



**Università degli Studi di Napoli Federico II**

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche  
XX ciclo

**Studi sulla degradazione nell'ambiente di  
xenobiotici (farmaci)  
indotta da fattori abiotici**

Candidato

Dott. Sara Montanaro

Tutore:  
Prof. Maria Rosaria Iesce

Relatore:  
Prof. Livio Paolillo

Coordinatore: Prof. Aldo Vitagliano

Anni Accademici 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007

## INDICE

1. <i>Introduzione</i>	<i>pag. 1</i>
1.2 <i>Il farmaco quale problema ambientale</i>	<i>pag. 8</i>
1.3 <i>Fotochimica: concetti fondamentali in chimica organica</i>	<i>pag. 10</i>
1.4 <i>Reazioni di fotoossigenazione</i>	<i>pag. 15</i>
1.5 <i>Tecniche pulsate (risolte nel tempo)</i>	<i>pag. 19</i>
2. <i>Statine</i>	<i>pag. 22</i>
2.1 <i>Atorvastatina</i>	<i>pag. 25</i>
2.2 <i>Fluvastatina</i>	<i>pag. 44</i>
2.3 <i>Rosuvastatina</i>	<i>pag. 65</i>
2.4 <i>Statine a confronto</i>	<i>pag. 73</i>
3 <i>Amlodipina</i>	<i>pag. 75</i>
4. <i>Tadalafil</i>	<i>pag. 82</i>
5. <i>Conclusioni</i>	<i>pag. 94</i>
6. <i>Parte Sperimentale</i>	<i>pag. 96</i>
7. <i>Bibliografia</i>	<i>pag. 118</i>
8. <i>Abstract</i>	<i>pag. 123</i>
<i>Elenco pubblicazioni</i>	<i>pag. 129</i>



## 1 Introduzione

Da alcuni anni un'attenzione sempre maggiore è dedicata dalla comunità scientifica alla salvaguardia dell'ambiente.

L'inquinamento delle risorse naturali, sebbene abbia rappresentato già in passato un tema centrale sia nel dibattito scientifico che in quello politico-economico, acquista sempre maggiore evidenza al manifestarsi delle gravi conseguenze su flora e fauna nonché sui cambiamenti climatici, giungendo infine a costituire una tematica largamente sentita e di pubblico interesse.

Se guardiamo agli ultimi cinquant'anni e restringiamo il campo di indagine alla classe delle molecole organiche, sostanze di produzione industriale quali pesticidi, diserbanti, e policlorobifenili si collocano ai primi posti per i danni recati all'ambiente e alla salute umana. Pesticidi e analoghi erano originariamente progettati per presentare elevata lipofilità, persistenza e tossicità verso alcuni organismi *target*; queste stesse caratteristiche tuttavia, sebbene in linea teorica rendessero tali sostanze più efficienti, hanno portato ad un consistente impatto ambientale a causa della difficoltà di eliminarli dall'ecosistema e all'inaspettato propagarsi degli effetti tossici a specie *non-target*. Il DDT (1,1,1-tricloro-2,2bis(*p*-clorofenil)etano) è un esempio eclatante di prodotto ad elevata persistenza ambientale.

Tuttora si rileva un consistente utilizzo di pesticidi (stagionalmente per utilizzo agricolo) in quantità dell'ordine di tonnellate solo in Italia, al quale però si affianca una più attenta valutazione dei livelli di tossicità sulla totalità dell'ecosistema e uno studio teso a limitarne la persistenza ambientale.

I PCB (policlorobifenili) trovavano ampio utilizzo in campo industriale come dielettrici e ottimi liquidi di raffreddamento per trasformatori, nell'industria delle plastiche e delle vernici; anch'essi sono caratterizzati da scarsa reattività chimica e alta lipofilità. Il loro utilizzo è stato soggetto a restrizioni gradualmente più severe a partire dal 1971 e infine si è giunti nel 1977 ad interromperne la produzione.

Negli ultimi decenni l'interesse a preservare l'ambiente e il progredire di tecniche analitiche di sempre maggiore sensibilità e accuratezza ha portato alla luce il contributo all'inquinamento, specialmente degli ecosistemi acquatici, da parte di sostanze di uso comune quali cosmetici, sostanze adoperate per la cura della persona e in particolare farmaci (*Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs*).

La presenza di prodotti farmaceutici in acque superficiali e di falda è stata discussa per la prima volta negli anni '80 (Richardson and Bowron, 1985) ed è stata rimarcata nella seconda metà degli anni '90 (Ternes, 1998, Hirsch *et al.*, 1999; Zuccato *et al.*, 2000). Numerosi sono adesso libri e riviste che hanno come oggetto di discussione l'argomento noto come "*Pharmaceuticals in the environment*", alcuni esempi sono: Daughton (2001), Daughton and Jones-Lepp (2001), Heberer (2002), Kümmerer (2001).

L'industria farmaceutica rappresenta una fetta consistente della produzione di prodotti chimici. Il numero di farmaci prodotti via sintesi organica e/o mediante metodologie biotecnologiche è in continua crescita; attualmente i livelli di produzione ammontano a migliaia di tonnellate l'anno, in alcuni casi paragonabili a quelli registrati per fertilizzanti e altri prodotti di uso comune in agricoltura (OECD 2001).

Come nel caso di fertilizzanti, pesticidi e analoghi, le aziende produttrici effettuano la scelta dei principi attivi e progettano le sintesi in modo da ottenere prodotti di potenza, biodisponibilità e persistenza sempre maggiore, proprietà che, benché certamente utili a livello terapeutico, a lungo andare possono portare a serie ripercussioni sia sulla salute umana che sull'ambiente. Accade talvolta che sia accidentalmente che per motivi economici siano messi in commercio farmaci il cui impatto, anche solo strettamente riguardante la salute umana, non sia stato valutato appieno; da qui è facile immaginare che fino ad alcuni anni fa le conseguenze sullo sversamento nelle riserve idriche di molte delle sostanze ad uso umano fosse una preoccupazione del tutto secondaria rispetto ai vantaggi in campo medico quanto in campo economico.

La principale via di immissione nell'ambiente di farmaci per uso umano è l'escrezione dall'organismo; va però presa in considerazione anche la dispersione di medicinali adoperati per uso veterinario che normalmente raggiungono direttamente il terreno sotto forma di concime e possono essere dilavati tramite fenomeni naturali fino a raggiungere acque superficiali o di falda. Altre vie di ingresso ai corpi idrici sono costituiti dallo smaltimento improprio di farmaci o dagli scarichi delle industrie farmaceutiche.

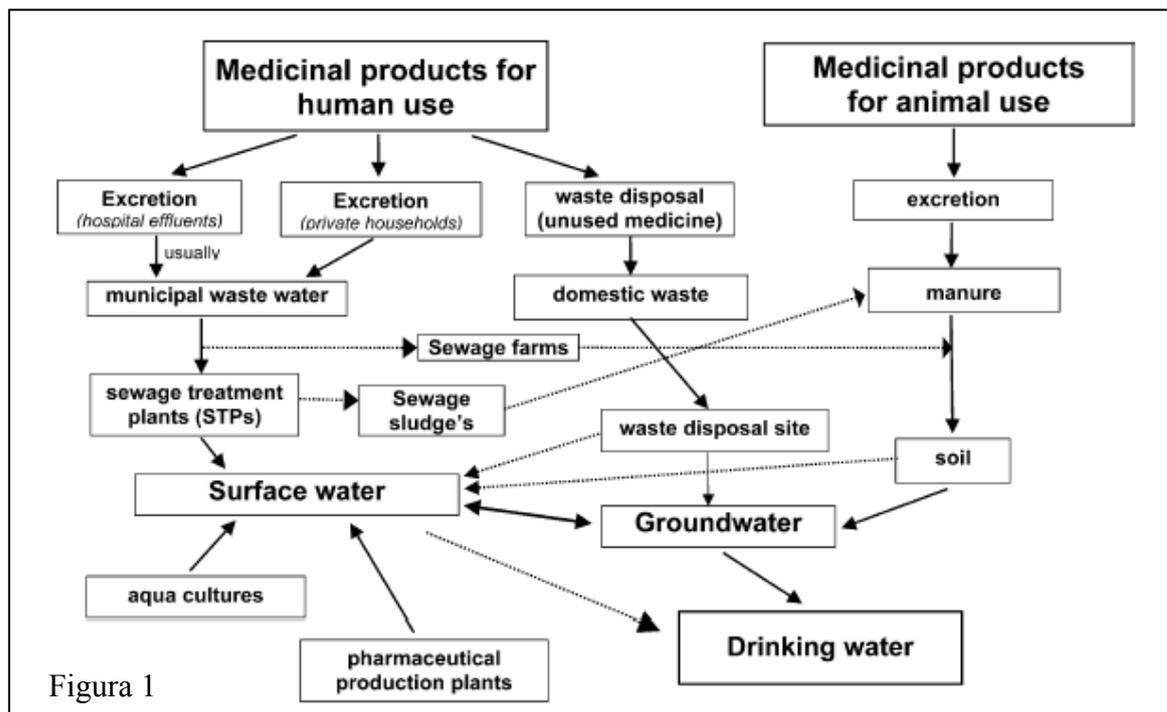


Figura 1

Una volta assunti dall'organismo, normalmente per ingestione, questi composti entrano nei processi metabolici attraverso i quali possono essere eventualmente degradati completamente o subire trasformazioni chimiche che portano alla formazione di metaboliti; in numerosi casi tuttavia una percentuale variabile del composto di partenza viene escreto tal quale e raggiunge gli impianti di depurazione delle acque reflue.

