prepared in the dark, and Ar-purged or degassed in a quartz cell with a 1 cm path length by several freeze-pump-thaw cycles on a high vacuum line.

Laser flash photolysis

Two laser flash photolysis systems were employed for the present studies. The first one was based on a pulsed Xe/HCl Excimer

Laser (LEXTRA50 Lambda Physik Laser Technik), using 308 nm as excitation wavelength (40 mJ per pulse, 10 ns per pulse). A Lo255 Oriel xenon lamp was employed as detecting light source. The laser flash photolysis apparatus consisted of a pulsed laser, a Xe lamp, a monochromator (Oriel, model 77200), a photomultiplier (Oriel, model 70705) system and a TDS-640A Tektronix oscilloscope. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. The concentration of BrAB was adjusted to an absorbance of ~0.3 at the excitation wavelength. Solutions of HSA/AB derivatives (1/1 molar ratio) were prepared in PBS and equilibrated in the dark for 1 h.

The second system was used to record a transient absorption spectrum of BrAB in EtOH at 77 K. The excitation laser light source was obtained from the fourth harmonics (266 nm) of a Nd³⁺:YAG laser (JK Lasers HY-500; pulse width 8 ns). Further details of the detection system for the time profiles of the transient absorption have been reported elsewhere.²³ The transient absorption spectra were taken with a USP-554 system from Unisoku, which can provide a transient absorption spectrum with one laser pulse.

Quenching of xanthone triplet excited state by BrAB

An argon bubbled acetonitrile solution of xanthone was prepared with absorbance of ~0.3 at $\lambda_{exc} = 308$ nm (Xe/HCl laser). A stock solution of BrAB was used so that it was only necessary to add microlitre volumes to the sample cell in order to obtain appropriate concentrations of the quencher (from 0 to 1.6×10^{-5} M). A rate constant for the reaction of the triplet excited state of xanthone with BrAB was obtained from Stern–Volmer plots, following eqn (1).

$$k_{obs} = k_o + k_q[Q] \quad (1)$$

where k_{obs} and k_o are the triplet decay rate constants in the presence and in the absence of quencher, k_q is the quenching rate constant and [Q] is the quencher concentration in mol L⁻¹.

Photoirradiation systems

Steady-state photolysis was carried out by using monochromatic irradiation at 305 nm with a Microbeam system (model L-201), including a 150 W xenon lamp coupled with a monochromator (model 101).

Kinetics of PrAB photodegradation

Aerated solutions of PrAB in ACN (2.85×10^{-5} M) or in PBS in the presence of HSA (1/1 molar ratio) were prepared in 10 mm \times 10 mm quartz cuvettes. Irradiation was carried out at the monochromatic wavelength of 305 nm with slit bandwidth of 2.5 nm. Kinetics of photoproduct formation was obtained by plotting absorbance at 357 nm *versus* irradiation time. Molar absorption coefficients of AB were determined to be 32 200 and 18 500 M⁻¹ cm⁻¹ for acetonitrile and HSA solutions, respectively.

The photon flux at 305 nm was determined by using MDPA in aerated MCH as a chemical actinometer. The quantum yield for the formation of *N*-methylcarbazole from MDPA has been established as 0.42.²⁴ The procedure for determining quantum yields from absorption changes was the same as that described

Table 1 Photophysical properties of AB derivatives

Compound	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$E_{\text{T}}/\text{kcal mol}^{-1}$
MeAB	260 (21000) ^{a,b}	70.7 ^{a,b}
PrAB	269 (26900) ^b	70.7 ^b
BrAB	270 (22100)	68.3

^a Data from ref. 20. ^b Data from ref. 21.

in the literature.²⁵ All the samples were prepared in a quartz cell with a 1 cm path length in the dark.

Results and discussion

Absorption and emission properties of BrAB

As shown in Fig. 1, BrAB exhibits the typical absorption band of the β -diketo form of DBM at 260–270 nm.²⁰ No fluorescence emission was observed in ACN at 295 K. The phosphorescence spectrum obtained in EtOH at 77 K shows an emission centered at 440 nm, with vibrational structures due to the carbonyl progression. Moreover, the excitation spectrum of this emission agrees well with BrAB absorption. The energy level of the lowest triplet (T_1) state was determined to be 68.3 kcal mol⁻¹ from the 0–0 origin of the phosphorescence spectrum. Thus, BrAB spectroscopic data were very similar to those previously reported for MeAB and PrAB (Table 1).^{20–21}

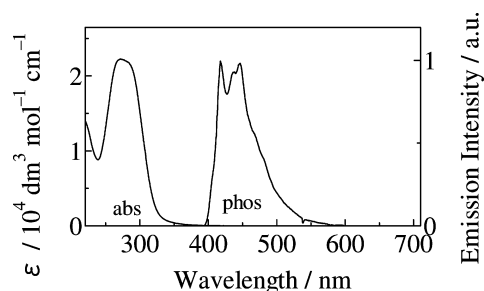


Fig. 1 Absorption and phosphorescence spectra of BrAB in ACN at 295 K and in EtOH at 77 K, respectively.

Laser flash photolysis study of BrAB

To investigate the reaction intermediates generated by photolysis of BrAB in solution, laser flash photolysis was performed at 308 nm, with a pulsed excimer Xe/Cl laser. In ACN at 295 K, a transient absorption with maximum at 350 nm was observed (Fig. 2A). The corresponding decay showed a first order kinetics with a lifetime of 70 μs under nitrogen. This transient absorption spectrum must be due to an avobenzene radical (ABR) produced by excited state debromination of BrAB.

In order to further characterize the BrAB excited species, xanthone was used as triplet sensitizer. As shown in Fig. 2B, xanthone triplet excited state was efficiently quenched by BrAB (k_q ca. $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). However, no new transient species was detected. Different explanations could be given as a very short lifetime and/or a low molar absorption coefficient of $^3\text{BrAB}$ transient. It is

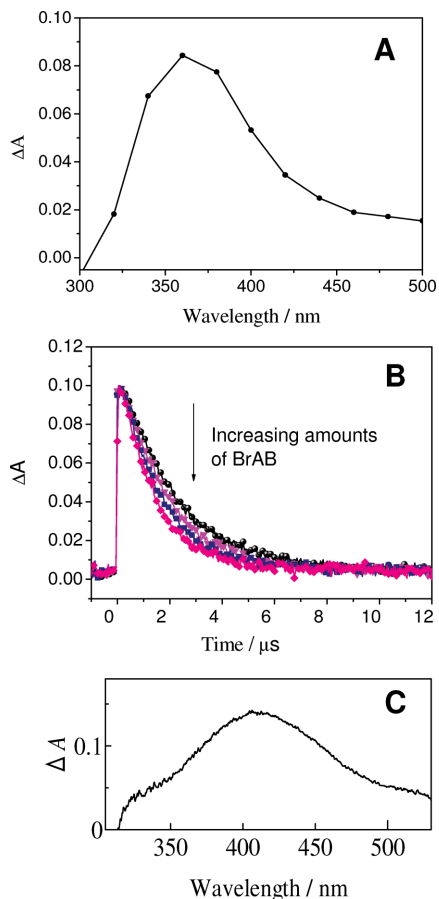


Fig. 2 (A) Transient absorption spectrum obtained upon 308 nm laser flash photolysis at 295 K of BrAB in deaerated ACN, 3 μs after the laser pulse. (B) Kinetic traces of the triplet–triplet absorption of xanthone monitored at 612 nm, in the presence of increasing amounts of BrAB (from 0 to $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$). (C) Transient absorption spectrum of BrAB at 100 ns, obtained upon 266 nm laser pulsing in EtOH solution at 77 K.

noteworthy that the long-lived transient with maximum at 350 nm was not observed under triplet state photosensitization conditions, thus suggesting that dehalogenation leading to ABR radical is a singlet excited state mediated process. Next, low temperature 266-nm laser photolysis of BrAB was run in EtOH matrix at 77 K. A transient absorption spectrum with a maximum at ca. 400 nm was obtained and assigned to $^3\text{BrAB}$ by comparison with the T-T absorption of other β -diketo derivatives (Fig. 2C).

Interaction between MeAB, PrAB or BrAB and HSA

Aerated solutions of MeAB, PrAB or BrAB in the presence of HSA (1/1 molar ratio) were submitted to laser flash photolysis

at 308 nm. At this wavelength, the protein alone did not give rise to any absorption band. Moreover, due to the limited solubility of the three compounds in PBS, the photobehavior of the HSA containing systems was compared to that of the AB derivatives in aerated ACN solutions.

Similar transient absorption spectra were obtained for MeAB and PrAB in the presence and in the absence of HSA. In both cases, the detected species was the triplet excited state of the β -diketo form (see Fig. 3A and B). Moreover, as previously observed in bulk solution, $^3\text{PrAB}$ gave rise to formation of an absorption band centered at 350 nm, which was ascribed to AB formation through

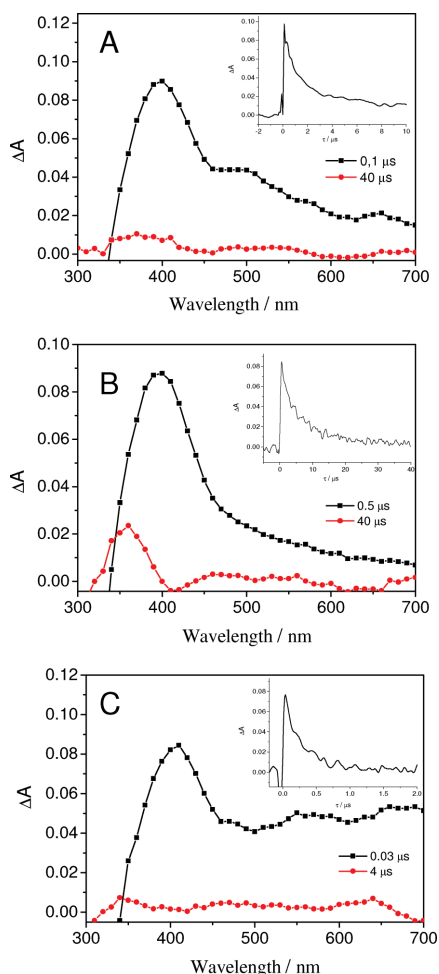


Fig. 3 Transient absorption spectra of MeAB (2.8×10^{-4} M, A), PrAB (2.5×10^{-4} M, B) and BrAB (3.8×10^{-5} M, C) in aerated PBS, in the presence of HSA (1/1 molar ratio) after 308 nm laser pulse. Inset: Corresponding decays monitored at 400 nm.

a Norrish type II reaction. By contrast, both $^3\text{MeAB}$ and $^3\text{BrAB}$ decayed without generation of new detectable intermediates. An important observation was the decay kinetics of these transients, which was markedly slower within the protein (Fig. 3, insets). Thus, $^3\text{MeAB}$ lifetime increased from 0.13 μs to 2.4 μs (18 times), whereas a 40-fold enhancement was noticed in the case of $^3\text{PrAB}$ ($\tau = 0.14$ and 6.0 μs in ACN and HSA media, respectively). These results are in agreement with the reported protecting effect of HSA from self-quenching or from attack by oxygen.^{12–13,26}

Interestingly, different species were observed for BrAB in the bulk solution and complexed within HSA. In this latter case, a transient with maximum at *ca.* 400 nm and a lifetime of 0.3 μs , corresponding to BrAB triplet–triplet absorption spectrum, was detected (Fig. 3C). It is worth noting that this species was only observed during the laser flash photolysis of BrAB in EtOH glass (Fig. 2C) at 77 K, but not at room temperature. Thus, the confined microenvironment provided by the protein produces similar effects as the rigid matrix supplied by the low temperature glass.

Photochemistry of protein-bound PrAB

After investigating the photophysical behavior of AB derivatives within HSA, the influence of the protein cavities on the photoreactivities was considered. For this purpose, the Norrish II reaction of PrAB was selected as model reaction, because it was clean (as compared to the photodegradation of MeAB and BrAB) and easy to monitor by UV-spectral changes.

Thus, monochromatic irradiation ($\lambda = 305$ nm) was performed for aerated solutions of PrAB in ACN or PBS/HSA, and the course of the reaction was followed by UV spectroscopy. As shown in Fig. 4A, the decrease of PrAB absorption band at 260 nm in both media gave rise to a new band centered at 357 nm, assigned to AB enol.²¹ When the kinetics of AB formation was compared (Fig. 4B), the reaction was found to be significantly slower in the presence of HSA. This is consistent with the quantum yields (ϕ_R) of AB formation, determined using *N*-methylidiphenylamine as actinometer, which were 2.8 times lower in protein than in ACN ($\phi_R = 1.4 \times 10^{-2}$ and 3.9×10^{-2} , respectively). This correlates well with the increase of $^3\text{PrAB}$ lifetime when complexed with the protein (see above). Therefore, it appears that the conformation required for intramolecular abstraction of the γ -hydrogen by the excited carbonyl is disfavored within the confined microenvironment provided by HSA. Interestingly, after long irradiation times the yields of AB formation (*ca.* 50%) were very similar in both media.

Conclusions

In this work, three dibenzoylmethane derivatives have been considered to investigate the influence of HSA on their photobehavior. From a photophysical point of view, the increase of triplet excited state lifetime of PrAB and MeAB reflects the protective effect provided by the protein cavity. Another interesting result is detection of the triplet excited state of BrAB, a species that, in the absence of HSA, is only observed in low temperature matrices. Thus, the confined environment supplied by the protein is similar to the matrix effect. From the photochemical viewpoint, the most remarkable result is the modified photoreactivity of PrAB in the Norrish type II reaction, probably due to conformational restrictions.

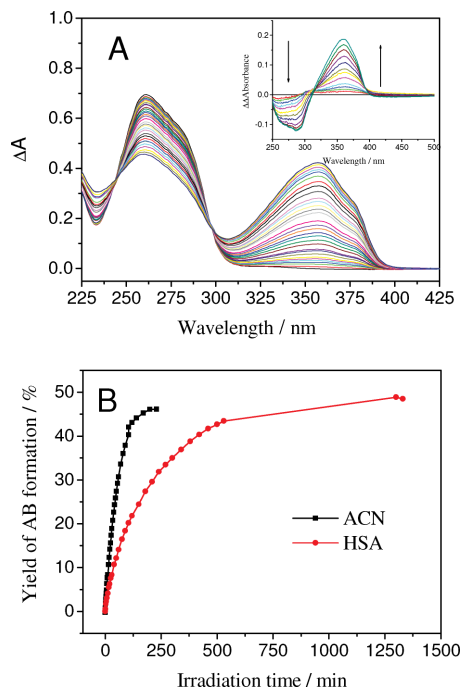


Fig. 4 (A) Norrish type II photoreaction of PrAB (2.85×10^{-5} M) in ACN under UVB irradiation (monochromatic light at 305 nm), followed by UV absorption spectroscopy (at 357 nm). Inset: Experiment performed under the same conditions for PrAB in PBS, in the presence of HSA (1/1 molar ratio); for a better clarity the initial spectrum of PrAB/HSA solutions has been subtracted (B) Yields of AB formation, determined from the absorption changes (followed at 357 nm) after monochromatic irradiation of PrAB in ACN or PBS, in the presence of HSA (1/1 molar ratio).