In molti casi gli impianti STP (*Sewage Treatment Plants*), deputati ad accogliere gli scarichi domestici, non sono in grado di eliminare completamente composti di questo tipo permettendone dunque l'ingresso nelle acque superficiali.

I rischi maggiori si rilevano in zone altamente popolate e con risorse idriche quali laghi e fiumi in stretta vicinanza con impianti STP non all'avanguardia laddove la presenza di xenobiotici nelle acque può diventare permanente. La presenza di farmaci rilevata in acqua potabile (Heberer T. *et al.* 1996; Ternes T. A., 2001) è un chiaro segnale di questo fenomeno.

Non è difficile ipotizzare che le conseguenze sull'ambiente, se non tenute sotto controllo, possano giungere con il passare degli anni ad avere ripercussioni sulla salute umana: la disponibilità di acqua priva di contaminanti chimici è una necessità primaria per l'uomo quanto per le altre specie viventi.

I danni dovuti alla presenza anche in basse concentrazioni di queste sostanze nell'ambiente sono in gran parte associati a fenomeni di accumulo locale, bioaccumulo in specie che popolano le acque, eventuale biomagnificazione lungo la catena trofica e intossicazione cronica; tali composti sono infatti progettati appositamente per interferire con sistemi biologici interagendo con recettori e enzimi specifici specialmente a bassi dosaggi.

La classe delle molecole di uso farmaceutico è vastissima, presenta diverse categorie a seconda delle indicazioni terapeutiche e del tipo di trattamento, i principi attivi possono differire sia per struttura chimica che per modalità di azione anche all'interno di una stessa categoria (antibiotici, antidolorifici, antinfiammatori, anticoagulanti, ipocolesterolemizzanti, ormoni...); i test necessari al controllo di un numero così grande di sostanze presenta grosse difficoltà anche solo nello sviluppo di procedure standard adeguate alla rilevazione di questi contaminanti in natura.

Una volta venuta alla luce la questione dell'inquinamento acquatico da parte dei PPCPs, le autorità competenti dei paesi occidentali hanno iniziato a stimare i provvedimenti da prendere per arginare il fenomeno, le direttive tuttavia non sono sempre concordanti e rimane una certa confusione sulle previsioni a lungo termine. Dal 1998 in USA il *Department of Health and Human Services* richiede una valutazione ambientale per i farmaci in fase di commercializzazione nel caso in cui la prevista concentrazione nel punto di immissione (EIC) sia superiore o uguale ad 1 µg/l; d'altra parte una linea guida della *European*

*Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA 2003) pone come limite per la stessa autorizzazione 0.01 µg/l di prevista concentrazione ambientale (PEC).

Lo stesso EPA (*Environmental Protection Agency*) rivolge una notevole considerazione ai progetti che riguardano il ritrovamento, il trasporto e il destino di sostanze farmaceutiche ed altri contaminanti emergenti nelle acque reflue, così come agli studi tossicologici relazionati e ai test sull'efficienza degli impianti STP nell'eliminare questi composti (*Strategic plan, clean and safe water*, EPA 2006-2011).

L'eventualità di compilare un " *environmental risk assessment*", attualmente in fase di svolgimento per sostanze chimiche prodotte, importate o utilizzate in quantità superiori ad una certa soglia secondo la normativa REACH (*Registration, Evaluation, Approval of Chemicals*) per la Comunità Europea, è stata presa in considerazione anche per i farmaci e discussa in diversi articoli fin dall'inizio del decennio in corso (Jørgensen *et al.*, 2000). Tale operazione presenta numerose difficoltà; va considerato in primo luogo l'enorme diversificazione degli agenti farmaceutici utilizzati sia per uso veterinario che per uso umano, le quantità in uso di tali sostanze in base alle dosi e alla durata del trattamento e le differenti modalità di immissione cui segue direttamente il grado di diluizione a sua volta strettamente collegato all'impatto ambientale relazionato. Risulta inoltre di grande importanza valutare la solubilità in acqua e la capacità delle sostanze stesse di aggregarsi a solidi in modo da prevedere in quale settore ambientale sia da ricercarsi un eventuale accumulo. Un'ulteriore difficoltà nasce dalla necessità di ricercare non solo i farmaci tal quali ma anche i possibili derivati generatisi in seguito alle trasformazioni metaboliche che avvengono all'interno dell'organismo.

Per effettuare uno *screening* valido è necessaria un'attenta procedura di campionamento, seguita dall'impiego di tecniche analitiche di grande precisione e accuratezza in grado di rilevare quantità dell'ordine di ng/l dei prodotti farmaceutici e dei loro metaboliti in matrici complesse.

La valutazione del destino ambientale dei prodotti farmaceutici e dei loro effetti su specie *non-target* in realtà è ancora un terreno poco noto, molto dipende dalla loro capacità di essere degradati in natura.

La degradazione avviene in seguito a trasformazioni che sono generalmente distinte in biotiche e abiotiche; la prima classe comprende modificazioni strutturali ad opera del metabolismo di organismi acquatici capaci di utilizzare il farmaco come nutriente, la seconda riguarda processi idrolitici e fotochimici che comunemente avvengono in natura. Il risultato di queste trasformazioni può tanto essere la completa degradazione dello xenobiotico quanto la generazione di specie chimiche differenti dal principio attivo originario, tali metaboliti detti ambientali possono a loro volta comportare le stesse problematiche dei composti di partenza e sono altrettanto importanti nell'ottica della compilazione di un "*environmental risk assessment*".

Reazioni di idrolisi, trasformazioni metaboliche e reazioni di tipo fotochimico possono in alcuni casi portare alla formazione di specie chimiche differenti, con caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche non prevedibili sulla base del farmaco di partenza. L'esistenza di metaboliti ambientali complica in questo senso la rilevazione di contaminanti nelle acque all'ingresso e all'uscita degli impianti STP, così come nelle acque di fiumi e laghi qualora particolarmente persistenti, poiché si amplia lo spettro dei possibili contaminanti da ricercare e valutare.

Gran parte degli studi effettuati sulla trasformazione e sulla biodegradabilità dei farmaci una volta dispersi in ambiente acquatico è stato inizialmente svolto sugli antibiotici, su aspirina, caffeina clorofibrato, naprossene (Richardson e Borow 1985), in seguito su principi attivi quali ibuprofen (Sanyal *et al.*, 1993), carbamazepina, diclofenac, sulfametossolo, acido clofibrato, ofloxacina (Ternes *et al.*, 2002) solo per citare alcuni esempi; tuttavia siamo ancora ben lontani da una valutazione completa.

Anche in campo di tossicità su organismi acquatici i dati disponibili sono ancora insufficienti. Molto è stato fatto anche in questo caso per antibiotici, ibuprofen (Sanyal *et al.*, 1993, Elvers and Wright, 1995), estrogeni (Shore *et al.*,

1992; Shore *et al.*, 1993) e propanololo (Calleja *et al.*, 1993; Lilius *et al.*, 1995). Un caso interessante da prendere come esempio sono gli estrogeni che interagiscono con il sistema endocrino dei pesci anche se presenti solo in tracce (Larsson *et al.*, 1999).

Le linee guida dell'EMEA prescrivono test di tossicità su organismi acquatici quali alghe, invertebrati e pesci per valutare la prevista concentrazione senza effetto (PNEC) applicando opportuni fattori di correzione ai test di tossicità acuta e cronica. Esistono tuttavia opinioni contrastanti riguardo gli studi di tossicità per i metaboliti ambientali, mentre L'EMEA stabilisce test basati su PEC e PNEC per prodotti formati in quantità superiori al 10% rispetto al farmaco parentale. *L'European Scientific Committee of Toxicity, Ecotoxicity and Environment* ritiene inappropriato scegliere i metaboliti da studiare in base alla percentuale di formazione (CSTEE, 2001), ammettendo la possibilità che un composto possa essere significativamente più nocivo di altri seppure intervenga in quantità molto minori. Tale prospettiva poggia le basi su alcuni studi riportati in letteratura, ad esempio una ricerca condotta sulla tossicità di prednisolone, dexametasone e loro prodotti in seguito a degradazione fotochimica ha evidenziato per uno dei fotoderivati una tossicità cronica cento volte superiore a quella del prednisolone stesso (Della Greca *et al.*, 2004).

## 1.2 Il farmaco quale problema ambientale

Il farmaco può subire nell'ambiente trasformazioni abiotiche quali idrolisi, fotolisi. L'idrolisi è uno dei principali processi che possono avvenire in ambiente acquatico, può portare a frammentazione della molecola in porzioni più piccole, addizione di acqua o sostituzione di atomi con gruppi ossidrilici. È importante prendere in considerazione, oltre il pH 7, anche valori estremi di pH (generalmente 4 e 9) talvolta riscontrabili in acque inquinate.

L'altro processo di trasformazione abiotica di primaria importanza è la fotolisi. Nel suolo l'effetto della luce è significativo solo in superficie.

La fotodegradazione di un prodotto organico in acqua può avvenire per interazione diretta tra la luce e le molecole (fotolisi diretta). Questo si verifica quando la molecola possiede una banda o almeno una coda d'assorbimento nella zona d'emissione della radiazione solare al suolo (principalmente UV-A con quantità variabili di UV-B,  $\lambda > 300\text{nm}$ ), quindi se sono presenti gruppi funzionali quali doppi legami o sistemi aromatici o eteroaromatici, nitro gruppi, ecc. L'irradiazione diretta promuove il farmaco nel suo stato eccitato che poi decade secondo una serie di processi di disattivazione fisici e/o chimici.

In condizioni ambientali la fotoreattività di un composto organico dipende da diversi fattori chimico-fisici oltre alla possibilità di assorbire la luce solare: dallo stato fisico (soluzione, solido, sospensione, ecc.), dal pH della soluzione, dalla presenza di ossigeno che può determinare lo spegnimento di stati eccitati o prendere parte al processo di trasformazione come reattivo. L'ossigeno può facilmente intervenire attraverso meccanismi di fotoossigenazione. La molecola eccitata può interagire con ossigeno allo stato fondamentale, o con altre specie dell'ossigeno generate in soluzione a seguito dell'interazione della luce quali anione superossido o ossigeno singoletto; può subire reazioni di *electron-transfer*, di *energy transfer* o di fotoionizzazione. Dei processi fotochimici si parlerà specificamente più avanti (vedi paragrafo 1.3).

La fotodegradazione ambientale può essere anche influenzata dalla presenza di sostanze naturali che possono agire da fotosensibilizzatori in grado di mediare

l'azione della luce o promuovere la formazione di specie reattive (fotolisi indiretta). Tra questi acidi umici e nitrati sono considerati dei fotosensibilizzatori naturali ritrovabili facilmente nelle acque (Zepp, R. G. *et al.*, 1985, 1987).

Alla luce delle tematiche discusse in questa introduzione la presente tesi di dottorato ha come oggetto l'analisi delle trasformazioni abiotiche di alcuni farmaci, in particolare della loro reattività in acqua e della capacità di reagire fotochimicamente producendo specie chimicamente differenti dal farmaco di origine. Il tema centrale è lo studio dei metaboliti ambientali generatisi, l'isolamento degli stessi mediante tecniche cromatografiche e la caratterizzazione spettroscopica allo scopo di fornire informazioni sulla struttura.

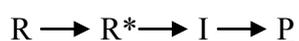
Il comportamento fotochimico in acqua è stato valutato in condizioni mimiche di quelle ambientali su scala di laboratorio, impiegando come fonte luminosa primaria la luce solare o lampade che ne simulino lo spettro. L'analisi è stata condotta a tempi differenti stimando il grado di persistenza ambientale delle sostanze in esame e procedendo all'isolamento e alla caratterizzazione dei fotoprodotti.

Sono state inoltre effettuate analisi di tipo fotochimico/fotofisico, in soluzione acquosa e in solventi organici, avvalendosi di tecniche "*time resolved*" per chiarire quali fossero le specie transienti implicate nella formazione dei fotoprodotti e formulare ipotesi sui meccanismi coinvolti.

### 1.3 Fotochimica: concetti fondamentali in chimica organica

Nel corso di una generica reazione fotochimica un reagente R nello stato fondamentale assorbe un fotone subendo una transizione elettronica che lo porta in uno stato eccitato R\*; una volta raggiunto uno stato energetico superiore R\* può seguire diverse strade dando luogo a specie chimiche intermedie attraverso le quali si giunge alla formazione dei prodotti o ritornare allo stato fondamentale della molecola di partenza mediante processi di dissipazione energetica (Turro, N. J., 1991).

Il generico cammino da reagenti a prodotti in una reazione fotochimica può essere descritto dall'espressione:

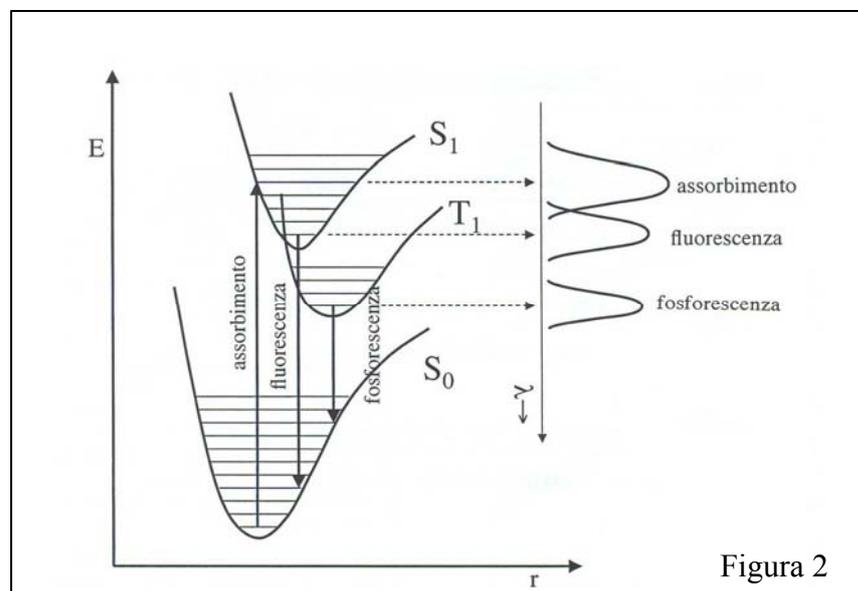


Perché il processo avvenga l'energia della radiazione luminosa a cui è sottoposto il substrato deve essere pari alla differenza di energia esistente tra gli stati elettronici coinvolti nella transizione.

Lo studio delle reazioni fotochimiche in soluzione è essenzialmente basato sul comportamento degli stati eccitati generati in seguito all'irradiazione. A causa dell'eccesso energetico e della nuova disposizione degli elettroni di valenza le molecole eccitate fotochimicamente differiscono marcatamente sia per caratteristiche fisiche che per reattività chimica da quelle nello stato fondamentale (l'alterazione della configurazione elettronica comporta modificazioni nella geometria molecolare, nel momento di dipolo, nelle caratteristiche redox e nelle proprietà acido-base della molecola).

Le transizioni elettroniche seguono regole di selezione di tipo quantomeccanico, attraverso le quali si può con ragionevole approssimazione distinguere tra transizioni permesse e transizioni proibite; in realtà queste regole, più propriamente definiscono in termini di numeri quantici la probabilità con la quale avviene una data transizione da uno stato elettronico ad un altro; non è raro osservare transizioni proibite sebbene di intensità minore rispetto alle transizioni classificate permesse. Si definiscono proibite le transizioni tra stati a

molteplicità di spin differente (legge di conservazione della molteplicità di spin); poiché la maggior parte delle molecole organiche nello stato fondamentale si presenta sottoforma di singoletto  $S_0$  (corrispondente a configurazione elettronica con elettroni appaiati) lo stato eccitato sarà generalmente  $S_1$ : la transizione elettronica è una transizione verticale. Il concetto può essere descritto mediante la rappresentazione delle curve di Morse che esplica la relazione tra i due stati elettronici al momento dell'eccitazione e mostra la dissipazione di energia in eccesso attraverso moti vibrorotazionali fino a raggiungere il minore degli stati vibrazionali dello stato elettronico superiore a partire dal quale hanno luogo quelli che vengono intesi come processi fotochimici/fotofisici. Lo stato eccitato rappresenta una condizione di instabilità dovuto ad eccesso di energia per cui a questo stadio intervengono diversi processi fisici o chimici di disattivazione che riportano le molecole allo stato di equilibrio.



E' uso comune distinguere i processi fisici in radiativi e non; i processi radiativi sono accompagnati da cessione di energia sotto forma di radiazione e comprendono fluorescenza e fosforescenza, tra i processi non radiativi si

annoverano fenomeni di conversione interna, conversione intersistema e quenching.

Il diagramma di Jablonski, dal nome dell'ideatore, è un utile mezzo per visualizzare i cammini fisici che possono seguire alla formazione di una specie eccitata; in primo luogo, sebbene la transizione elettronica possa coinvolgere stati eccitati ad energia superiore al primo ( $S_2$ ,  $S_3...$ ) generalmente tutti i processi di tipo fotochimico/fotofisico si osservano a partire dallo stato eccitato a più bassa energia ( $S_1$ ) (corollario della Regola di Kasha). Le frecce continue rappresentano processi radiativi; le frecce ondulate processi termici.