Acknowledgements

Spanish Government (CTQ2009-13699 project, Ramon y Cajal contract to V.L.-V. and JAE pre-doc contract to M. M.), Generalitat Valenciana (Prometeo Program 2008/090 and GV/2009/051 projects) and Universidad Politècnica de Valencia (PAID 06-08 project) are gratefully acknowledged for financial support. M. Y. is grateful for a financial support, Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from JSPS.

Notes and references

- 1 S. Arumugam, D. R. Vutukuri, S. Thayumanavan and V. Ramamurthy, Amphiphilic homopolymer as a reaction medium in water: product selectivity within polymeric nanopockets, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13200–13206.
- 2 T. Bach, H. Bergmann, B. Grosch and K. Harms, Highly enantioselective intra- and intermolecular [2 + 2] photocycloaddition reactions of 2-quinolones mediated by a chiral lactam host: host-guest interactions, product configuration, and the origin of the stereoselectivity in solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 7982–7990.
- 3 D. F. Cauble, V. Lynch and M. J. Krische, Studies on the enantioselective catalysis of photochemically promoted transformations:

- “sensitizing receptors” as chiral catalysts, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 15–21.
- 4 T. J. Dickerson, M. R. Tremblay, T. Z. Hoffman, D. I. Ruiz and K. D. Janda, Catalysis of the photo-Fries reaction: antibody-mediated stabilization of high energy states, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 15395–15401.
 - 5 L. S. Kaanumalle, C. L. D. Gibb, B. C. Gibb and V. Ramamurthy, Photo-Fries reaction in water made selective with a capsule, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 236–238.
 - 6 L. S. Kaanumalle, J. Nithyanandhan, M. Pattabiraman, N. Jayaraman and V. Ramamurthy, Water-soluble dendrimers as photochemical reaction media: chemical behavior of singlet and triplet radical pairs inside dendritic reaction cavities, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8999–9006.
 - 7 Y. Kawanami, T. C. S. Pace, J.-i. Mizoguchi, T. Yanagi, M. Nishijima, T. Mori, T. Wada, C. Bohne and Y. Inoue, Supramolecular complexation and enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylic acid with 4-aminoproinol derivatives as chiral hydrogen-bonding templates, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 7908–7921.
 - 8 S. Saphier, Y. Hu, S. C. Sinha, K. N. Houk and E. Keinan, Origin of selectivity in the antibody 20F10-catalyzed Yang cyclization, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 132–145.
 - 9 S. Saphier, R. Piran and E. Keinan, Photoenzymes and photoabzymes, in *Catalytic antibodies*, ed. E. Keinan, Wiley-VCH, 2005, pp. 350–369.
 - 10 S. Saphier, S. C. Sinha and E. Keinan, Antibody-catalyzed enantioselective Norrish type II cyclization, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1378–1381.
 - 11 R. Alonso, M. Yamaji, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, Enhanced photostability of the anthracene chromophore in aqueous medium upon protein encapsulation, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 11363–11369.
 - 12 V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca and M. A. Miranda, Stereodifferentiating drug-biomolecule interactions in the triplet excited state: studies on supramolecular carprofen/protein systems and on carprofen-tryptophan model dyads, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 423–431.
 - 13 V. Lhiaubet-Vallet, Z. Sarabia, F. Bosca and M. A. Miranda, Human serum albumin-mediated stereodifferentiation in the triplet state behavior of (S)- and (R)-carprofen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9538–9539.
 - 14 M. Marin, V. Lhiaubet-Vallet and M. A. Miranda, Site-dependent photo-Fries rearrangement within serum albumins, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 2910–2915.
 - 15 M. Nishijima, T. C. S. Pace, A. Nakamura, T. Mori, T. Wada, C. Bohne and Y. Inoue, Supramolecular photochirogenesis with biomolecules. Mechanistic studies on the enantiodifferentiation for the photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate mediated by bovine serum albumin, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2707–2715.
 - 16 M. Nishijima, T. Wada, T. Mori, T. C. S. Pace, C. Bohne and Y. Inoue, Highly enantiomeric supramolecular [4 + 4] photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate mediated by human serum albumin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3478–3479.
 - 17 T. C. S. Pace, M. Nishijima, T. Wada, Y. Inoue and C. Bohne, Photophysical studies on the supramolecular photochirogenesis for the photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate within serum albumins, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 10445–10453.
 - 18 T. Wada, M. Nishijima, T. Fujisawa, N. Sugahara, T. Mori, A. Nakamura and Y. Inoue, Bovine serum albumin-mediated enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7492–7493.
 - 19 A. Ouchi, G. Zandomenighi and M. Zandomenighi, Complexation with albumins of chiral aromatic substrates and their chemistry in ground and excited states. Catalytic and chirality recognition properties of the protein in the cases of binaphthol, its photoisomers, and ketoprofen, *Chirality*, 2002, **14**, 1–11.
 - 20 C. Paris, V. Lhiaubet-Vallet, O. Jimenez, C. Trullas and M. A. Miranda, A blocked diketo form of avobenzone: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 178–184.
 - 21 M. Yamaji, C. Paris and M. A. Miranda, Steady state and laser flash photolysis studies on photochemical formation of 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane from its derivative via the Norrish type II reaction in solution, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2010, **209**, 153–157.
 - 22 J. Kosmrlj, M. Kocovar and S. Polanc, A new convenient bromination with $\text{KBrO}_3/\text{KBr}/\text{Dowex}^{\text{®}}$, *Synth. Commun.*, 1996, **26**, 3583–3592.

-
- 23 M. Yamaji, Y. Aihara, T. Itoh, S. Tobita and H. Shizuka, Thermochemical profiles on hydrogen atom transfer from triplet naphthol and proton-induced electron transfer from triplet methoxynaphthalene to benzophenone via triplet exciplexes studied by laser flash photolysis, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 7014–7021.
- 24 E. W. Forster, K. H. Grellmann and H. Linschitz, Reaction patterns and kinetics of the photoconversion of N-methylphenylamine to N-methylcarbazole, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 3108–3115.
- 25 M. Hoshino and M. Koizumi, Order of quencher participation in photochemistry. I. Proton transfer from the excited p-hydroxybenzophenone in mixed solvents of cyclohexane and alcohols, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1972, **45**, 2731–2736.
- 26 I. Vaya, C. J. Bueno, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, Use of triplet Excited states for the study of drug binding to human and bovine serum albumins, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 1015–1020.

Enhanced Photochemical [6 π] Electrocyclization within the Lipophilic Protein Binding Site

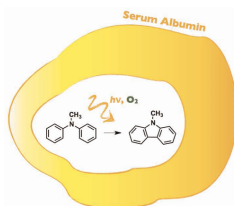
Mireia Marin, Virginie Lhiaubet-Vallet,* and Miguel A. Miranda*

Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia,
Avda de Los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain

lvirgini@itq.upv.es; mmiranda@qim.upv.es

Received February 16, 2012

ABSTRACT



Photocyclization of *N*-methyldiphenylamine to *N*-methylcarbazole is achieved within the microenvironment provided by site I of serum albumins. Quantum yield determinations, combined with transient absorption spectroscopic detection of the dihydrocarbazole intermediate, demonstrate that protein encapsulation provides a subtle control of the kinetic parameters, leading to optimized efficiencies.

Photochemical [6 π] electrocyclizations are well-established tools for the synthesis of a large variety of carbocyclic or heterocyclic compounds.¹ These reactions have also found application in fields such as actinometry,² photochromism,³ or design of molecular devices.⁴ From a mechanistic point of view, they typically arise from the first (π, π^*) singlet excited state.⁵ An interesting exception relies on the oxidative photocyclization of diarylamines (see Figure 1 for the case of *N*-methyldiphenylamine), which occurs through a multistep pathway involving two consecutive triplet excited states. Initial formation of

4a,4b-dihydrocarbazoles is followed by oxidation to carbazoles.^{2a,6} Oxygen plays a dual role: on the one hand, it disfavors the reaction by quenching the amine triplet excited state, whereas on the other hand, it is required as a reagent for the final oxidative step.⁷ In this context, the binding sites of serum albumins (SAs) would represent an ideal microenvironment to optimize the photocyclization efficiency by providing a subtle control of the involved kinetic parameters.

Upon encapsulation, the photobehavior of guest molecules is modulated not only as a result of conformational restrictions imposed by the rigidity of protein cavities, but also by the controlled diffusion of oxygen.⁸ These two aspects have been previously tackled by comparing the kinetic parameters of *N*-methyldiphenylamine photocyclization in micro-heterogeneous media with those obtained in water.^{9,10} In the case of cyclodextrins, a lower rate of

(1) (a) Bach, T.; Hehn, J. P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1000. (b) Albini, A.; Fagnoni, M. In *Handbook of Synthetic Photochemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.

(2) (a) Förster, E. W.; Grellmann, K.-H.; Linschitz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3108. (b) Yoshihara, T.; Yamaji, M.; Itoh, T.; Nishimura, J.; Shizuka, H.; Tobita, S. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *140*, 7.

(3) (a) Fukumoto, S.; Nakashima, T.; Kawai, T. *Angew. Chem Int. Ed.* **2011**, *50*, 1565. (b) Irie, M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1535.

(4) (a) Irie, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685. (b) Golovkova, T. A.; Kozlov, D. V.; Neckers, D. C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5545.

(5) Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C. In *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*; University Science Books: Sausalito, California, 2010; pp 856.

(6) (a) Grellmann, K.-H.; Kühnle, W.; Weller, H.; Wolff, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6889. (b) Görner, H. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1245.

(7) Fischer, G.; Fischer, E.; Grellman, K. H.; Linschitz, H.; Temizer, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6267.

(8) (a) Alonso, R.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3860. (b) Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423–431. (c) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538. (d) Vaya, I.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.

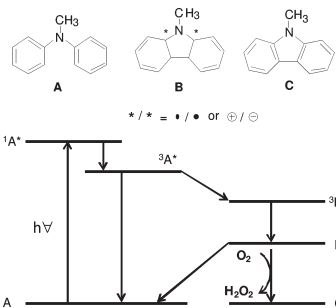


Figure 1. Structures of *N*-methyldiphenylamine (A), *N*-methyl-4a,4b-dihydrocarbazole (B), and *N*-methylcarbazole (C), together with an energetic diagram of the reaction mechanism.

photocyclization has been determined and attributed to restricted rotation inside the rigid oligosaccharide structure.⁹ By contrast, no significant micellar effect has been found within SDS or CTAB vesicles.¹⁰

Here, it will be shown that the efficiency of *N*-methyldiphenylamine photocyclization is maximized within the microreactors provided by the lipophilic protein binding sites. This is achieved by exploiting the retarded intraprotein oxygen diffusion rate, which is markedly slower than amine triplet quenching in solution and faster than dihydrocarbazole dehydrogenation.

The reaction mechanism has been clearly established in previous works (Figure 1).^{2a,6} After excitation and intersystem crossing (ISC), a short-lived triplet excited state (³A*) is generated. It may return back to the ground state A in the submicrosecond time scale or undergo adiabatic ring closure, leading to the *N*-methyl-4a,4b-dihydrocarbazole triplet excited state (³B*), which subsequently crosses to the corresponding ground state (B). In the presence of oxygen, dehydrogenation of B leads to the final product, namely, *N*-methylcarbazole (C). Conversely, under anaerobic conditions, B suffers an efficient ring-opening back to the starting material A (>99% in non polar solvents).^{2a,6b}

The reaction efficiency was determined through the photocyclization quantum yields. Experiments were performed both under air and oxygen, in acetonitrile or in buffered aqueous solution, in the presence or in the absence of SA. The overall study was performed with equimolar amounts of A and SA, in order to avoid multiple occupation of the protein binding site. Photoconversion of A to C was followed by UV–vis spectroscopy, as usually done for actinometry measurements. Formation of C was monitored by its characteristic absorption band peaking at

(9) (a) Sur, D.; Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N.J. *Photochem. Photobiol.* **A2000**, *134*, 17. (b) Sur, D.; Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N.; Bera, S. C. *J. Mol. Liq.* **2000**, *89*, 175.

(10) Roessler, N.; Wolff, T. *Photochem. Photobiol.* **1980**, *31*, 547.

345 nm, which does not overlap with the reactant absorption spectrum.

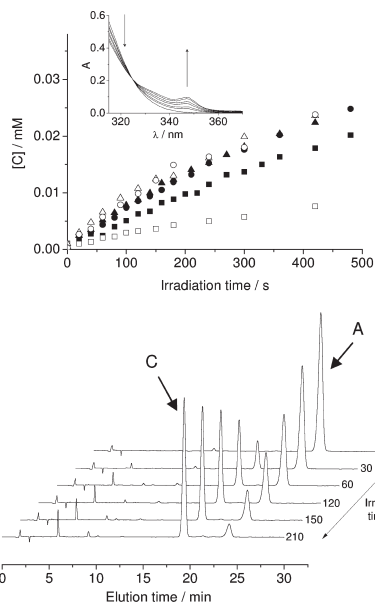


Figure 2. Top: concentration of carbazole C, determined from the absorbance changes monitored at 345 nm, plotted as a function of irradiation time for A (8.25×10^{-5} M) in MeCN (squares), PBS/HSA (triangles), and PBS/BSA (circles) under air (solid symbols) or oxygen (open symbols). Inset: UV spectral changes upon irradiation of an aerated PBS solution of A in the presence of HSA (molar ratio 1/1), during 323 nm monochromatic irradiation (from 0 to 30 min). Initial absorption spectrum of HSA was subtracted. Bottom: HPLC traces obtained during irradiation ($\lambda = 300$ nm) of A (1.65×10^{-4} M) in aqueous buffer, in the presence of equimolar amounts of HSA.