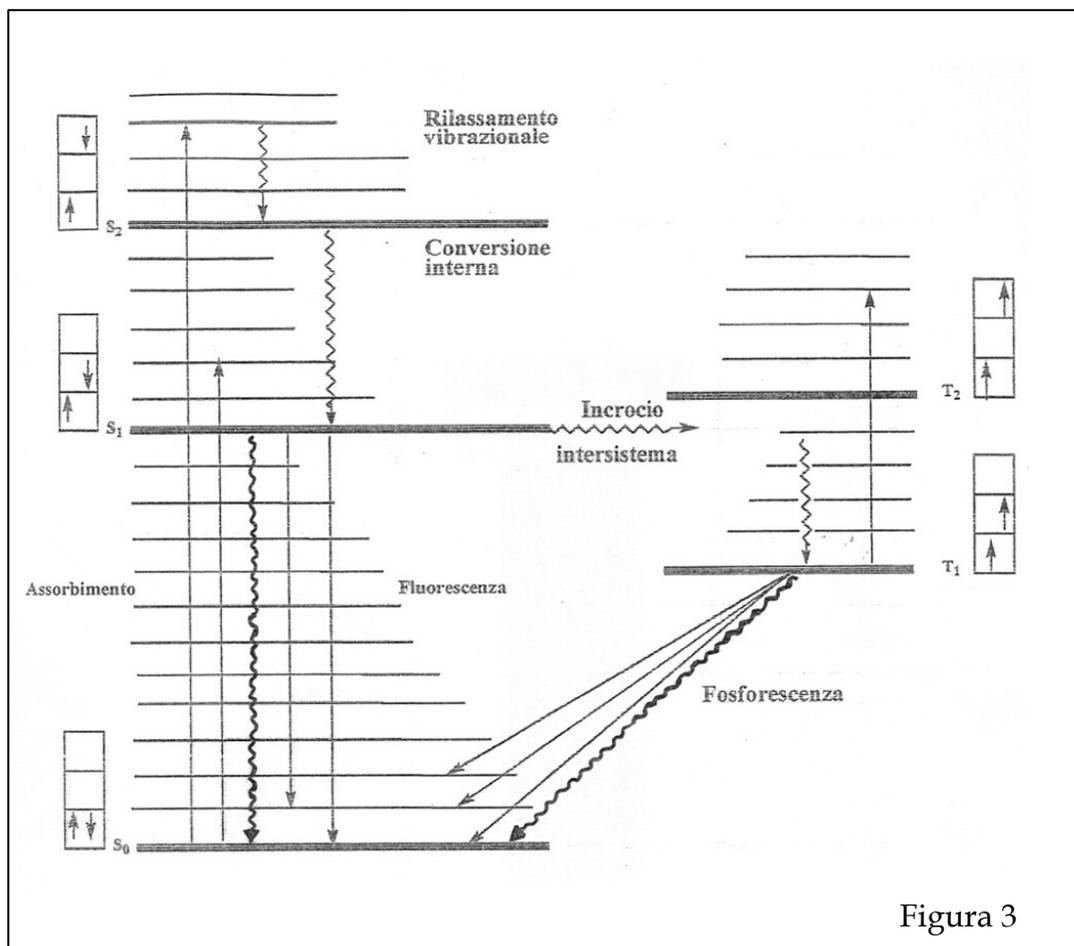
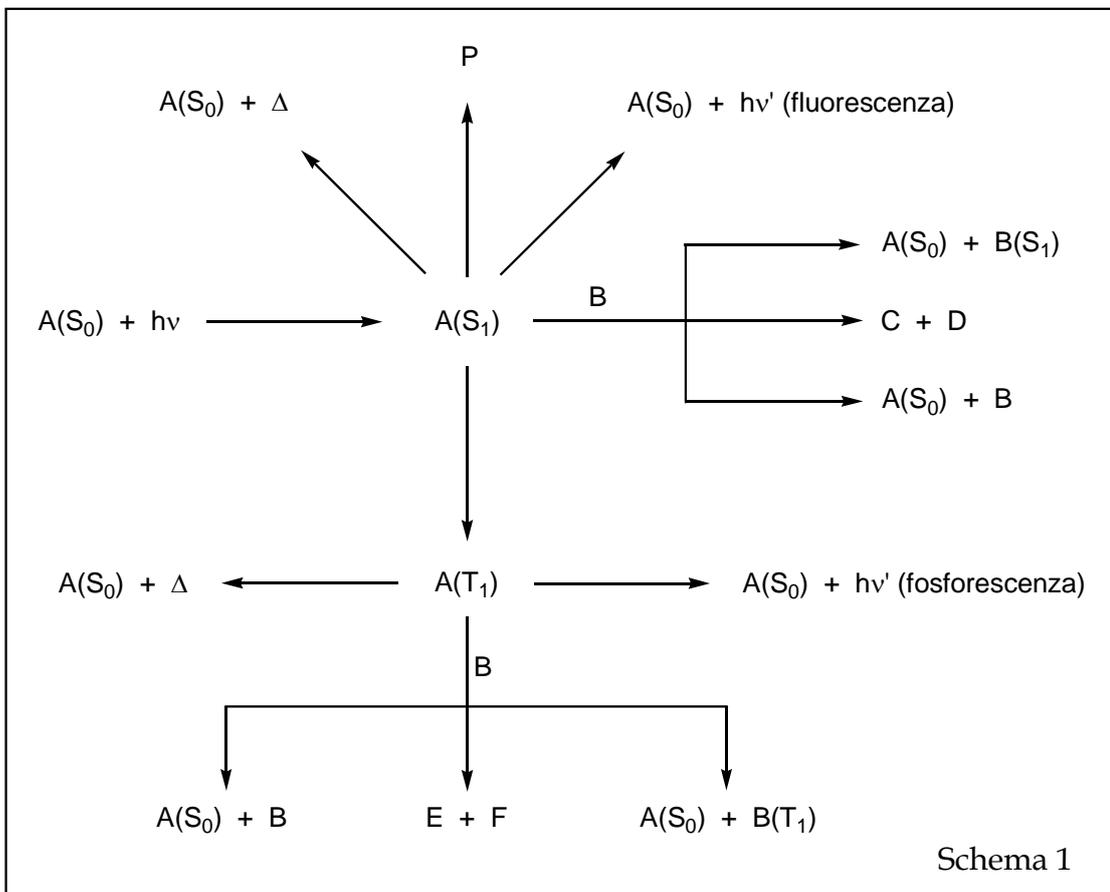


Figura 3

L'emissione di fluorescenza è la perdita di energia sotto forma di radiazione luminosa associata alla transizione  $S_1 \rightarrow S_0$  permessa secondo le regole di molteplicità di spin; in genere questo processo dura dai  $10^{-7}$  ai  $10^{-9}$  s. L'emissione di fosforescenza è invece caratteristica di una transizione proibita

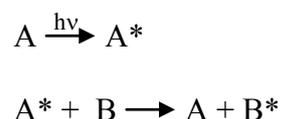
di tipo  $T_1 \rightarrow S_0$ , è un fenomeno che presenta un tempo di vita molto lungo a causa della differente molteplicità di spin degli stati coinvolti e di conseguenza difficilmente registrabile in soluzione a causa della competizione con la disattivazione degli stati di tripletto per collisione, in genere è osservato in matrici rigide a bassa temperatura.

I processi radiativi sono fenomeni misurabili a patto di possedere una strumentazione adatta e forniscono diverse informazioni sulla specie eccitata coinvolta nelle reazioni chimiche che seguono l'eccitazione. Altri cammini fisici sono l'incrocio intersistema, attraverso il quale un elettrone può raggiungere uno stato eccitato a diversa molteplicità attraverso rilassamento vibrorotazionale (stati eccitati energeticamente vicini) e la conversione interna che rappresenta un insieme di moti vibrorotazionali attraverso i quali l'energia in eccesso è dissipata sotto forma di calore per ottenere nuovamente lo stato fondamentale della molecola di partenza.

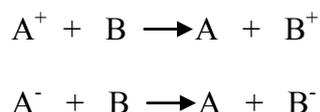


Tra i processi chimici quello di comprensione più immediata è la dissociazione, in cui l'energia assorbita è impiegata per la scissione di un legame (fotolisi) che può portare alla generazione di due molecole neutre, due radicali liberi e in casi meno frequenti alla formazione di due ioni; analogamente all'interno della stessa molecola possono verificarsi fenomeni di isomerizzazione e riarrangiamento.

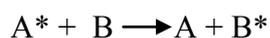
Altri fenomeni chimici che avvengono a carico della specie eccitata sono il trasferimento di energia intramolecolare, intermolecolare e il trasferimento elettronico. Il trasferimento energetico normalmente rappresentato con l'equazione:



è un processo che a livello elettronico può seguire diverse strade, mentre il trasferimento elettronico può essere schematizzato come segue:



Al trasferimento di energia sono associati i concetti di sensibilizzazione e quenching che riguardano essenzialmente lo stesso evento osservato da opposti punti di vista:



In questo caso si può dire sia che A è un sensibilizzatore per B sia che B è un quencher di A. Entrambi i concetti sono molto importanti per lo studio dei meccanismi in fotochimica organica e per la descrizione delle specie eccitate coinvolte.

## 1.4 Reazioni di fotoossigenazione

Le reazioni di fotoossigenazione coinvolgono principalmente l'ossigeno, il substrato e la radiazione luminosa. Questo tipo di processi assume grande rilevanza in campo biologico a causa dell'impatto delle reazioni di ossidazione sugli organismi viventi, quando questi fenomeni interessano i costituenti delle cellule possono portare ad effetti patologici quali mutazioni e carcinogenesi. Gran parte delle reazioni che hanno luogo in natura e che coinvolgono l'ossigeno necessitano di attivazione per via fotochimica.

L'ossigeno è una specie che presenta caratteristiche peculiari: allo stato fondamentale possiede due elettroni a spin paralleli che occupano ciascuno un orbitale degenere  $\pi^*_{2p}$ . La configurazione elettronica con due elettroni spaiati fa in modo che l'ossigeno si presenti come tripletto,  $^3\Sigma_g^-$ , allo stato fondamentale, che la molecola sia paramagnetica e che la chimica dell'ossigeno allo stato fondamentale sia analoga a quella di un diradiale. I due stati eccitati a più bassa energia sono entrambi singoletti, il primo  $^1\Delta_g$ , giace 22 Kcal/mol al di sopra dello stato fondamentale, ha un tempo di vita significativamente più lungo degli altri stati eccitati dell'ossigeno ed è lo stato eccitato che più comunemente partecipa nelle reazioni in soluzione; in genere si usa fare riferimento a questa specie con il nome di ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ) (Rosenthal, 1985).

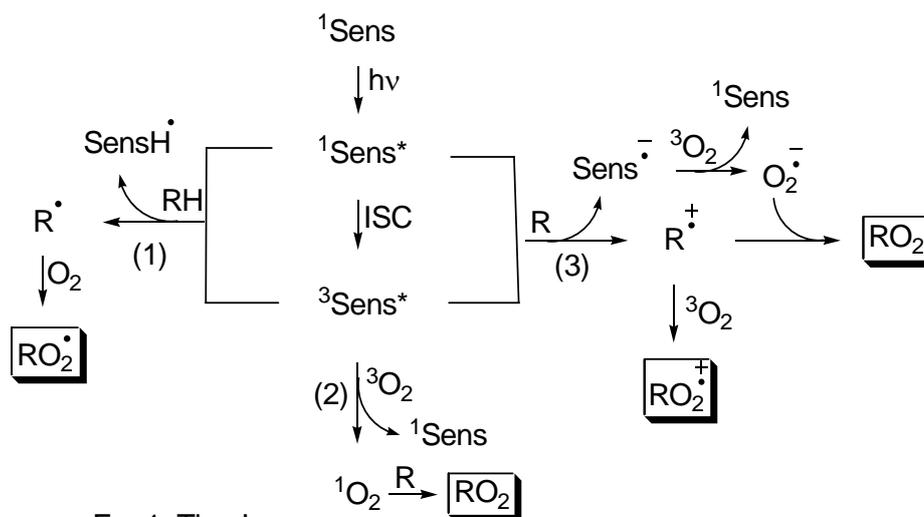
In generale la fotossigenazione può essere descritta come una reazione in cui il substrato R reagisce con l'ossigeno in presenza o in assenza di un sensibilizzatore. Il sensibilizzatore, a seconda del tipo impiegato, può interagire con il substrato o con l'ossigeno mediante trasferimento di energia. In assenza di sensibilizzatore è il substrato stesso ad essere eccitato fotochimicamente e a reagire con l'ossigeno.

Secondo la classificazione di Gollnick (1968) in seguito ampliata da Foote (1991) la fotoossigenazione di tipo I procede con l'eccitazione del substrato ad opera di un sensibilizzatore, nel suo stato di tripletto o di singoletto, ed estrazione di

idrogeno; il radicale prodotto quindi è in grado di reagire con l'ossigeno nello stato fondamentale.

Nella fotoossigenazione di tipo III, si verifica il trasferimento di un elettrone tra il sensibilizzatore eccitato ed il substrato con formazione di un radical catione a sua volta in grado di reagire con l'ossigeno allo stato fondamentale o con l'anione superossido  $O_2^{\cdot-}$ .

La fotossigenazione di tipo II coinvolge un trasferimento di energia dal sensibilizzatore nello stato eccitato di tripletto all'ossigeno nello stato fondamentale generando ossigeno singoletto quale specie reattiva verso il substrato.



Eq. 1; Tipo I  
 Eq. 2; Tipo II  
 Eq. 3; Tipo III

Schema 2

Generalmente con sensibilizzatori ad alta energia che assorbono luce UV predominano reazioni del Tipo I (benzofenone come sensibilizzatore) e reazioni di tipo III (dicianoantracene come sensibilizzatore) mentre quelle del Tipo II

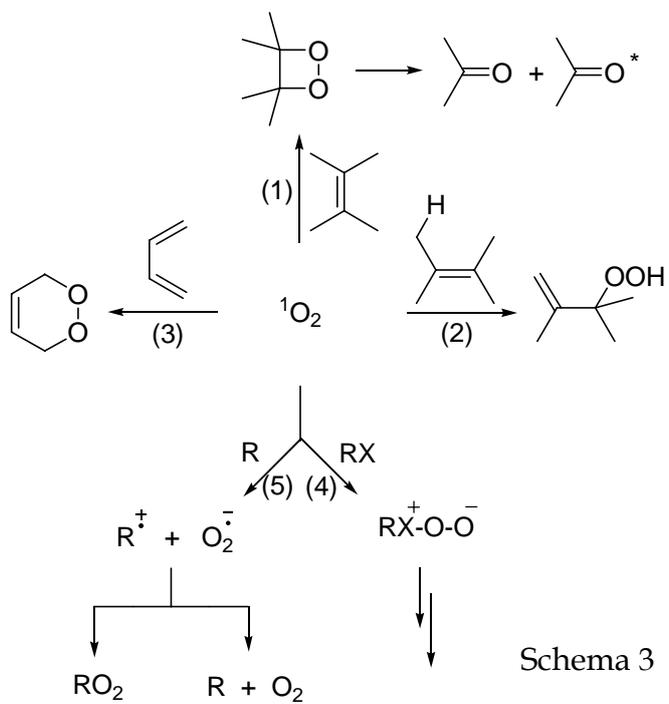
sono promosse da sensibilizzatori che assorbono luce visibile (coloranti quali blu di metilene o rosa bengala le cui energie di tripletto cadono nell'intervallo 30-46 Kcal/mol) (Iesce *et al.*, 2005). In casi particolari è possibile avere produzione di ossigeno singoletto mediante trasferimento di energia dallo stato di singoletto del sensibilizzatore; le molecole in grado di produrre questo tipo di sensibilizzazione sono idrocarburi aromatici policiclici che presentano un gap di energia pari a 94 Kcal/mol tra gli stati eccitati di singoletto e tripletto a più bassa energia (Abdel-Shafi *et al.*, 2001). Le reazioni di Tipo II sono inibite in presenza di diazabicyclo[2.2.2]ottano (DABCO) o, in acqua, di  $\text{NaN}_3$ ; questi composti pertanto sono dei noti *quencher* di ossigeno singoletto e sono utilizzati per evidenziare il coinvolgimento di questa specie in reazioni di fotoossigenazione.

A differenza di quanto accade per il  $^3\text{O}_2$ , che mostra un carattere diradicalico, le reazioni a carico dell'ossigeno singoletto, che ha tutti gli elettroni appaiati, coinvolgono sempre coppie di elettroni. Di conseguenza l'ossigeno singoletto reagisce, in quanto analogo dell'etilene, nei confronti di sistemi insaturi secondo tre modalità note (Iesce *et al.*, 2005). La prima via è la [2+2]cicloaddizione per formare un 1,2-diossetano, il quale spesso si decompone termicamente o fotochimicamente in due frammenti carbonilici, con decomposizione spesso accompagnata da chemiluminescenza (via 1; schema 3). In presenza di idrogeni allilici può dare una reazione Alder "ene" o reazione di Schenck che porta a idroperossidi allilici, in cui il doppio legame è shiftato in una posizione adiacente a quella del doppio legame originario (via 2; schema 3).

Infine la terza è rappresentata da [4+2]cicloaddizione di tipo Diels-Alder con un diene con formazione di un 4,5-diossacicloesene o endoperossido (via 3; schema 3). In questo tipo di reazione il diene può anche far parte di un sistema aromatico come negli antraceni, o di un sistema eteroaromatico come nei furani, pirroli, imidazoli, purine, ossazoli, tiazoli e tiofeni.

In quanto elettrofilo  $^1\text{O}_2$  si addiziona ad eteroatomi dando un iniziale  $\text{RX}^+\text{OO}^-$  come nel caso di solfuri (via 4; schema 3) o con substrati particolarmente ricchi di elettroni può dare una reazione *electron-transfer* (via 5) seguita dalla

formazione del prodotto di ossidazione o da un *back-electron transfer* che riporta al substrato di partenza ed ossigeno tripletto (schema 3).