Moreover, an isosbestic point at 323 nm was observed, as expected for a clean process (Figure 2 top, inset). This was confirmed by HPLC measurements, where C was detected as the only significant photoproduct both in solution and in protein media (Figure 2 bottom). Thus, the absorbance changes at 345 nm were plotted as a function of the irradiation time (Figure 2 top), and the quantum yields (ϕ_C) were evaluated by the established procedure using A in aerated acetonitrile as standard (Table 1).^{6b} An alternative determination of ϕ_C was also performed by steady state fluorescence, monitoring the increase of the C emission band ($\lambda_{\text{max}} = 367$ nm) during irradiation of nonfluorescent A. As shown in Table 1, the data obtained with both methods were substantially coincident. It is highly remarkable that the value of ϕ_C increased largely in the presence of SAs, from 1.4- up to 4.6-fold. Interestingly, the highest ϕ_C , obtained for BSA/O₂

system, was of 0.84. This is probably an upper limit, imposed by the intersystem crossing of the starting amine, which is the bottleneck and has been reported to occur with a $\phi_{ISC} = 0.8-0.9$ in solution.

Table 1. Photocyclization Quantum Yields Determined by UV-Vis Absorption and (In Parentheses) Steady State Fluorescence

	PBS/MeCN ^a	MeCN	PBS/HSA	PBS/BSA
$\phi_C(\text{air})$	0.46 (0.44)	0.45 (0.45) ^b	0.63 (0.61)	0.65 (0.67)
$\phi_C(\text{O}_2)$	0.55 (0.52)	0.18 (0.19)	0.73 (0.72)	0.83 (0.84)

^a A 3/1 ratio was used to ensure complete dissolution of A and C.

^b Taken as standard value from ref. 6b.

A satisfactory understanding of the influence of SAs on the photocyclization was obtained from the study of the reaction intermediates. In this context, formation and decay of dihydrocarbazole B turned out to be a good reporter on the involved processes. This ground state species was safely characterized by laser flash photolysis (LFP), where it displayed a transient absorption band peaking at 610 nm.

Nanosecond LFP was performed at 308 nm with an excimer Xe/Cl laser, using PBS solutions of A (4.1×10^{-5} M) alone or in the presence of SAs (4.1×10^{-5} M). Under aerobic conditions, the transient absorption spectrum exhibited a weak maximum at 440 nm that decreased concomitantly with the increase of the much stronger band centered at 610 nm (Figure 3, top). By comparison with the literature, these species were assigned to ³B* and B, respectively.^{2a,6b}

Interestingly, in bulk solution (aerated PBS), the decay at 610 nm followed a first order exponential law (eq 1) with a lifetime of 15 μs , whereas in the presence of SAs, a more complex fitting was required. The presence of two lifetime components ($\tau_f = 15 \mu\text{s}$ and $\tau_b = 451 \mu\text{s}$ for HSA, or $\tau_f = 15 \mu\text{s}$ and $\tau_b = 384 \mu\text{s}$ for BSA) was established by regression analysis of the decay curves according to eq 2. This observation is clearly associated with the location of the substrate in two different environments. The value of 15 μs , obtained for the shorter lifetime, corresponds to free intermediate B in bulk solution, while the longer-lived component reflects a tight interaction with one of the two well-established SA binding cavities, namely, site I or site II.¹¹ In this context, an analogous treatment of the decays for several [HSA]/[A] ratios was performed to obtain a_f and a_b preexponential factors (see eq 2), necessary to estimate the percentage of the substrate in each environment. As shown at the bottom of Figure 3, in the presence of equimolar amounts of HSA, ca. 90% of the substrate is complexed within the protein. A similar behavior was observed for BSA.

(11) (a) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824. (b) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.

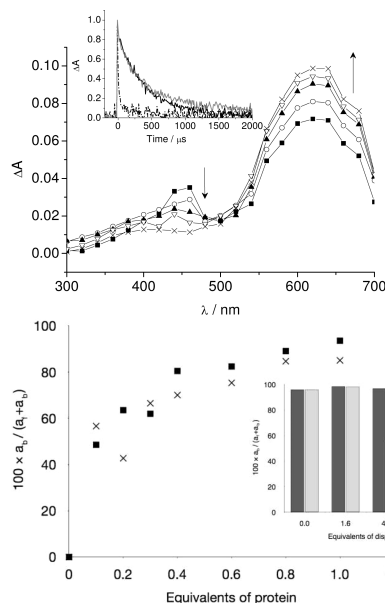


Figure 3. Top: transient absorption spectra of an aerated solution of A in aqueous buffer, in the presence of HSA (4.1×10^{-5} M, molar ratio 1/1) obtained from 0.4 to 4 μs after the 308 nm laser pulse. Inset: normalized decays monitored at 610 nm for A alone in PBS (dotted line) or in the presence of HSA (black line) or BSA (gray line). Bottom: percentage of protein-complexed substrate, as a function of the number of protein equivalents [SA]/[A] for HSA (closed squares) and BSA (crosses). Inset: percentage of the complexed substrate in the presence of equimolar amounts of HSA, as a function of added displacer concentration (IB = (S)-ibuprofen, OA = oleic acid).

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-t/\tau_f} \quad (1)$$

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-t/\tau_f} + a_b \times e^{-t/\tau_b} \quad (2)$$

Next, site assignment was achieved using oleic acid (OA) and (S)-ibuprofen (IB) as specific displacement probes for site I and site II, respectively.¹² For this purpose, increasing amounts of OA were added to aerated solutions of A/HSA (molar ratio 1/1), and transient decays were monitored at 610 nm. This led to a decrease of the long-lived component, a_b , concomitantly with an increase of the free A fraction, a_f (Figure 3 bottom, inset). By contrast, no significant changes were observed when IB was used as displacer. Similar results were obtained for BSA (see the Supporting Information). Overall, the above observations clearly

(12) Montanaro, S.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Blanca, M.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1196.

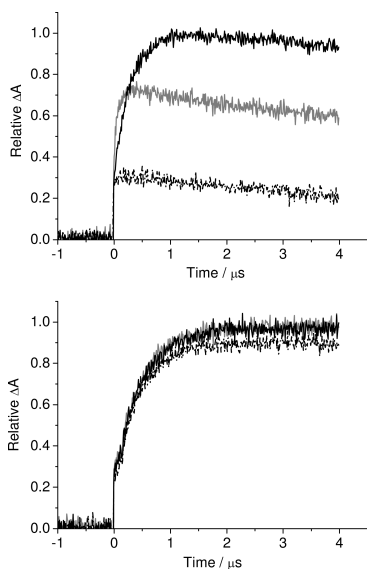


Figure 4. Top: transient absorption growths (monitored at 610 nm) of argon (black line), air (gray line), and oxygen (dotted line) bubbled solutions of A (5.5×10^{-5} M) in MeCN. Bottom: parallel experiment in aqueous buffer, in the presence of HSA (5.5×10^{-5} M).

demonstrate that substrate–protein interaction mainly occurs at the more hydrophobic binding site I of SAs.

In addition, transient absorption at 610 nm (ΔA) corresponds to B intermediate and can be taken as an indicator

of the efficiency of the cyclization process. For optically matched MeCN solutions, a clear difference was observed between oxygen, air, and argon bubbled solutions (Figure 4 top); formation of B was dramatically disfavored under aerated conditions because of the quenching of $^3A^*$ by oxygen. By contrast, in SA/PBS media, an oxygen independent growth was observed (Figure 4 bottom), as anticipated from the fast decay of $^3A^*$ compared to intraprotein diffusion of oxygen. The rate constant for quenching of the 610 nm absorbing species by oxygen within the protein was estimated to be $5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in HSA and $8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in BSA (assuming an intraprotein oxygen concentration similar to that reported for water). This value is ca. 2 orders of magnitude lower than oxygen diffusion within protein binding site I, which explains why the final dehydrogenation to carbazole C is not affected by complexation.^{6b}

In summary, serum albumins provide an appropriate environment for optimization of diarylamine photocyclization. This is achieved by a subtle modulation of the kinetic parameters, as a result of the geometrical restrictions imposed by the protein cavities and the controlled diffusion of oxygen.

Acknowledgment. This work was funded by the Spanish Government (Project CTQ2009-13699, Ramon y Cajal contract RyC-2007-00476 to V.L.-V. and JAE-predoc contract to M.M.) and the Generalitat Valenciana (Prometeo/2008/090).

Supporting Information Available. Experimental procedures, displacement experiments and 610 nm transient absorption growth for A within BSA. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

The authors declare no competing financial interest.

Supporting Information:

Enhanced Photochemical [6 π] Electrocyclization within the Lipophilic Protein Binding Site

Mireia Marin, Virginie Lhiaubet-Vallet, Miguel A. Miranda**

Table of contents:

- S1. This page
- S2-S4. Materials and methods
- S5. Displacement experiments for BSA
- S6. Transient absorption growth at 610 nm monitored for *N*-methyldiphenylamine within BSA
- S7. Reference

S2-S4. Materials and methods

Chemicals. *N*-methylidiphenylamine (A), *N*-methylcarbazole (C), human and bovine serum albumin (HSA and BSA, respectively), (*S*)-ibuprofen (IB), oleic acid (OA) and phosphate buffer saline (PBS, 0.137 mM, pH 7.4) tablets were purchased from Sigma.

Instrumentation. Absorption spectra were performed on a Cary 300 UV-Vis spectrophotometer (UV0811M209, Varian). Steady state fluorescence spectra were recorded on a Photon Technology International (PTI) (LSP-220B) fluorometer equipped with a 75 W Xe lamp. Laser measurements were performed using a pulsed Xe/HCl Excimer Laser (LEXTRA50 Lambda Physik LaserTechnik), using 308 nm as excitation wavelength (40 mJ per pulse, 10 ns per pulse). A quartz cell of 1.0 cm optical path length was employed for all photophysical measurements. A Luzchem photoreactor (model LZC 4V) with two lateral fluorescent tubes (also from Luzchem, model LZC-UVB centered at 300 nm) was used for the irradiation kinetic experiments followed by HPLC (see below). HPLC analysis was done with an Agilent Technologies model 1220 LC System.

Kinetics of photocyclization monitored by absorbance and fluorescence. Aerated and oxygen bubbled solutions of freshly prepared A (4 mL, 8.25×10^{-5} M) in acetonitrile, in HSA/PBS or BSA/PBS (1/1 molar ratio for each protein) were irradiated at 323 nm (isosbestic point, see Figure S3) with the Xe lamp of the fluorometer (see above). The photoreaction was monitored both by absorption and fluorescence spectroscopy. Molar absorption coefficient of A (ϵ) and fluorescence quantum yields of C (ϕ_f) were determined in each medium (see Table below).

	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϕ_f (Air)	ϕ_f (O_2)
Acetonitrile	3830	0.216	0.075
PBS/Acetonitrile 3/1	3450	0.333	0.281
HSA	3800	0.251	0.228
BSA	4330	0.270	0.239

Absorption of the characteristic band maximum of C (at $\lambda = 345$ nm) was plotted versus irradiation time and the resulting concentration kinetic profile was obtained using the calculated ϵ .

The relative initial slopes were used to determine the reaction quantum yields (φ_c) in each medium, taking φ_c (acetonitrile) = 0.45 as reference.^[1]

Kinetic profiles were also obtained by registering the changes of fluorescence intensity ($\lambda_{exc} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 367$ nm) as a function of irradiation time, and taking into account the fluorescence quantum yields (φ_f , Table 1). The relative initial slopes were used to calculate the reaction quantum yields in each medium, taking as reference $\varphi_c = 0.45$ in acetonitrile.^[1]

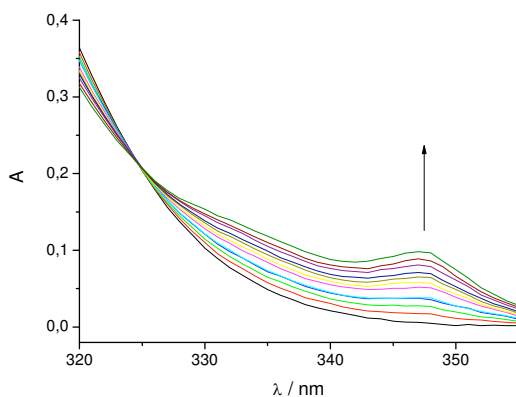


Fig. S3: UV spectral changes upon irradiation of an aerated solution of A in the presence of HSA (molar ratio 1/1), during 323 nm monochromatic irradiation (from 0 to 30 min). Initial absorption spectra of A has been subtracted

Kinetics of photocyclization monitored by HPLC. Aerated solutions of freshly prepared A (1 mL, 1.65×10^{-4} M) in acetonitrile, HSA and BSA (1/1 molar ratio for each protein) were irradiated in a photoreactor with two lamps with maximum output at 300 nm (see above). Samples in acetonitrile were analyzed by HPLC immediately after the irradiation. In the case of samples in albumins, protein was precipitated with 4 mL of acetonitrile at -20 °C ($5 \times$ dilution), stored at least 1.5 hours at -20 °C and centrifuged during 20 minutes at 4000 rpm. The supernatant was taken with a syringe and filtered with PTFE filters of $0.45 \mu\text{m}$ and then analyzed by HPLC. Products were eluted using a C18 Kromasil 100 column, $5 \mu\text{m}$ (from Teknokroma) with a flow of 1 mL/min and using water-acetonitrile (40/60, v/v) as eluent.

When the reaction was carried out with 100 mL of solution, under the same conditions, 2.4 mg of *N*-methylcarbazole (81%) were obtained from 3 mg of *N*-methyldiphenylamine after HPLC purification.

Laser flash photolysis. The absorbance of the samples was kept in the range 0.30–0.40 at the laser wavelength. For protein solutions, equimolar amounts of A and serum albumins were used, if not specified otherwise. The decays registered at 610 nm were fitted following the procedure detailed below:

* for the simplest case of A in PBS, where only a transient species was present, the lifetime was obtained from the mono-exponential law (Eq. 1).

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$

* when A was studied in the presence of HSA or BSA, a function with two mono-exponential terms was needed to fit the decays (Eq. 2). From the two pre-exponential factors a_f and a_b , attributed respectively to free and protein-bound substrate, the percentage of A in each environment was determined.

$$\Delta A = \Delta A_0 + a_f \times e^{-\frac{t}{\tau_f}} + a_b \cdot e^{-\frac{t}{\tau_b}}$$

Displacement experiments. To A/protein equilibrated solutions (1/1 molar ratio), oleic acid (OA) or ibuprofen (IB) were added; then solutions were kept in the dark for 30 min at room temperature, and decays at 610 nm were registered. The data were treated as described in the previous paragraph.