Schema 3

## 1.5 Tecniche pulsate (risolte nel tempo)

Se riprendiamo l'equazione che rappresenta il cammino generico di una reazione fotochimica



è chiaro che in realtà lo studio del processo comporta l'analisi dei processi che portano dallo stato eccitato  $R^*$  agli intermedi  $I$ . Sperimentalmente al di là dello studio dei prodotti della reazione esistono alcuni mezzi definiti classici che permettono di ottenere informazioni a questo riguardo; questi metodi comportano l'analisi delle cinetiche competitive associate alle specie partecipanti.

In ogni caso i transienti prodotti in seguito a processi fotochimici decadono con cinetiche molto rapide, nel range di micro- o nanosecondi generalmente, che impediscono l'analisi diretta delle specie interessate mediante metodi classici.

Da alcuni anni si è diffuso l'utilizzo di tecniche "time resolved" che hanno cambiato sostanzialmente l'approccio allo studio della fotochimica.

L'impiego di queste tecniche è fondato su metodi di rivelazione estremamente rapidi che permettono di monitorare adeguatamente le specie formatesi in seguito alla fase di eccitazione; come fonti luminose sono ormai esclusivamente impiegate sorgenti laser che uniscono un'elevata intensità del fascio di luce incidente ad un impulso luminoso di brevissima durata (nano o picosecondi a seconda della tecnica impiegata) (Scaiano J. C., 2004 ; Cosa G. *et al.*, 2004).

Le tecniche ad impulsi permettono l'identificazione degli intermedi reattivi che si formano dopo la fase di eccitazione sulla base degli spettri di emissione o assorbimento delle specie transienti e sulla reattività rispetto a differenti quencher.

La *laser flash photolysis*, archetipo delle tecniche *time resolved*, utilizza l'impulso laser ad alta intensità per generare una consistente concentrazione delle specie reattive in soluzione; una volta cessato l'impulso è possibile seguire l'evoluzione del sistema in esame registrando la variazione della concentrazione delle specie in funzione del tempo. Tecniche analoghe sono state

messe a punto anche per fenomeni di emissione, il principio è sostanzialmente lo stesso, la differenza nasce dalla necessità di registrare, post impulso, lo spettro di emissione della sostanza in esame piuttosto che lo spettro di assorbimento.

Senza scendere nello specifico la strumentazione per la *laser flash photolysis* prevede l'impiego di un raggio laser ben collimato, ad alta intensità e con impulso di breve durata, e di un rilevatore UV-vis che sia in grado di monitorare la variazione di assorbanza su scale di tempo dell'ordine dei tempi di decadimento dei transienti in esame.

Lo spettro ottenuto è uno spettro della differenza di assorbimento che risulta dalla differenza tra assorbività molare dello stato stazionario del campione e l'assorbività molare dei transienti prodotti nel range di lunghezza d'onda esaminato.

$$\Delta OD_{t=t} = (\epsilon_t - \epsilon_{gs}) l C_t$$

$$\Delta OD_{t=t} = -\log (I_{t=t}/I_{t=0})$$

Dove  $\epsilon_t$  ed  $\epsilon_{gs}$  sono i coefficienti di estinzione molare del transiente e dello stato stazionario del composto in esame,  $l$  è la lunghezza del cammino ottico e  $C_t$  è la concentrazione del transiente,  $I_{t=t}$  e  $I_{t=0}$  rappresentano l'intensità dell'assorbimento al tempo  $t$  e al tempo 0.

Lo spettro ottenuto è caratteristico della specie presente. Lo studio degli spettri di assorbimento misurati e l'analisi dei tempi di decadimento permette di distinguere la presenza di una o più specie e talvolta ipotizzarne la natura.

La tecnica più utilizzata è la *nanosecond laser flash photolysis* sviluppata alla fine degli anni '60, che permette di osservare l'assorbimento di transienti che si generano dopo un impulso laser che va dai 5 ai 20 ns.

Per confermare la natura di una specie spesso si fa uso di sensibilizzatori e *quencher* che siano in grado di produrre o inibire selettivamente la formazione della specie che si vuole determinare.

L'utilizzo di *quencher* introduce una nuova variabile nella cinetica di reazione: l'osservazione è basata su come cambia la costante di decadimento sperimentalmente misurata per una specie in base alla presenza di un dato *quencher* e alla concentrazione del *quencher* in soluzione. La scelta del *quencher* da utilizzare è ovviamente basata sulla natura della specie sulla cui formazione si desidera agire; i *quencher* più comuni sono donatori di idrogeno, accettori o donatori di elettroni, accettori di energia e trappole per radicali (Cosa G. *et al.*, 2004). Sperimentalmente si osserva la variazione della costante cinetica di decadimento ( $k_{exp}$ ) in presenza del *quencher*; la dipendenza lineare di  $k_{exp}$  con la concentrazione del *quencher* permette di determinare il valore della costante di quenching  $k_q$ .

$$k_{exp} = k_{dec} \quad \text{in assenza di quencher}$$

$$k_{exp} = k_{dec} + k_q[Q] \quad \text{in presenza di quencher}$$

$$I_0/I = 1 + t_0 k_q [Q]$$

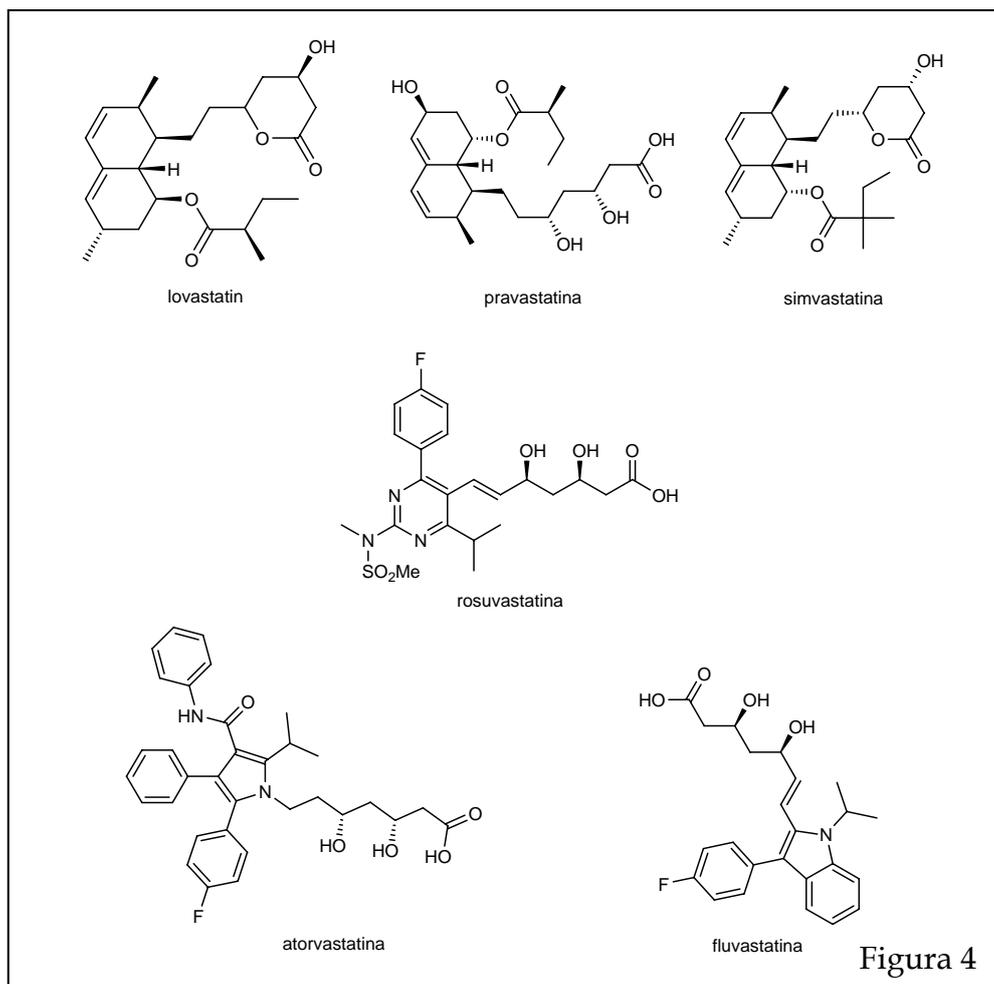
Un altro interessante esempio dell'utilità delle tecniche time resolved riguarda la rilevazione dell'ossigeno singoletto. Questa specie presenta emissione di fosforescenza nell'infrarosso a 1270 nm, negli ultimi anni con il perfezionamento delle tecniche ad impulsi la rilevazione dell'ossigeno singoletto è spesso effettuata con un rivelatore a diodi di germanio particolarmente sensibile che permette di registrare il decadimento alla specifica lunghezza d'onda in seguito all'eccitazione da parte di una sorgente laser di una soluzione contenente un opportuno sensibilizzatore di ossigeno singoletto. (Cosa G. *et al.*, 2004).

## 2. Statine

Le statine sono una categoria di farmaci utilizzati nel trattamento delle dislipidemie (ipercolosterolemie familiari, ipercolesterolemia primaria e dislipidemia mista) al fine di diminuire i livelli di colesterolo nel sangue e prevenire disturbi cardiovascolari.

Le statine agiscono a livello epatico come inibitori competitivi dell'enzima HMG-CoA reduttasi, un enzima che catalizza la conversione di HMG-CoA a mevalonato, intermedio chiave nella sintesi del colesterolo.

In Italia sono commercializzati diversi tipi di statine: lovastatina (Mevacor®), simvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravachol®), fluvastatina (Lescol®), rosuvastatina (Crestor®) e atorvastatina (Lipitor®), le cui strutture sono riportate in figura 4.



La lovastatina è essenzialmente un principio attivo di origine naturale estraibile da un fungo (monacolina K, riso rosso fermentato), mentre pravastatina e simvastatina caratterizzate da un sistema decalinico sono molecole semisintetiche. Atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina sono statine di nuova generazione ossia prodotti interamente di sintesi in cui sono presenti strutture aromatiche.

Lo studio del comportamento fotochimico in acqua su questa classe di farmaci è stato effettuato prevalentemente sulle statine di origine sintetica: atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina, la cui struttura presenta cromofori in grado di assorbire direttamente la luce del sole.

La **rxlist**, un sito che si occupa di tutti gli aspetti dell'uso e della commercializzazione dei farmaci sul territorio USA, riporta il Lipitor, principale prodotto contenente l'atorvastatina, come farmaco più venduto in America nell'anno 2006.

L'atorvastatina viene assorbita per via orale, raggiunge la massima concentrazione nel sangue dopo 1 o 2 ore, presenta un'emivita di circa 14 ore.

Il metabolismo dell'atorvastatina avviene prevalentemente a livello epatico. All'interno dell'organismo, sia nella sua forma acida che nella forma lattonica, subisce trasformazioni metaboliche che portano alla formazione di prodotti *orto*- e *para*-idrossilati e alcuni prodotti di  $\beta$ -eliminazione; i derivati idrossilati mostrano in vitro attività inibitoria pari a quella dell'atorvastatina (Jacobsen W. *et al.*, 2000; Hermann, M., 2005) ; l'escrezione del farmaco dall'organismo ammonta a meno del 5%.

Sebbene la percentuale di composto escreto tal quale sia così bassa il farmaco è stato rinvenuto in acque in ingresso e in uscita dagli impianti STP e in acque superficiali in quantità dell'ordine dei  $\mu\text{g}/\text{l}$  (Metcalf C. *et al.*, 2003).

Alcuni studi condotti sull'atorvastatina riportano un *quantum yield* per fotolisi diretta di  $4,5 \times 10^{-3}$ , e una costante cinetica di  $1,9 \pm 0,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  per la reazione del farmaco con il radicale ossidrilico OH $\cdot$  (Lam M. W. *et al.*, 2005), nello stesso articolo sono riportati alcuni studi svolti su un insieme di farmaci in soluzione.

La fluvastatina, commercializzata come Lescol<sup>®</sup>, come gli altri due inibitori di HMG-CoA reduttasi di cui è stato studiato il comportamento fotochimico in soluzione acquosa, è metabolizzata prevalentemente nel fegato; dopo somministrazione orale l'assorbimento è di circa il 98% e l'emivita del farmaco nell'organismo è stata stimata dell'ordine di 2-3-ore. La fluvastatina subisce trasformazioni a livello epatico che portano a tre principali metaboliti: 5-idrossi, 6-idrossi e N-deisopropil fluvastatina.

Il prodotto commerciale contenente rosuvastatina come principio attivo è il Crestor<sup>®</sup>, il 90% dell'attività inibitoria nell'organismo è dovuta alla molecola tal quale; a livello epatico il farmaco viene metabolizzato in percentuale del 10%, il principale metabolita è N-desmetil rosuvastatina che presenta minore attività inibitoria per la sintesi del colesterolo in confronto al farmaco. La rosuvastatina presenta un'emivita approssimativamente di 19 ore nell'organismo.

Il Crestor si trova al ventisettesimo posto nella **rxlist**.

Entrambi i farmaci Lescol<sup>®</sup> e Crestor<sup>®</sup> sono disponibili in commercio da pochi anni e ancora poco è noto sugli effetti a lungo termine sull'uomo, mancano del tutto dati di letteratura sul destino ambientale di questi farmaci o sul ritrovamento degli stessi nell'ambiente.

## 2.1 Atorvastatina

L'atorvastatina (**1**) è una molecola costituita da un nucleo pirrolico pentasostituito, dei cinque sostituenti due sono anelli aromatici direttamente legati all'eterociclo (figura 5). L'atorvastatina assorbe principalmente nel range UVB con una coda nell'UVA. Il farmaco **1** è molto poco solubile in soluzione acquosa e solubile in solventi polari come metanolo.

Esperimenti preliminari hanno mostrato che il farmaco rimane stabile in acqua al buio. Le dispersioni di atorvastatina (40 mg in 500 ml) sono state preparate in H<sub>2</sub>O Milli Q e a pH 4, 7 e 9 e

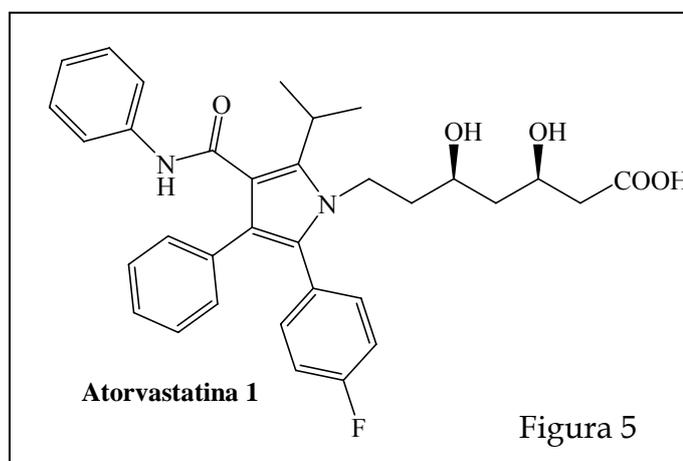
analizzate dopo un massimo di trenta giorni su TLC e per <sup>1</sup>H NMR.

Per valutare il comportamento fotochimico del farmaco **1** sono stati condotti diversi esperimenti variando i tempi di irradiazione dei campioni.

In primo luogo una soluzione di atorvastatina (10 μM) è stata esposta direttamente alla luce del sole. L'analisi <sup>1</sup>H NMR dopo 10 giorni della soluzione ha mostrato che il farmaco reagisce producendo una miscela complessa di fotoprodotto pur essendo il composto di partenza ancora presente nel mezzo di reazione.

Ulteriori esperimenti di irradiazione sono stati condotti su scala preparativa in modo da ottenere per ogni fotoprodotto quantità tali da permettere un'analisi spettroscopica.

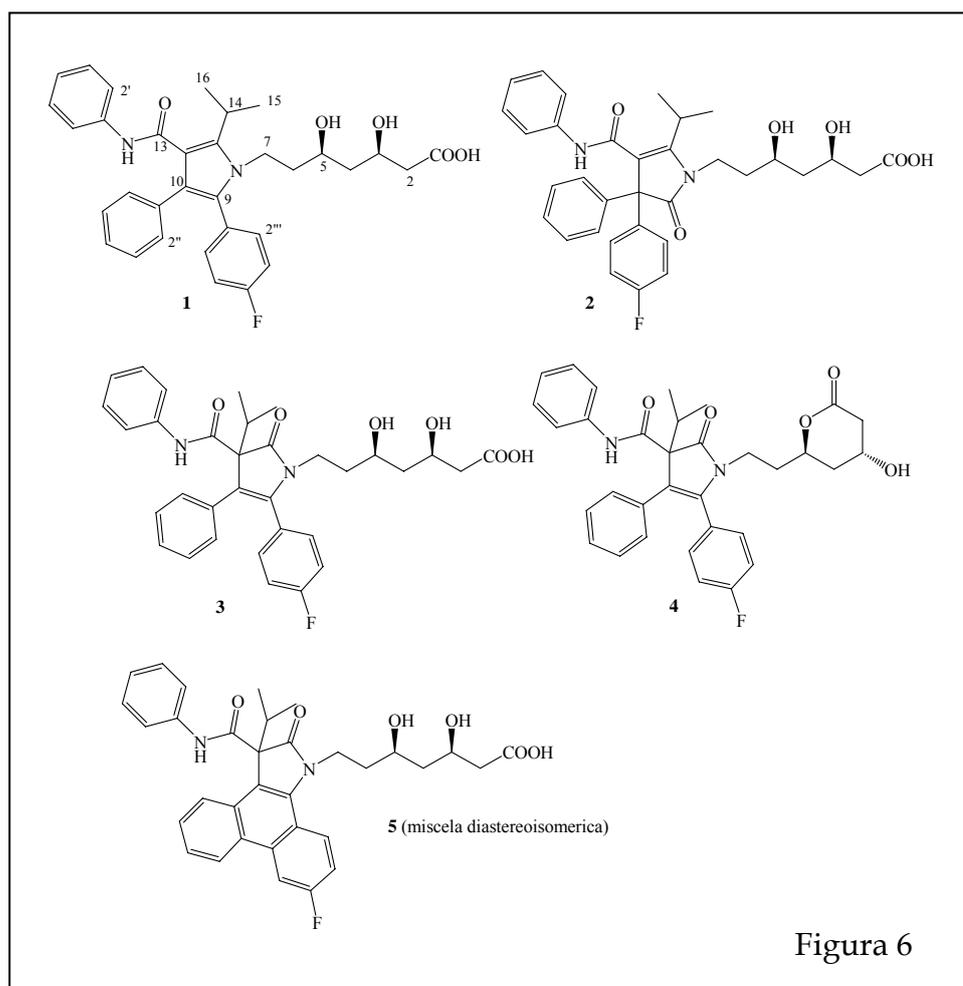
Una dispersione del farmaco (80 mg/l) è stata irradiata al simulatore solare fino a 14 giorni, controlli a tempi minori sono stati effettuati su RP-TLC per valutare il grado di trasformazione del composto.