S5. Displacement experiment for BSA

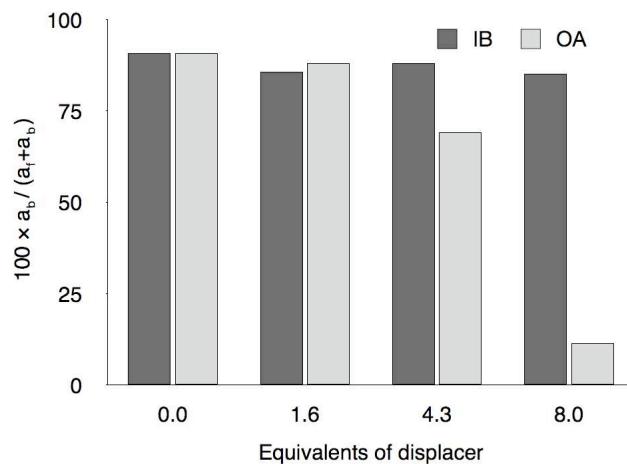


Fig. S5 Percentage of the complexed substrate in the presence of equimolar amounts of BSA (4.1×10^{-5} M), as a function of added displacer concentration (IB = (S)-ibuprofen, OA = oleic acid).

S6. Transient absorption growth at 610 nm monitored for *N*-methyldiphenylamine within BSA

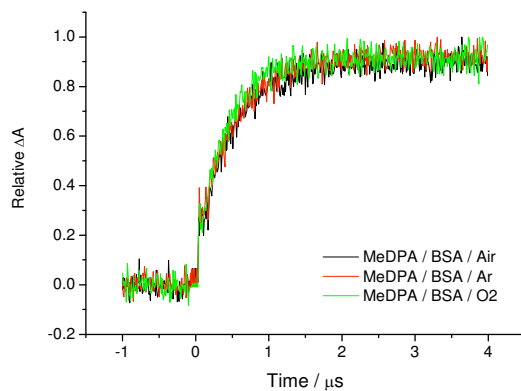


Fig. S6 Transient absorption growths (monitored at 610 nm) of argon (red line), air (black line) and oxygen (green line) bubbled solutions of A (5.5×10^{-5} M) in the presence of equimolar amounts of BSA.

S7. Reference

- [1] H. Görner, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1245-1250.

Filter–filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen

Virginie Lhiaubet-Vallet,^a Mireia Marin,^a Oscar Jimenez,^b Olga Gorchs,^b Carles Trullas^b and Miguel Angel Miranda^{*a}

Received 5th November 2009, Accepted 28th December 2009

First published as an Advance Article on the web 6th February 2010

DOI: 10.1039/b9pp00158a

In most sunscreens, the presence of two UV filters usually leads to synergistic effects regarding both the final performance and photostabilization of the active principles. However, this may also result in an accelerated decomposition if a photoreaction occurs between the single components. Thus, the understanding of photophysics and photochemistry of UV filter combinations is important to improve sunscreen photostability. In this context, photoreactivity of a commonly used UVA filter, namely *tert*-butylmethoxydibenzoylmethane (BM-DBM, also known as avobenzone, Parsol 1789, *etc.*), has been studied in the presence of six commercial solar filters: octyl methoxycinnamate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, octocrylene, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, octyl triazone and dioctyl butamido triazone. To achieve this goal, a mechanism-based strategy has been designed in order to investigate the photostability of sunscreens in a more systematic way, taking into account different processes: tautomerization of BM-DBM, formation of triplet excited state of BM-DBM in its diketo form and its quenching in the presence of UV filters, reactivity of UV filters under triplet photosensitization, quenching of singlet oxygen by UV filters and degradation of the latter under singlet oxygenation conditions.

Introduction

Photostability is an important characteristic that a sunscreen should possess. Indeed, not only does the degradation of its single components result in a decrease of the UV protection effectiveness but also would be the origin of sensitization processes like phototoxicity and photoallergy.¹ In this context, sun protection factor (SPF) measures mainly UVB performance. Diffey's method is used for determining the UVA/UVB ratio, and persistent pigment darkening (PPD) is based on the *in vivo* estimation of the UVA protection.² Although ideal UVA and UVB filters should remain unchanged after UV irradiation, most chemical filters exhibit some photoreactivity. A well-known example is *tert*-butylmethoxydibenzoylmethane (BM-DBM, also known as avobenzone, Parsol 1789, *etc.*) that, in spite of its photolability,^{3–5} is a commonly used UVA-filter. Indeed, there are few good UVA absorbers, and BM-DBM (see structure in Chart 1) is probably the most important representative among them due to both its power of absorption (Fig. 1) and commercial availability.

In most sunscreens, at least two UV filters are used in the formulation to protect against UV radiation: one with optimal performance in the UVA region and the other one in the UVB region. The presence of different UV filters usually leads to synergistic effects regarding both the final performance and photostabilization of the sunscreen, or by contrast accelerating

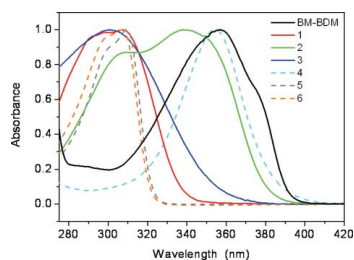


Fig. 1 Normalized UV spectra of BM-DBM and UV filters under study.

their decomposition if a photoreaction occurs between the single components.^{4,6–8}

A typical example is the combination of BM-DBM and octyl methoxycinnamate (filter 1, Chart 1),^{7–10} which has been the matter of a warning report by the US general register on over-the-counter drugs due to its inherent photoreactivity. Indeed, a photochemical study on this mixture has shown that, besides the unimolecular photoreactions of its single components (isomerization and fragmentation), [2+2] photocycloaddition between two cinnamate molecules or between the enol form of BM-DBM and cinnamate (also known as the De Mayo reaction) gives rise to cinnamate dimers or cyclobutylketone photoadducts and subsequent fragmentation products.⁷ Notwithstanding, filter–filter interactions do not always result in a decrease of sunscreen photostability. Protective properties of bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Chart 1, filter 2, also known as Tinosorb S) have been evidenced towards photodegradation of BM-DBM alone

^aInstituto de Tecnología Química, UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Avenida de Los Naranjos, s/n, 46022, Valencia, Spain. E-mail: mmiranda@qim.upv.es; Fax: +34 963877807; Tel: +34 963877809

^bISDIN S.A., Dermopharmaceutical Discovery Unit, C/Provençals 33, 08019, Barcelona, Spain

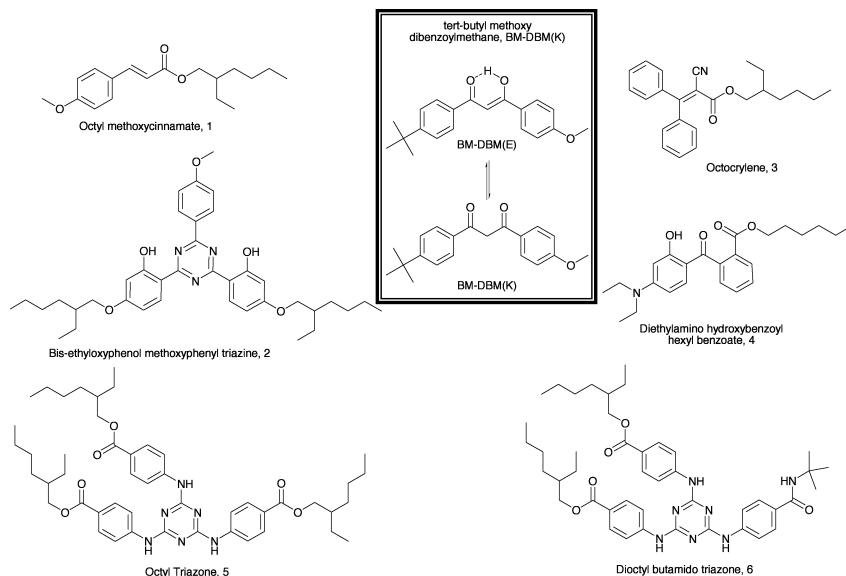


Chart 1 Structures of BM-DBM and UV filters under study.

or combined with **1**.⁸ More recently, interaction between the keto form of BM-DBM and a new broadband triazine filter, namely E-35852, has been considered both from a photophysical and a photochemical point of view.¹¹ In this study, the efficient triplet state quenching ability of the triazine derivative has been correlated with its photostabilizing properties.

Thus, improvement of sunscreen photostability relies on the understanding of photophysical and photochemical properties of UV filter combinations. However, until now, a knowledge-based methodology is still missing in the investigation in a systematic way of the synergistic/antagonistic effects occurring within a given chemical filter combination.

In this work, attention has been focused on the study of BM-DBM interaction with six commercial solar filters represented in Chart 1: octyl methoxycinnamate (**1**), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (**2**), octocrylene (**3**), diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (**4**), octyl triazone (**5**) and dioctyl butamido triazone (**6**). A systematic study on the photochemical stability of the UV filter combinations, together with photophysical experiments to investigate the processes involved in the photodegradation or photostabilization of BM-DBM and considered UV filters, has been carried out.

Results and discussion

Photostability studies

As mentioned above, an important step in UV filter evaluation is the study of its photostability. As a preliminary experiment, methylol solutions of UV filters were irradiated for up to 4 h with simulated sunlight, and their degradation was followed

by HPLC. Most of the considered compounds showed a good tolerance to UV irradiation, with recovery yields ranging from 92 to 100%. By contrast, filter **1** and BM-DBM suffered photochemical reaction to some extent, with conversion yields of 28 and 56%, respectively (Fig. 2A). Their photobehavior has been well documented in the literature, the main processes being isomerization of **1** and oxidative photofragmentation in the case of BM-DBM.^{3,4,9}

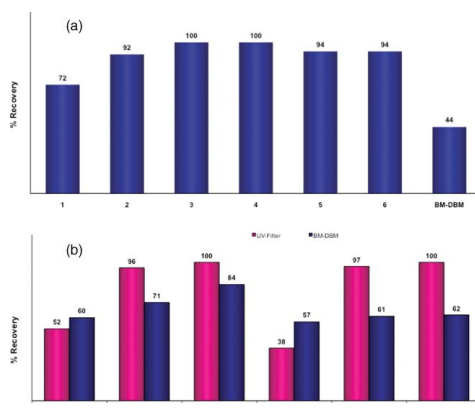
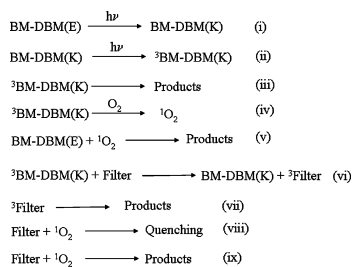


Fig. 2 Percentage of recovery of UV filters after 4 h irradiation with simulated sunlight. UV filters **1–6** were irradiated alone (a) or in combination with BM-DBM (b).

In most sunscreen formulations, at least two UV filters are used to obtain a high level of protection against UV radiation, one absorbing in the UVA region (generally BM-DBM) and the other one to cover the UVB region. As commented above, this combination may have a double-edged sword effect: BM-DBM photodegradation can be retarded by the presence of the other filters but, conversely, it can also be accelerated if a photoreaction occurs between the two components. To evaluate the interaction of BM-DBM with the different chemical filters, mixtures were irradiated, and the photodegradation of each component was followed by HPLC. As a general trend, the rate of BM-DBM degradation decreased in the presence of the other filters, especially in the case of **2** and **3**. Nevertheless, this protective effect was more than counterbalanced by an accelerated degradation of **1** and **4** (Fig. 2b).

Mechanistic scheme

In view of these results, a mechanism-based strategy was designed in order to investigate, in a more systematic way, the photostability of sunscreens, taking into account the different processes listed in Scheme 1.



Scheme 1 Different processes involved in the photostability of UV filters.

In the ground state, BM-DBM exhibits a keto-enol equilibrium where the chelated enol form BM-DBM(E) largely predominates; after irradiation, this equilibrium is displaced in favor of the photoreactive β -diketo isomer BM-DBM(K), Scheme 1, process (i).^{12,13} Other, non-chelated enol rotamers may also be formed; however, they are transient species with a millisecond lifetime and do not accumulate under steady-state irradiation conditions.^{13,14} In this context, a loss of UV-protecting capability is associated with the decrease of the enol UVA band centered at 360 nm and the concomitant increase of the β -diketone absorption at 260–280 nm. This tautomer, in turn, absorbs light and reaches its triplet excited state ${}^3\text{BM-DBM(K)}$, Scheme 1, process (ii). It should be pointed out that although BM-DBM(K) exhibits an absorption maximum in the UVC, an absorption tail reaches the UVB, which allows excitation of the keto form at a wavelength higher than 290 nm. It has been previously reported in the literature that this excited species is responsible for most of the harmful effects of BM-DBM. Indeed, irreversible photodegradation of BM-DBM has been observed and related in part to a Norrish Type I process occurring from the diketone triplet state^{3,4,12} (process (iii)). It is noteworthy that BM-DBM photostability is sensitive to the solvent, being higher in polar protic solvents and lower in non-polar media.³ Moreover, ${}^3\text{BM-DBM(K)}$ generates singlet oxygen

($\Phi_{\Delta} = 0.3$) (process (iv)) that reacts with BM-DBM enol form ($k_q = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹¹ leading to the formation of oxygenation products (process v).¹⁵

Sunscreen formulations often combine BM-DBM with different UV filters in order to protect against UVA and UVB radiation while photostabilizing BM-DBM. Nevertheless, the resulting combination does not always show the desired benefit, as the presence of an added chemical filter could interfere in the photophysical and photochemical properties of BM-DBM (Scheme 1, processes (vi)–(ix)).^{4,6–9}

The ideal protector should prevent or quench all the harmful processes produced by ${}^3\text{BM-DBM(K)}$, neither suffering decomposition nor being involved in a reaction with BM-DBM; thus, all the accumulated energy would be dissipated in non-radiative processes.

The second filter could interfere in different ways. First of all, it could compete with BM-DBM for light, preventing formation of ${}^3\text{BM-DBM(K)}$ through process (i) and (ii). More interestingly, quenching of ${}^3\text{BM-DBM(K)}$ by triplet–triplet energy transfer (process (vi)) would lead to the triplet excited state of the filter (${}^3\text{Filter}$), which could eventually result in its degradation (process (vii)). Finally, the UV filter could also act as an antioxidant by quenching singlet oxygen (process (viii)) either by a physical mechanism or as a consequence of a chemical reaction (process (ix)).

A systematic study on the role of these processes in the photostability of filter combinations containing BM-DBM is detailed below.

Tautomerization of BM-DBM. Process (i)

The influence of added filters **1–6** on the photochemical tautomerization of BM-DBM was studied first. As shown in Fig. 3, this process can be conveniently monitored by UV-Vis spectroscopy, as absorption of the enol form at 360 nm decreases concomitantly with an increase of the β -diketo band.

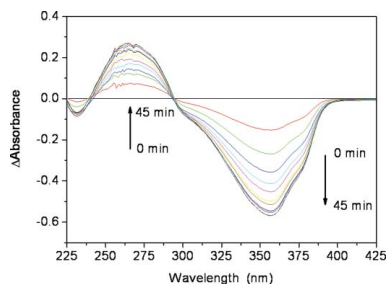


Fig. 3 Difference UV absorption spectra of UVA-irradiated BM-DBM (18 μM) in acetonitrile. The traces correspond to the difference between the spectrum of irradiated samples and that of initial BM-DBM (from 0 to 45 min).

The traces correspond to the difference between the spectrum of irradiated samples and that of initial BM-DBM (from 0 to 45 min).

Acetonitrile solutions of BM-DBM–Filter (1 : 1, w/w) were irradiated at 355 nm, and the influence of the filter on the photomodification of the keto-enol equilibrium was followed by

UV-Vis spectroscopy. As shown in Fig. 4, the degree of protection towards ketonization of BM-DBM was filter dependent. Thus, strong absorption in the UVA-region was one of the factors with a clear influence on this effect, as suggested by the significant retardation of the process using **2** and **4**.

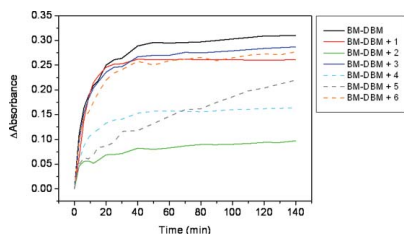


Fig. 4 Increase of the 280 nm band in the presence or in the absence of UV filters as a function of the irradiation time.

Formation of ³BM-DBM(K). Process (ii)

Although partial protection was achieved through the UVA-absorbing capability of some filters, formation of BM-DBM(K) could not be totally avoided and hence further irradiation could lead to formation of ³BM-DBM(K). In this context, the different UV filters would interfere in a second level of protection (process (ii)), reducing the number of photons absorbed by BM-DBM(K) and avoiding, in part, formation of the triplet excited state of the β-diketo tautomer. Indeed, the study of ³BM-DBM(K) is not an easy matter. It could be carried out on pre-irradiated samples of BM-DBM; nevertheless, the results obtained with these photomixtures can be misleading due to the variation of keto/enol ratios with time (both under irradiation and in the dark).¹² In previous works, it has been demonstrated that alkylation in the α-carbonyl position is a simple and efficient way to block BM-DBM in its β-diketo form.^{11,16}

In order to address this issue, laser flash photolysis was performed at 308 nm (Xe/HCl excimer) on deaerated solutions of methylated BM-DBM (BM-DBM-Me) in acetonitrile. Thus, the triplet excited state was studied by recording its transient absorption spectrum. Lifetimes were determined by monitoring the decay at the maximum of transient absorption. The triplet-triplet transition of the β-diketo form was detected and the corresponding decays, in the absence and in the presence of UV filters, were monitored at 380 nm (Fig. 5). The protective effect was estimated by measuring the amount of ³BM-DBM-Me formed immediately after the pulse, *i.e.* the top absorbance of the triplet decay trace. For each added filter, the intensity of the initial ³BM-DBM-Me signal was plotted as a function of filter concentration, an example is shown in Fig. 6a. When the results obtained with all filters were compared, the following order of protection ability was found **5** ≈ **6** > **2** > **3** ≈ **4** > **1** (Fig. 6b).

Triplet photoreactivity of BM-DBM (K). Processes (iii) to (v)

Photoreactivity from ³BM-DBM(K) has been previously described in the literature. Process (iii) mainly corresponds to oxidative fragmentation initiated by a Norrish Type I mechanism,

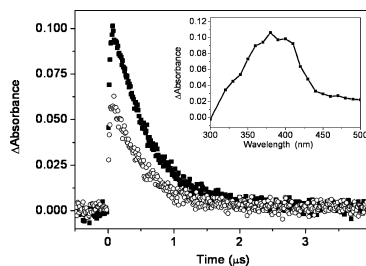


Fig. 5 ³BM-DBM-Me decays monitored at 380 nm in the absence (squares) and in the presence (open circles) of **2** in a proportion 1 : 1, w/w. Inset: Triplet-triplet transient absorption of a deaerated acetonitrile solution of BM-DBM-Me.

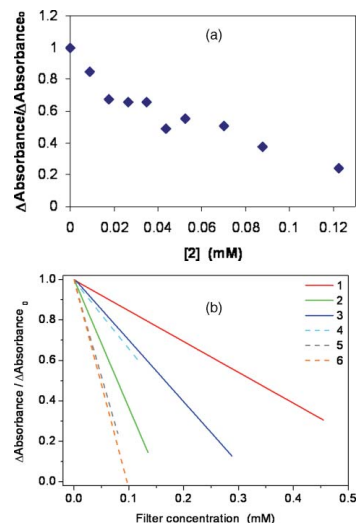


Fig. 6 (a) Normalized amplitude of the initial ³BM-DBM-Me signal in the presence of **2**, after laser flash photolysis of deaerated acetonitrile mixtures, as a function of filter concentration. (b) Normalized amplitude of the initial ³BM-DBM-Me signal in the presence of the different UV filters (**1–6**) as a function of their concentration (only linear fittings are shown for a better clarity).

leading to formation of benzoic acid derivatives.³ As expected for triplet states, ³BM-DBM(K) also reacts with oxygen ($k_q = 2.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), generating singlet oxygen with a quantum yield of $\Phi_A = 0.3$ (process (iv)). Finally, the photoreactivity of ¹O₂ with the enol form has been reported in the literature and leads to different types of peroxides and their cleavage products.^{3,7,15} Specifically, a bimolecular rate constant of *ca.* $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ has been determined for the dynamic quenching of ¹O₂ by BM-DBM(E).¹¹

Quenching of ³BM-DBM(K) by UV filters. Process (vi)

Laser flash photolysis was performed to evaluate the interaction between ³BM-DBM-Me (as a ³BM-DBM(K) equivalent) and the

Table 1 Bimolecular rate constants obtained for the quenching of ³BM-DBM-Me by UV filters

UV filter	$k_q/\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1	7.3
2	1.9
3	3.8
4	1.8
5	N.D. ^a
6	N.D. ^a

^a Not determined, due to the appearance of interfering transient signals attributed to the added filters.

commercial UV filters. In a control experiment, no transient absorption spectrum was detected for UV filters 1–4 alone. Remarkably, the decay of ³BM-DBM-Me, monitored at 380 nm, was shortened upon addition of most of the filters considered. High bimolecular quenching rate constants of *ca.* $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ were obtained from the corresponding Stern–Volmer plots (Table 1).

Stability of UV filters under triplet photosensitization. Process (vii)

Quenching of ³BM-DBM(K) by a triplet–triplet energy transfer mechanism should result in population of the triplet excited state of UV filters. Photostability of filters is generally evaluated by investigating degradation under direct irradiation, which does not usually lead to triplet state population. Thus, it is relevant to assess photoreactivity under triplet state photosensitization conditions. For this purpose, acetone was used as an energy donor. Deaerated solutions of the different organic filters 1–6 in acetonitrile–acetone (6:1, v/v) were irradiated at 254 nm, and the process was followed by UV-Vis spectroscopy. As an example, photosensitized degradation of compound 4 is shown in Fig. 7a. In Fig. 7b, the relative absorption of the filters at their maximum wavelength after a given irradiation time are shown; the results clearly indicate that 2 and 3 are more stable than 1, 4, 5 and 6.

Quenching of singlet oxygen by UV filters. Process (viii)

As outlined in Scheme 1, process (viii), UV filters could exhibit antioxidative properties by quenching singlet oxygen. To evaluate this property, ¹O₂ was generated using perinaphthenone as photosensitizer ($\Phi_A = 1$ in acetonitrile¹⁷), and its near-IR emission decay was monitored at 1270 nm. Singlet oxygen lifetime (*ca.* 90 μs) was shortened in the presence of UV filters (see Fig. 8 for the case of 6). Stern–Volmer plots were obtained by representing the reciprocal lifetime as a function of UV filter concentration, and the bimolecular rate constants were determined from the slope of the linear plots (Fig. 8, inset). Filters 5 and 6 exhibited an important potential to quench ¹O₂, with rate constants of 4 and $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. In comparison, 3 and 4 were less efficient (k_q of *ca.* $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), whereas 1 and 2 did not show any significant interaction.

Degradation of UV filters by singlet oxygen. Process (ix)

Singlet oxygen quenching by the UV filter can result in its decomposition, as described above for BM-DBM(E) (process (v)). Hence, the stability of 3, 4, 5 and 6 was investigated in the

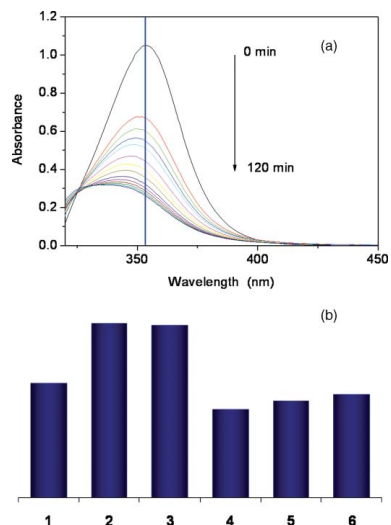


Fig. 7 (a) Absorption spectra of compound 4 (17 μM) after irradiation at 254 nm (low pressure Hg lamps) in nitrogen-bubbled acetonitrile–acetone (6:1, v/v). (b) Decomposition of the different UV filters photosensitized by acetone; relative absorbance values at the absorption maxima are given after 30 min of irradiation.

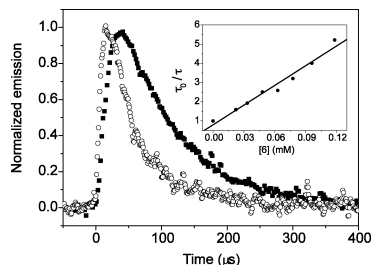


Fig. 8 Singlet oxygen decays monitored at 1270 nm in the absence (squares) or in the presence (open circles) of filter 6, after excitation at 308 nm (Xe/HCl excimer laser). Inset: Stern–Volmer plot.

presence of *meso*-tetrakis(2,4,6-trimethylphenyl)porphine (TMP) as singlet oxygen photosensitizer. Oxygen saturated solutions of the filters in the presence of TMP were irradiated at 420 nm, and degradation was followed by UV-Vis spectroscopy. At this wavelength, selective excitation of TMP is achieved due to the lack of absorption of UV filters; therefore, this methodology allows the study of photoreactivity derived from ¹O₂ attack. As shown in Fig. 9, none of the considered filters are decomposed in the presence of singlet oxygen. Therefore, the antioxidant properties of 3, 4, 5 and 6 are not associated with their degradation and might be due to physical quenching.

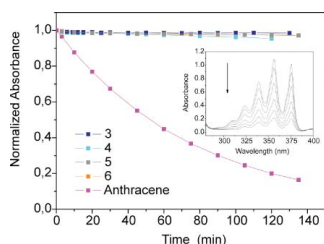


Fig. 9 Decomposition of UV filters 3–6 upon singlet oxygen photosensitization. For comparison, photooxygenation of anthracene under identical conditions is included; the UV-absorption changes are shown in the inset.

Experimental section

Steady-state UV-Vis absorption spectroscopy

Absorbances of the samples were recorded with a double beam Varian UV-VIS model Cary 300 Scan spectrophotometer, using 1 cm pathway quartz cuvettes.

Transient absorption spectroscopy

Two laser flash photolysis systems were employed for the studies. The first one was based on a pulsed Xe/HCl Excimer Laser (LEXTRA50 Lambda Physik LaserTechnik), using 308 nm as excitation wavelength (40 mJ per pulse, 10 ns per pulse). The second laser was a Nd:YAG SL404G-10 Spectron Laser Systems using 266 nm as excitation wavelength. The single pulses were of *ca.* 10 ns duration, and the energy was lower than 5 mJ per pulse. In general, samples received between 1 and 3 pulses for all the kinetic experiments.

A Lo255 Oriol Xenon lamp was employed as detecting light source. The laser flash photolysis apparatus consisted of a pulsed laser, a Xe lamp, a monochromator (Oriol, model 77200), a photomultiplier (Oriol, model 70705) system and a TDS-640A Tektronix oscilloscope. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer.

Singlet oxygen detection

The luminescence (1270 nm) from singlet oxygen was detected by means of an Oriol 71614 germanium photodiode (5 mm²) coupled to the laser photolysis cell in right-angle geometry. An excimer laser operated with a Xe/HCl gas mixture (LEXTRA50 Lambda Physik LaserTechnik) was used for excitation ($\lambda = 308$ nm, 30 mJ per pulse, 10 ns per pulse). A 5 mm thick (5 cm 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.

Photoreactor

A Luzchem photoreactor (model LZC 4V) was used for the irradiation experiments. Unless otherwise specified, the eight lateral lamps of the photoreactor have been used. Fluorescent tubes from Luzchem were used, model LES-UVC-01 with a nearly

monochromatic emission wavelength at 254 nm or models LES-UVA-01 and LES-420-01 with emission bands centered at 355 nm and 420 nm, respectively. Samples were irradiated under stirring in 1 cm pathway quartz cells.

Solar simulator

Broadband irradiation of the solutions was carried out using Suntest CPS (Xenon arc lamp). Its output was adequately filtered to produce a spectrum approximating natural sunlight (Coated Quartz Glass and UV Special Glass, provided with SunCool). The spectral output was measured as *ca.* 765 W m⁻².

Chemicals

All solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification; they were of HPLC or spectroscopic grade. Solar filters 2, 3 and 6 were provided by Ciba, Symrise and 3V Sigma, respectively; 4 and 5 were provided by BASF; BM-DBM and filter 1 were from DSM. *meso*-Tetrakis(2,4,6-trimethylphenyl)porphine (TMP) was purchased from Frontier Scientific. *tert*-Butylmethoxy dibenzoylmethane (BM-DBM-Me) was prepared by methylation of BM-DBM, as previously described.¹¹

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

A Waters Alliance 2695 apparatus was used, equipped with a XBridge Phenyl column (5 μ m, 4.6 \times 50 mm) kept at a temperature of 45 $^{\circ}$ C. A 5 min gradient from 75% to 95% of eluent A (methanol–acetonitrile–tetrahydrofuran, 6 : 1 : 1, v/v/v), with eluent B being acetic acid 0.5% in water, was used as mobile phase with a flow of 1 mL min⁻¹. Detection was performed at 350 nm and at the absorption maximum, if different.

Photostability studies

Solutions of UV filter alone (3% w/v) or in the presence of BM-DBM (3% w/v) in miglyol 812 N (caprylic/capric triglyceride, a mixture of triglycerides with 50–64% C₆ and 30–45% C₁₀ fatty acids) were prepared. The solution was applied on a quartz cell as a thin film using a piston-operated pipette (a total volume of 5.6 μ L on the cell, meant approximately 2 μ L cm⁻²) and irradiated using the solar simulator Suntest CPS (4 h at 35 $^{\circ}$ C and 765 W h m⁻²). After irradiation, samples were taken into 50 mL of methylene chloride and analyzed by HPLC.

Tautomerization of BM-DBM(E)

Samples were prepared with a BM-DBM:filters ratio of 1 : 1 (w/w) under acetonitrile, in aerated atmosphere, adjusting the 355 nm absorbance at 0.9. A concentration of 8 mg L⁻¹ was used in the case of BM-DBM alone, whereas for BM-DBM:filters 1 : 1 (w/w) the concentrations were: 6.1 mg L⁻¹ for 1, 5 mg L⁻¹ for 2, 10.4 mg L⁻¹ for 3, 4.5 mg L⁻¹ for 4, 8.6 mg L⁻¹ for 5 and 6. Irradiations were made with only two UVA lamps of the photoreactor during a total period of 45 min. Kinetics of irradiation were monitored by UV-Vis spectroscopy.

Formation of ³BM-DBM(K)

Solutions of BM-DBM-Me in acetonitrile were adjusted to an absorbance of 0.3–0.35 at the excitation wavelength (308 nm) and purged with nitrogen. Stock solutions of filters were prepared in DMSO, in such a way that only a small volume (microlitres) of them was added to the BM-DBM-Me solutions to obtain the desired filter concentration. Then, the resulting samples were submitted to laser flash photolysis, using the Xe/HCl excimer laser for excitation.

Quenching of ³BM-DBM(K) by UV filters

Similar conditions were used as described above, but BM-DBM-Me absorbance was adjusted for an excitation wavelength of 266 nm in order to avoid residual absorption by the UV filters. The rate constants of ³BM-DBM-Me quenching by the different UV filters were obtained from the Stern–Volmer plots, following eqn (1):

$$k_{\text{obs}} = k_o + k_q[Q] \quad (1)$$

where k_q is the triplet quenching rate constant, $[Q]$ is the quencher concentration and k_o is the triplet decay rate constant in the absence of quencher.

Stability of UV filters under triplet photosensitization conditions

Stock solutions of UV filters were prepared in toluene. Then, aliquots of these solutions were added to a mixture of acetonitrile–acetone (6:1) in order to obtain a filter concentration of 10–30 mg L⁻¹. Specifically, the employed concentration were 160 μM for **1**, 11 μM for **2** and **6**, 82 μM for **3**, 17 μM for **4**, 10 μM for **5**. Irradiation was performed under aerated conditions at 254 nm (UVC lamps) during a total period of 120 min; the kinetics of decomposition was followed by UV-Vis spectroscopy.

Quenching of singlet oxygen by UV filters

Perinaphthenone was dissolved in acetonitrile, adjusting the 308 nm absorbance around 0.6 (2.33 × 10⁻⁴ M). Stock solutions of the filters were prepared in DMSO. Near-IR emission decays of singlet oxygen were measured under aerated conditions, in the presence of increasing amounts of the UV filters, after excitation of perinaphthenone at 308 nm with a pulsed Xe/HCl excimer laser.

Degradation of UV filters by singlet oxygen

Stock solutions of filters and *meso*-tetrakis(2,4,6-trimethylphenyl)porphine (TMP) were prepared in toluene. Acetonitrile solutions of TMP (concentration of 5.5 × 10⁻⁷ M, corresponding to an absorbance of about 0.2 at the 420 nm Soret band) and UV filter (absorbance at its maximum *ca.* 1) were prepared and purged with O₂. The following concentrations of the filters were used: 47 μM for **1**, 17 μM for **2**, 83 μM for **3**, 23 μM for **4**, 4.5 μM for **5** and 8 μM for **6**. Samples were irradiated in a photoreactor, using the 420 nm emitting lamps. Blanks were prepared with the

same concentrations and irradiated under the similar conditions, but solutions were purged with an inert gas.

Conclusion

A systematic, knowledge-based methodology has been developed for the study of filter–filter interactions in connection with sunscreen photostability. It takes into account the major mechanistic pathways involved in deactivation of the excited states generated after sunlight absorption. In the case of the considered combinations containing binary mixtures of BM-DBM and added UVA, UVB or broadband filters, the key processes are likely associated with quenching of the triplet diketone form of BM-DBM and photodegradation of the added filters upon triplet photosensitization conditions. However, depending on the experimental conditions, the other considered processes may also play a significant role; so their relative contributions may result in minor modifications of the overall photoreactivity.

Notes and references

- 1 M. F. Naylor and K. C. Farmer, *Arch. Dermatol.*, 1997, **133**, 1146–1154; A. Darvay, I. R. White, R. J. G. Rycroft, A. B. Jones, J. L. M. Hawk and J. P. McFadden, *Br. J. Dermatol.*, 2001, **145**, 597–601; S. Schauder and H. Ippen, *Contact Dermatitis*, 1997, **37**, 221–232.
- 2 B. L. Dille, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1994, **16**, 47–52; A. Chardon, D. Moyal and C. Hourseau, Persistent pigment-darkening response as a method for evaluation of ultraviolet A protection assays, in *Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects*, ed. N. J. Lowe, N. A. Shaath and M. A. Pathak, Marcel Dekker, New York, 2nd edn, 1997, pp. 559–582.
- 3 W. Schwack and T. Rudolph, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1995, **28**, 229–234.
- 4 N. M. Roscher, M. K. O. Lindemann, S. Bin Kong, C. G. Cho and P. Jiang, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1994, **80**, 417–421.
- 5 M. Dubois, P. Gilard, P. Tiercet, A. Deflandre and M. A. Lefebvre, *J. Chim. Phys.*, 1998, **95**, 388–394.
- 6 H. Gonzalez, N. Tarras-Wahlberg, B. Stromdahl, A. Juzeniene, J. Moan, O. Larko, A. Rosen and A.-M. Wennberg, *BMC Dermatol.*, 2007, **7**, 1.
- 7 D. Dondi, A. Albini and N. Serpone, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, **5**, 835–843.
- 8 E. Chatelain and B. Gabard, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **74**, 401–406; B. Herzog, M. Wehrle and K. Quass, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 869–878.
- 9 S. P. Huong, V. Andrieu, J. P. Reynier, E. Rocher and J.-D. Fourneron, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2007, **186**, 65–70.
- 10 E. Damiani, L. Rosati, R. Castagna, P. Carloni and L. Greci, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2006, **82**, 204–213.
- 11 C. Paris, V. Lhiaubet-Vallet, O. Jimenez, C. Trullas and M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 178–184.
- 12 A. Cantrell and D. J. McGarvey, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2001, **64**, 117–122.
- 13 A. Aspée, C. Aliaga and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 481–485.
- 14 I. Andrea, A. Bringham, F. Böhm, H. Gonzenbach, T. Hill, L. Mulroy and T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1997, **37**, 147–150.
- 15 M. Yoshioka, Y. Sakuma and M. Saito, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 9247–9250.
- 16 F. Wetz, C. Routaboul, D. Lavabre, J. C. Garrigues, I. Rico-Lattes, I. Pernet and A. Denis, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 316–321.
- 17 R. Schmidt, C. Tanelian, R. Dunsbach and C. Wolff, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1994, **79**, 11–17.

Interacció entre filtres solars Sunscreen interactions

Mireia Marín,^a Virginie Lhiaubet-Vallet,^a Òscar Jiménez,^b Olga Gorchs,^b Carles Trullas^b i Miguel Ángel Miranda^{a,*}

^aUniversitat Politècnica de València–CSIC. Institut de Tecnologia Química

^bISDIN, SA. Dermopharmaceutical Discovery Unit, Barcelona

Resum. Els protectors solars s'utilitzen per protegir la pell de la radiació solar ultraviolada (UV), particularment de l'UVA i UVB. Una característica important que hauria de tenir un filtre solar és la fotoestabilitat. És a dir, després d'irradiar un filtre UVA o UVB aquest hauria de romandre invariable. Tanmateix, molts filtres presenten certa reactivitat. Un conegut exemple és el del *tert*-butilmetoxidibenzoilmetà (BM-DBM, també conegut com avobenzona) que, malgrat la seua fotolabilitat, és un filtre UVA utilitzat habitualment. En la formulació de molts protectors solars s'utilitzen almenys dos filtres per tal de cobrir tot l'espectre UV. Això pot donar lloc bé a un efecte sinèrgic que afavoreix la fotoestabilització dels filtres, o bé a una acceleració de la descomposició d'aquests. La millora de l'estabilitat dels filtres solars UV rau en el fet d'entendre les propietats fotoquímiques i fotofísiques d'aquestes combinacions de filtres. Tot i això, fins ara no existia una metodologia generalment acceptada per tal d'estudiar de manera sistemàtica els efectes d'aquestes combinacions.

En aquest treball s'ha centrat l'atenció en l'estudi de les interaccions de l'avobenzona combinada amb sis filtres UV comercials. A partir d'aquests compostos s'ha dissenyat una estratègia per tal d'investigar la fotoestabilitat dels protectors solars d'una manera més sistemàtica, tenint en compte els diferents processos que poden donar-se considerant aquestes combinacions.

Paraules clau: Fotòlisi de Flaix Làser, Filtres UV, Avobenzona, Oxigen singlet, Estat excitat triplet, fotoestabilitat.

Abstract. Sunscreens are used to protect against ultraviolet (UV) radiation reaching earth *i.e.* UVA and UVB regions of the solar spectrum. Among the different characteristics a sunscreen should possess, photostability is important not only to maintain an efficient protection along exposition time but also to avoid adverse effects like phototoxicity and photoallergy. However, many filters are photoreactive. This is the case of the well-known *tert*-butylmethoxydibenzoylmethane (BM-DBM, also known as avobenzona) which, in spite of its photolability, is a widely used UVA filter. In sunscreen formulation, at least two filters are generally present in order to cover all the UV spectra. This could produce a synergistic effect that favours filter stabilization or, on the other hand, could accelerate filter decomposition. Thus, improvement of UV filter stability is a key factor in sunscreen development that relies on the understanding of photochemical and photophysical properties of the filter combination. However, until now a general methodology to study systematically these combinations does not exist.

In this work, we have focused the attention on the interactions between avobenzona and six commercial UV filters. In order to investigate the photostability of sunscreens in a more systematic way, the designed strategy takes into account all the different processes that could occur between the different single components.

Keywords: Laser Flash Photolysis, UV-filters, Avobenzona, Singlet oxygen, Triplet excited state, Photostability.

El sol i els protectors solars

Hom coneix que la major part de la radiació solar que arriba a la Terra és filtrada per l'atmosfera, sobretot la radiació d'alta energia. No obstant això, una part d'aquesta radiació és capaç de travessar les capes atmosfèriques i arribar fins a la superfície terrestre, és la radiació ultraviolada A i B (UVA: de 400 nm a 320 nm; UVB: de 320 nm a 280 nm). Quan aquesta radiació incideix sobre els éssers humans, pot produir efectes sovint adversos, per exemple, a la pell. A l'estiu, hom pren el sol per bronzejar-se. El bronzejat és la conseqüència de l'augment de producció de melanina, que actua com a pantalla natural del sol. Malgrat això, depenent del tipus de pell, el temps durant el qual es pren el sol, la

freqüència, etc., l'exposició a la radiació solar pot causar cremades (eritemes), fotoenvelliment cutani i, fins i tot, es pot arribar a patir càncer de pell (fotocarcinogènesi).

Per tal de protegir-nos de la radiació solar ultraviolada i evitar així aquests efectes sobre la pell, sovint utilitzem filtres solars. Un filtre solar és una molècula capaç d'absorbir llum ultraviolada i, en fer-ho, passa a un estat excitat de més energia. Quan torna a l'estat fonamental, idealment ho fa mitjançant processos de desactivació no radiativa (és a dir, sense emetre fluorescència o fosforescència, només «desprenent» calor) i torna invariable a l'estat inicial, de manera que pot tornar a començar el cicle (figura 1). El procés de desactivació ha de ser molt ràpid i calen filtres que no formin espècies intermèdies, és a dir, que siguin estables. Així, doncs, l'estabilitat dels filtres evita altres processos (reaccions de les espècies excitées del filtre amb altres molècules o biomolècules, transferència d'energia a altres espècies, etc.) que poden donar lloc a fototoxidant i fotoal·lèrgies.¹⁻³

Per tant, l'estabilitat (o fotoestabilitat, en aquest cas, quan hom es refereix a estabilitat davant la llum) és una propietat molt important dels filtres. Tot i que un filtre ideal hauria de romandre invariable quan és exposat a la llum (figura 1), no sempre és així. I és que, de vegades,

Correspondència: Miguel Ángel Miranda. Institut de Tecnologia Química, UPV-CSIC. Universitat Politècnica de València. Avinguda dels Tarongers, s/n, 46022 València.

Tel.: +34 963877809. Fax: +34 963877807.
A/e: mmiranda@qim.upv.es

els filtres mostren una certa fotoreactivitat (és a dir, reaccionen en ser excitats amb llum). N'és un bon exemple el *tert*-butilmetoxidibenzoil metà (BM-DBM), més conegut com a *avobenzona*. Aquesta, malgrat la seva fotolabilitat⁴⁻⁶ (és a dir, no roman estable quan se l'exposa a irradiació lumínica), és un dels filtres més utilitzats en formulació de protectors solars.



Figura 1. Esquema del funcionament d'un filtre solar.

Filtres combinats: fotoestabilització o fotodescomposició?

A la indústria es poden trobar nombrosos tipus de filtres solars. Aquests es poden classificar, per exemple, segons la zona de l'UV on absorbeixen. Des d'aquest punt de vista, es pot parlar de filtres UVA, UVB o d'ampli espectre (que cobreixen totes dues franges de l'UV). En formulació de protectors solars, sovint s'utilitza una combinació d'almenys dos filtres (UVA i UVB) per tal de protegir la pell a tot l'espectre de la llum ultraviolada. La combinació de dos filtres pot donar lloc bé a un efecte sinèrgic que afavoreix la fotoestabilització dels filtres o bé a una acceleració de la descomposició d'aquests.

Així, doncs, la millora de l'estabilitat dels filtres solars

UV rau en el fet d'entendre les propietats fotoquímiques i fotofísiques d'aquestes combinacions de filtres. Malgrat això, fins ara no hi havia una metodologia generalment acceptada per tal d'estudiar els efectes d'aquestes combinacions de manera sistemàtica. En el treball que aquí es presenta, es proposa una metodologia sistemàtica per estudiar la interacció de l'*avobenzona* (un dels filtres més emprats) amb un altre filtre UV. Els filtres tinguts en compte, utilitzats amb freqüència en la formulació de protectors solars, són els següents: octil metoxicinamat (1), bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (2), octocrilè (3), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoat (4), octil triazona (5) i dioctil butamido triazona (6) (figura 2). Per dur a terme aquest estudi, s'han considerat diferents processos que podrien tenir lloc entre l'*avobenzona* i aquests filtres (figura 3). L'estudi d'aquests processos servirà, a més, per avaluar l'estabilitat d'aquestes combinacions de filtres. A continuació es descriurà la casuística considerada:

Procés (i): s'ha descrit a la literatura que, en irradiar l'*avobenzona*, la forma enòlica tautomeritza a la forma cetònica.^{7,8} A partir d'aquest tautòmer, poden tenir lloc diferents processos secundaris.

Procés (ii): quan l'*avobenzona*, en la seva forma cetònica [BM-DBM(K)], absorbeix llum, pot passar al seu estat excitat triplet [³BM-DBM(K)]. Els estats excitats triplets solen tenir un temps de vida llarg, de manera que tenen temps d'interaccionar amb altres molècules i poden produir, així, reaccions que de vegades no són desitjades.

Procés (iii): des de l'estat triplet, la BM-DBM(K) pot formar diferents fotoproductes⁴⁻⁶ que, alhora, també poden donar altres reaccions.

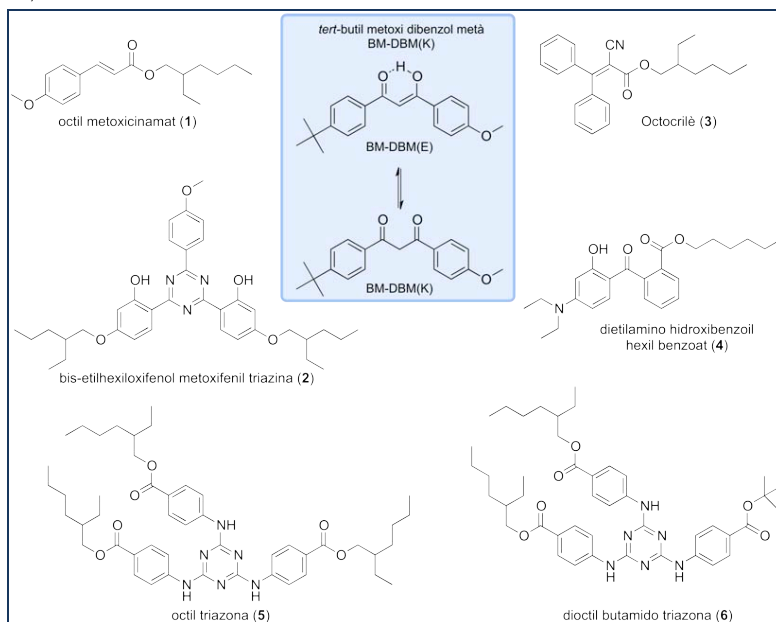


Figura 2. Estructures de l'*avobenzona* (BM-DBM) i dels filtres UV d'estudi.

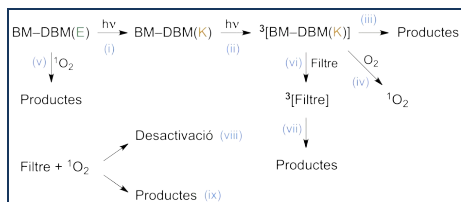


Figura 3. Esquema dels diferents processos implicats en la fotoestabilitat d'una combinació de dos filtres UV en la qual un d'ells és l'avobenzona.

Procés (iv): a més, el $^3\text{BM-DBM(K)}$, en contacte amb oxigen, pot produir oxigen singlet ($^1\text{O}_2$).⁹ Aquesta és una espècie excitada d'oxigen que ha estat objecte de nombrosos estudis pel fet de ser molt reactiva amb biomolècules, entre d'altres.

Procés (vi): en presència d'un altre filtre, es pot donar una transferència d'energia entre el $^3\text{BM-DBM(K)}$ i la nova molècula. D'aquesta manera, es formaria l'estat excitat triplet del filtre ($^3\text{Filtre}$) i el triplet de l'avobenzona es desactivaria (tornaria a l'estat fonamental).

Procés (vii): el $^3\text{Filtre}$, al seu torn, podria donar lloc a altres productes de fotodescomposició.

A més, aquest segon filtre, en presència d' $^1\text{O}_2$ (que s'hauria generat en el procés iv), podria donar lloc a dos processos ben diferents:

- D'una banda, podria desactivar aquesta espècie reactiva d'oxigen, la qual cosa seria un mecanisme favorable (**procés (viii)**).

- De l'altra, podria reaccionar amb aquest oxigen singlet per donar lloc a diferents productes de fotooxidació (**procés (ix)**).

Procés (x): l'últim cas que s'ha tingut en compte és que la BM-DBM(E), en interaccionar amb l'oxigen singlet, es podria també degradar i donar lloc a diferents productes de fotooxidació.

Així, doncs, l'objectiu d'aquest treball és estudiar, a través d'una metodologia sistemàtica, l'estabilitat dels sistemes combinats de dos filtres solars UV quan un d'ells és l'avobenzona. Es detallarà, a continuació, tot l'estudi sistemàtic suara presentat.

Procés (i): tautomerització de l'avobenzona

L'avobenzona, en formulació de protectors solars, està en la seva forma enòlica. No obstant això, en absorbir llum ultraviolada, es produeix una tautomerització a la seva forma cetònica. La implicació més «visual» d'això és que el seu espectre d'absorció passa de tenir un màxim centrat a la zona de l'UVA (al voltant de 355 nm) a estar centrat a longituds d'ona més energètiques (al voltant de 280 nm), de manera que deixa així desprotegida la zona UVA (figura 4).

En aquest apartat es vol veure si, en combinar l'avobenzona amb els diferents filtres, aquests són o no capaços d'evitar o de minimitzar la tautomerització. Per tal d'estudiar-ho, es combina l'avobenzona amb cada filtre, s'irradia el sistema amb llum UVA i es monitoren els canvis mitjançant l'enregistrament d'espectres d'absorció. El que s'observa és que, a mesura que s'irradia el sistema,

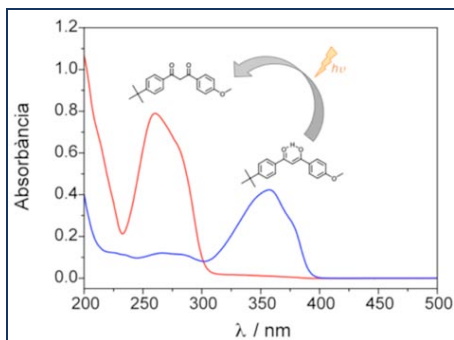


Figura 4. Espectres d'absorció de la BM-DBM(E) i la BM-DBM(K)-Me (avobenzona metilada en la posició a del carbonil). S'ha utilitzat aquesta darrera espècie per mesurar les propietats l'avobenzona cetònica, ja que fixa el tautòmer dicetònic.

amb llum UVA i es monitoren els canvis mitjançant l'enregistrament d'espectres d'absorció. El que s'observa és que, a mesura que s'irradia el sistema, la banda de l'UVA (forma enòlica) desapareix, mentre que la banda més energètica (forma cetònica) augmenta (figura 5). És a dir, es degrada la BM-DBM(E) per formar BM-DBM(K).

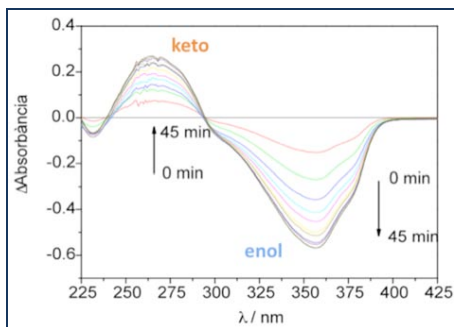


Figura 5. Espectres d'absorció diferència de l'avobenzona irradiada en acetonitril. Cada traç correspon a la diferència entre l'espectre de la mostra irradiada i l'inicial sense irradiar. La irradiació s'ha dut a terme periòdicament, durant 45 minuts.

Si es compara la formació de la BM-DBM(K) en presència dels filtres representant l'absorbància a 280 nm al llarg del temps d'irradiació (figura 6), es pot observar (pel *plateau*) que en algunes combinacions es forma més quantitat de BM-DBM(K) que en d'altres. De

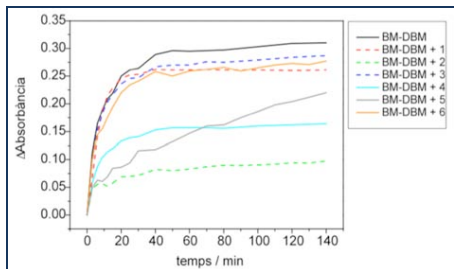


Figura 6. Augment de la banda de 280 nm en presència i absència dels diferents filtres UV, representat en funció del temps d'irradiació.

fet, són els filtres **2**, **4** i **5** els que eviten més la formació d'aquest tautòmer.

Procés (II): formació del triplet de la BM-DBM(K)

A continuació, s'avaluarà la formació de l'estat triplet de l'avobenzona cetònica en aquests sistemes combinats de dos filtres. Aquest punt és important perquè, com s'ha detallat anteriorment, des d'aquest estat triplet es poden donar nombrosos processos secundaris no desitjats.

Cal aclarir en aquest moment, que les mesures de l'avobenzona en forma cetònica s'han fet sempre utilitzant l'avobenzona metilada en la posició α dels carbonils [BM-DBM(K)-Me], ja que aquesta fixa el tautòmer dicetònic.⁹

Per tal d'enregistrar el senyal del $^3\text{BM-DBM(K)}$, s'utilitza la tècnica de fotòlisi de flaix làser. Aquesta tècnica permet mesurar tant els espectres d'absorció d'espècies transitòries (com ho és un triplet) com els decaïments temporals d'aquestes espècies. Per tant, a un medi que conté avobenzona cetònica, s'afegeixen concentracions creixents dels diferents filtres i s'enregistren els senyals obtinguts de $^3\text{BM-DBM(K)}$ amb la tècnica esmentada. En essència, el que s'observa, tal com es veu a la figura 7 (exemple per al filtre **2**), és que la intensitat del senyal de $^3\text{BM-DBM(K)}$ disminueix a mesura que augmenta la concentració del filtre en qüestió. És a dir, els filtres eviten (almenys en part) la formació del triplet de l'avobenzona cetònica.

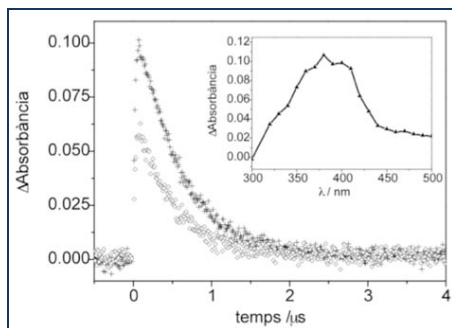


Figura 7. Decaïments temporals de la $^3\text{BM-DBM(K)-Me}$ monitorats a 380 nm en absència de filtre (creus) i en presència del filtre **2** (rombes buits) en una proporció 1:1 pes/pes. Requadre: Espectre d'absorció triplet-triplet de l'avobenzona metilada en acetonitril i sota atmosfera inert.

Si es quantifica aquesta disminució del senyal del $^3\text{BM-DBM(K)}$ representant la seva intensitat d'aquest senyal *versus* la concentració de filtre afegida, s'obtenen els gràfics de la figura 8. En aquests, un pendent més acusat de la recta indica que el filtre corresponent té una major capacitat de protecció enfront de la formació del $^3\text{BM-DBM(K)}$ i, per tant, una major capacitat de protegir els conseqüents processos no desitjats. L'ordre quant a capacitat de protecció és el següent: **5** \approx **6** $>$ **2** $>$ **3** \approx **4** $>$ **1**.

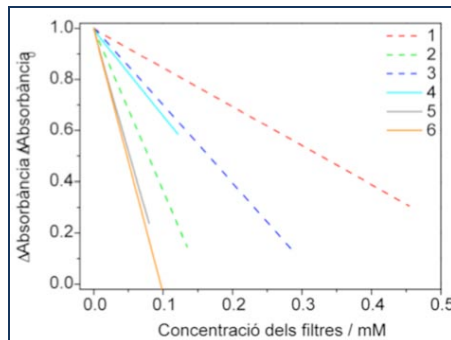


Figura 8. Amplituds normalitzades dels senyals del $^3\text{BM-DBM(K)-Me}$ en presència dels diferents filtres UV (1-6) en funció de la concentració d'aquests. La normalització està referida al senyal inicial en absència de filtre.

Processos (III), (IV) i (V): fotoreactivitat del $^3\text{BM-DBM(K)}$

Aquests processos no s'estudien en aquest treball, ja que han estat prèviament descrits a la literatura. Així, el procés (III) correspon sobretot a una fragmentació oxidativa iniciada per un mecanisme de Norrish Tipus I.⁴ A més, el $^3\text{BM-DBM(K)}$ també reacciona amb oxigen per formar $^1\text{O}_2$, amb un rendiment quàntic de $\phi_q = 0,3$ [procés (IV)].⁹ Finalment, la fotoreactivitat de l' $^1\text{O}_2$ amb la forma enòlica de l'avobenzona ha estat descrita també a la literatura.^{4,10,11} A grans trets, aquesta reactivitat implica la formació de diferents tipus de peròxids i els seus productes de ruptura.

Procés (VI): desactivació del $^3\text{BM-DBM(K)}$

En aquest apartat s'estudiarà si els diversos filtres són capaços de desactivar el triplet de l'avobenzona. Per tal d'enregistrar el senyal d'aquest triplet, s'utilitzarà, igual que abans, la tècnica de fotòlisi de flaix làser. Per tant, en un medi que conté avobenzona cetònica, s'afegeixen els diferents filtres i s'avalua l'efecte que això té sobre el senyal del $^3\text{BM-DBM(K)}$. En general, s'observa que, a mesura que augmenta la concentració del filtre en qüestió, el temps de vida del $^3\text{BM-DBM(K)}$ disminueix.

Filtre	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1	7.3
2	1.9
3	2.8
4	1.8
5	–
6	–

Taula 1. TAULA 1. Constants de desactivació del $^3\text{BM-DBM(K)}$ per als filtres UV.

Això indica que aquest triplet es desactiva a causa de la presència de l'altre filtre. Aquesta desactivació s'ha avaluat per a cada filtre mitjançant el càlcul d'un paràmetre que es coneix com a *constant de desactivació* (k_q). Les constants de desactivació del $^3\text{BM-DBM(K)}$ obtingudes es mostren a la taula 1. D'aquests valors cal destacar que, excepte per als filtres **5** i **6**, en els quals els

senyals s'obtenien poc clars i amb interferències, els filtres 1, 2, 3 i 4 desactiven el triplet de l'avobenzona cetònica d'una manera eficient.

Procés (VII): estabilitat del ³Filtre

Tal com s'ha descrit anteriorment, quan el filtre interacciona amb el triplet de l'avobenzona i el desactiva, ho fa a través d'un procés de transferència d'energia. A partir d'aquest procés, es forma el triplet del mateix filtre (³Filtre). És important estudiar l'estabilitat d'aquest triplet, ja que el fet que aquest fos reactiu podria donar lloc a nombrosos processos no desitjats. En aquest apartat s'avaluarà, doncs, si els filtres UV que s'estudien són estables des d'aquest punt de vista.

Per fer-ho, es forma el triplet del filtre a través d'un procés anomenat *fotosensibilització*. En aquest cas, aquest procés es duu a terme introduint acetona en un medi que ja conté el filtre i irradiant aquesta acetona selectivament. Amb això s'aconsegueix que es formi el triplet de l'acetona, que té una energia molt alta. Des d'aquest triplet, es produeix una transferència d'energia al filtre, de manera que es forma el ³Filtre (figura 9).

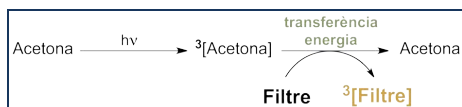


Figura 9. Esquema del procés de fotosensibilització del filtre utilitzant acetona com a fotosensibilitzador.

Per tal d'avaluar la degradació dels filtres sota aquestes condicions, se'n mesura l'absorbància al llarg del temps d'irradiació de l'acetona. Després de trenta minuts d'irradiació, la degradació de cada filtre és la que es presenta a la figura 10. Aquest gràfic de barres permet veure que els filtres que més es degraden són l'1, el 4, el 5 i el 6; en canvi, els més fotoestables són el 2 i el 3.

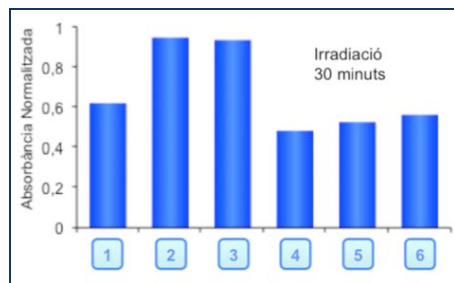


Figura 10. Descomposició dels diferents filtres UV fotosensibilitzats per acetona. Els valors d'absorbància relativa que es presenten fan referència a 30 minuts d'irradiació del sistema.

Processos (VIII) i (IX): filtres + ¹O₂

Tal com s'ha comentat anteriorment, el ³BM-DBM(K), en contacte amb oxigen molecular, és capaç de generar ¹O₂ [procés (iv)]. És important el fet d'estudiar l'efecte d'aquesta espècie (altament reactiva) sobre els filtres. Des d'aquest punt de vista, s'han considerat, tal com ja

s'ha assenyalat, dues possibilitats:

- D'una banda, els filtres podrien ser capaços de desactivar l'¹O₂ de manera «neta», és a dir, sense degradar-se ells mateixos.

- De l'altra, els filtres, en contacte amb aquest ¹O₂, podrien donar lloc a productes de fotooxidació.

Per tal d'estudiar si els filtres són capaços de desactivar l'¹O₂, es genera aquesta espècie utilitzant perinaftenona com a fotosensibilitzador i es monitora la seva fosforescència en forma de decaïment temporal a 1270 nm. En general, s'observa que el temps de vida de l'¹O₂ disminueix en afegir els filtres (a la figura 11 es veu un exemple per al cas del filtre 6), és a dir, l'¹O₂ es desactiva. Aquesta desactivació es pot quantificar mitjançant els càlculs de les constants de desactivació. Com més gran sigui aquesta constant, els filtres desactivaran l'¹O₂ d'una manera més eficient. Per als filtres 5 i 6, les constants de desactivació es troben al voltant de $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; per als filtres 3 i 4, són de l'ordre de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, i per als filtres 1 i 2, no es detecta cap desactivació.

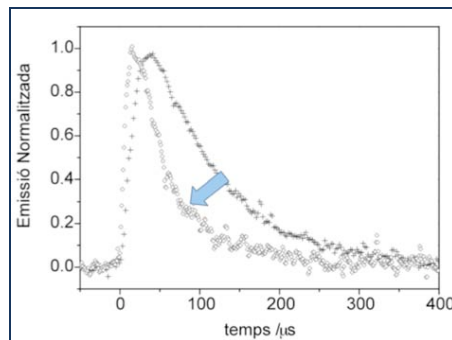


Figura 11. Decaïments temporals de fosforescència de l'oxigen singlet monitorats a 1270 nm en absència (creus) o presència (rombes buits) del filtre 6.

Amb aquests resultats, s'ha volgut estudiar si els filtres que són capaços de desactivar l'¹O₂ (és a dir, els filtres 3-6), en fer-ho, es degraden. Per fer això, es genera ¹O₂ utilitzant tetrametilporfina (TMP) com a fotosensibilitzador. Tot plegat es fa de la manera següent: s'afegeix TMP en un medi que conté el filtre i que, a més, està saturat d'O₂; s'irradia selectivament la TMP de manera que, a través d'un procés de fotosensibilització, es forma ¹O₂ a partir de l'oxigen del medi; a mesura que s'irradia la TMP i es forma aquest ¹O₂, es monitoren els canvis en el filtre a través de l'enregistrament d'espectres d'absorbció.

Per veure què es pot esperar, es fa l'experiment descrit amb una espècie que se sap del cert que es degrada en reaccionar amb l'¹O₂: l'antracè. Si es monitoren els espectres d'absorbància de l'antracè a mesura que s'irradia la TMP en un sistema com el que s'ha explicat, es veu com, a causa de la formació d'¹O₂, l'espectre de l'antracè disminueix (figura 12). L'antracè, doncs, es degrada.

Així, es pren l'antracè com una espècie de referència i es compara amb el que ocorre amb els filtres en les ma-

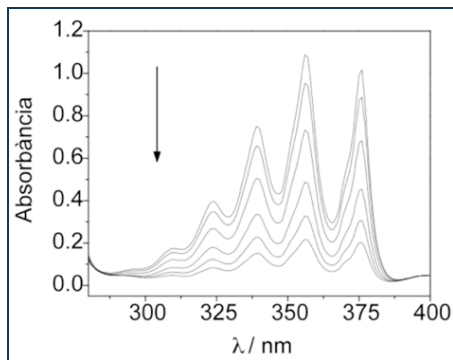


Figura 12. Canvis en l'espectre d'absorbància de l'antracè a mesura que es forma 1O_2 .

teixes condicions. Per fer-ho, es representen els màxims d'absorbància per a cada espècie enfront del temps d'irradiació i s'obté el que es veu a la figura 13. Tal com es pot comprovar, l'absorbància dels filtres no varia a mesura que es forma 1O_2 , és a dir, no s'observa cap degradació dels filtres a causa de la interacció amb l'oxigen singlet.

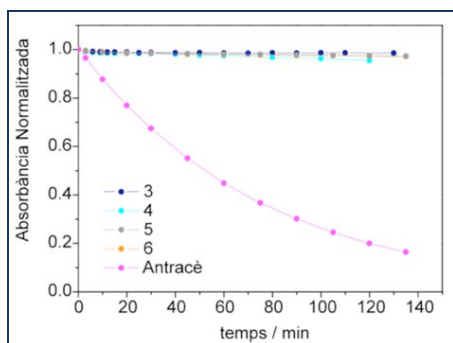


Figura 13. Descomposició dels filtres UV 3 – 6 deguda a la presència d' 1O_2 al medi (format per fotosensibilització). La descomposició de l'antracè sota les mateixes condicions ha estat inclosa a la figura per tal de poder compararla amb el que els succeeix als filtres.

Conclusions

Com a conclusió d'aquest treball, es pot extreure, en primer lloc, que s'ha aconseguit establir una metodologia sistemàtica per tal d'estudiar les interaccions filtre-filtre en una combinació de filtres solars en la qual l'un és l'avobenzona (un dels filtres més emprats en formulació). Aquesta metodologia està relacionada, tal com s'ha vist, amb l'avaluació de la fotoestabilitat d'aquesta combinació de filtres.

Cal dir també que els resultats obtinguts per a aquesta metodologia s'han comparat amb una altra metodologia. Aquesta darrera consisteix a avaluar per HPLC la degradació de cada filtre per separat després d'irradiar la barreja d'ambdós. A la figura 14, en un gràfic de barres, es veuen els resultats de la degradació per a les combinacions de filtres estudiades en aquest treball.

Mitjançant aquesta metodologia, s'ha obtingut que les combinacions més estables són les formades per l'avobenzona i els filtres 2 i 3. Això es correlaciona bé amb els resultats obtinguts a l'estudi exposat i permet establir els aspectes més importants a tenir en compte en la ruta mecanística proposada. Així, doncs, per tal que el sistema combinat de filtres sigui estable, és clau que la desactivació del $^3BM-DBM(K)$ sigui eficient i, a més, que en desactivar aquesta espècie, el filtre romangui estable.

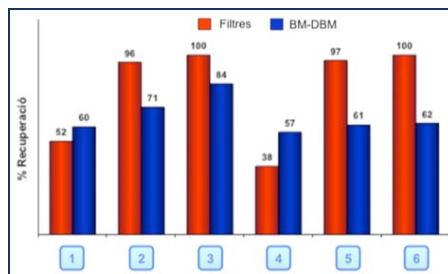


Figura 14. Percentatge de recuperació dels filtres UV després de 4 hores d'irradiació amb un simulador solar. Els filtres han estat irradiats combinats amb la BM-DBM.



M. Marin



M. A. Miranda

M. A. Miranda és Professor de Química Orgànica a la Universitat Politècnica de València i Director de l'Institut de Tecnologia Química (UPV-CSIC). Estudia Química a la Universitat de València i obtingué el doctorat a la Universitat Autònoma de Madrid el 1978, treballant al Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). Fèu dos estancies post-doctorals a la Universitat de Saarland i a la Universitat de Würzburg (Alemanya). Fou Professor Associat a la Universitat de València i al 1990 acceptà el càrrec que té a l'actualitat. Els seus temes de recerca principal estan centrats sobretot en la fotoquímica i la fotobiologia. El Professor Miguel A. Miranda ha rebut el premi Honda-Fujishima de la Societat Japonesa de Fotoquímica (2007), el premi Janssen-Cilag de Química Orgànica de la Real Societat Espanyola de Química (2008) i el Premi en Memòria de Theodor Förster de la Societat Alemanya de Química i la Societat Bunsen de Físico-Química (2010). Durant els anys 2009 a 2011 fou president de la Societat Europea de Fotobiologia.

M. Marin va néixer a València. Estudia Química a l'Institut Químic de Sarrià (Barcelona) on es llicencià el 2005. Fèu el Treball Final de Carrera en l'àmbit dels sensors fotoquímics amb el Professor Santi Nonell a l'Institut Químic de Sarrià i obtingué el títol d'Enginyera Química d'aquesta universitat l'any 2007. Seguidament començà a fer la tesi doctoral (que està finalitzant actualment) en l'àmbit dels fotobiocatalitzadors a l'Institut de Tecnologia Química (UPV-CSIC) amb una beca JAE-Predoc i sota la direcció del Professor Miguel A. Miranda i la Dra. Virginie Lhiaubet-Vallat. Durant l'any 2010 va realitzar una estancia predoctoral al Departament de Química i Farmàcia de la Universitat d'Erlangen-Nürnberg (Alemanya) amb el grup del Professor Dirk M. Guldi. El Febrer de 2010 va obtenir el Premi a la millor presentació del Simposi "Medi Ambient i Qualitat de Vida" otorgat per la Societat Catalana de Química en la "VI Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans".

Referències

- 1 Naylor, M. F.; Farmer, K. C. *Arch. Dermatol.* **1997**, 133, 1146.
- 2 Darvay, A.; White, I. R.; Rycroft, R. J. G.; Jones, A. B.; Hawk, J. L. M.; McFadden, J. P. *Br. J. Dermatol.* **2001**, 145, 601.
- 3 Schauder, S.; Ippen, H. *Contact Dermatitis* **1997**, 37, 221.
- 4 Schwack, W.; Rudolph, T. *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, 28, 229.
- 5 Roscher, N. M.; Lindemann, M. K. O.; Bin Kong, S.; Cho, C. G.; Jiang, P. *J. Photochem. Photobiol. A* **1994**, 80, 417.
- 6 Dubois, M.; Gilard, P.; Tiercet, P.; Deffande, A.; Lefebvre, M. A. *J. Chim. Phys.* **1998**, 95, 388.
- 7 Cantrell, A.; McGarvey, D. J. *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, 64, 117.
- 8 Aspée, A.; Aliaga, C.; Scaiano, J. C. *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83, 481.
- 9 Paris, C.; Lhlaubert-Vallet, V.; Jiménez, O. Trullas, C.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2009**, 85, 178.
- 10 Dondi, D.; Albini, A.; Serpone, N. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, 5, 835.
- 11 Yoshioka, M.; Sakuma, Y.; Saito, J. *Org. Chem.* **1999**, 64, 9247.