L'analisi spettroscopica ( $^1\text{H}$  NMR) ha rivelato che dopo 14 giorni di irradiazione al simulatore solare il farmaco risulta totalmente trasformato; confronti effettuati in base all'analisi TLC e NMR confermano che si ottiene la stessa miscela di fotoprodotti ottenuta in seguito all'esposizione alla luce solare.

I principali fotoprodotti sono stati separati mediante tecniche cromatografiche impiegando diverse fasi mobili e stazionarie. A causa della polarità molto simile riscontrata nei differenti derivati è stato necessario l'impiego di tecniche cromatografiche combinate per conseguire l'isolamento dei fotoprodotti puri (cromatografia su colonna, TLC, HPLC).

Dalla miscela ottenuta irradiando la dispersione per 14 giorni al simulatore solare sono stati i fotoprodotti **2-5** in figura 6.



Nello specifico l'analisi NMR delle frazioni contenenti il prodotto **5** ha rivelato la presenza di coppie di segnali molto simili e quindi attribuibili ad una miscela di due diastereoisomeri. Per effettuare la separazione dei due componenti è stato necessario ricorrere a metilazione della miscela con  $\text{CH}_2\text{N}_2$  e a separazione mediante HPLC a fase inversa: i due prodotti puri sono stati caratterizzati sotto forma di esteri metilici **5a-bis** e **5b-bis**.

### 2.1.1 Caratterizzazione dei fotoprodotti.

Le strutture dei fotoprodotti isolati sono state ipotizzate impiegando diverse tecniche NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) ed esperimenti di spettrometria di massa (MALDI-MS ed ESI-MS).

Il composto **2** mostra un picco a  $m/z$  575  $[\text{M}+\text{H}]^+$  nello spettro MALDI-MS suggerendo la formula molecolare  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{FN}_2\text{O}_6$ . Nello spettro UV si rileva una banda a 203 nm. Nello spettro NMR protonico sono visibili 14 protoni aromatici nella zona 7.00-7.40 ppm, tre metini a  $\delta$  4.17, 3.76 e 3.27, otto protoni metilenici a  $\delta$  3.76, 2.40, 1.85 e 1.66, e due metili a  $\delta$  1.45 nella zona alifatica.

Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR sono presenti ventisei carboni, di cui, in base all'esperimento DEPT, due metilici, quattro metilenici e undici metinici.

Lo studio degli spettri  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR di **2**, i dati ottenibili in base agli esperimenti DEPT e HSQC e il confronto con i dati spettrali dell'atorvastatina **1** indicano la presenza delle seguenti funzioni: tre gruppi carbonilici, un carbonio quaternario ibridato  $\text{sp}^3$  (C-10), tre metini alifatici (C-3, C-5 e C-14), di cui i

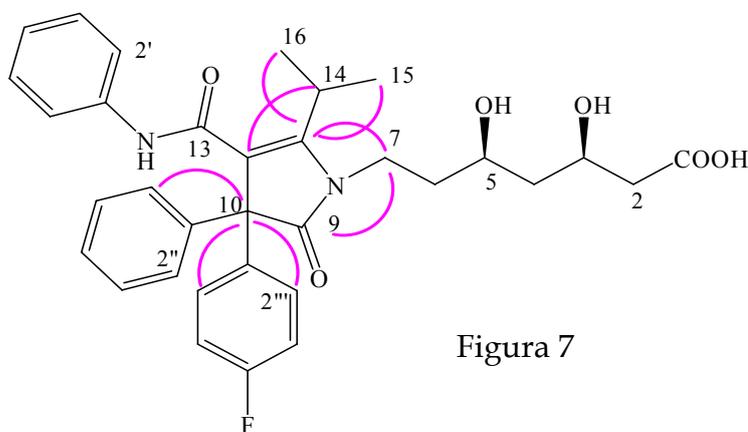


Figura 7

**2**

primi due legati ad un ossigeno, quattro carboni metilenici (C-2, C-4, C-6, e C-7), due metili (C-15 e C-16), due carboni quaternari ibridati  $\text{sp}^2$  (C-11 e C-12), due anelli aromatici monosostituiti (C-1' - C-6', C-1'' - C-6''),

e un anello aromatico disostituito (C-1''' - C-6''').

La connessione esistente tra i gruppi funzionali è stata determinata dalle correlazioni <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY e HMBC (figura 10).

Le correlazioni long-range dei protoni H-7 a δ 3.76 con il carbonio carbonilico (δ 181.4) e il C-12 (δ 153.4), del protone H-14 a δ 3.27 con il C-11 (δ 119.3) e il carbonio quaternario C-12, esso stesso correlato anche con i protoni metilici H-14/H-15 nello spettro HMBC, indicano la presenza di una struttura del tipo 1-*H*-pirrol-2(3*H*)-one. Le correlazioni dei protoni H-2''/H-6'' e H-2'''/H-6''' (δ 7.30 and 7.34) con il C-10 (δ 66.6) evidenziano il legame dei due gruppi fenilici con il carbonio quaternario ibridato sp<sup>3</sup>. In base alle correlazioni descritte l'analisi NMR appare in perfetto accordo con la struttura **2** (figura 7).

Il composto **3** presenta un picco molecolare *m/z* 575 [M+H]<sup>+</sup> nello spettro ESI-MS suggerendo la formula molecolare C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>. Nello spettro UV è presente una banda a 204 nm. Lo spettro <sup>13</sup>C NMR mostra la presenza di ventisette segnali attribuibili al carbonio di cui, sulla base dei dati ricavati dall'esperienza DEPT, due metilici, quattro metilenici, e undici metinici.

Analizzando i segnali degli spettri NMR protonici e al carbonio, sulla base delle

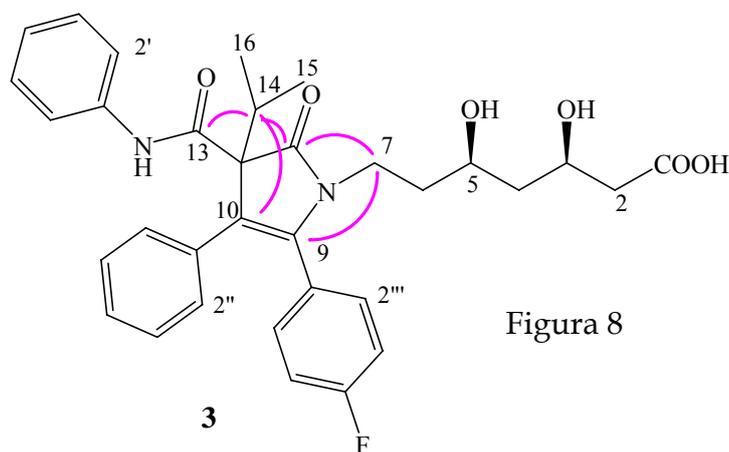


Figura 8

informazioni ottenute dagli esperimenti DEPT e HSQC e dal confronto con la descrizione spettrale dell'atorvastatina **1** è stata determinata la presenza delle seguenti funzionalità: tre gruppi carbonilici, un carbonio quaternario ibridato

sp<sup>3</sup> (C-11), tre metini alifatici (C-3, C-5 e C-14), due dei quali direttamente legati ad ossigeno, quattro metileni alifatici (C-2, C-4, C-6, e C-7), due metili (C-15 e C-16), due carboni quaternari ibridati sp<sup>2</sup> (C-9 and C-10), due anelli aromatici monosostituiti (C-1' - C-6', C-1'' - C-6''), e un anello aromatico monosostituito (C-1''' - C-6'''). La connessione tra i gruppi funzionali è stata determinata sulla

base delle correlazioni evidenziate negli esperimenti  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC (figura 8). Le correlazioni long-range dei protoni H-7 a  $\delta$  3.79 e 3.56 con il carbonio carbonilico ( $\delta$  178.2) e C-9 ( $\delta$  140.4), del protone H-14 a  $\delta$  2.67 con il C-10 ( $\delta$  120.0), C-11 ( $\delta$  69.9), C-12 and C-13, C-11 essi stessi correlati con i metili H-14/H-15 nello spettro HMBC indicano la presenza di una struttura di tipo 1-*H*-pirrol-2(3*H*)-one. In base alle correlazioni descritte l'analisi NMR appare consistente con la struttura **3**.

In accordo con la struttura lattonica ipotizzata il composto **4** ha mostrato un

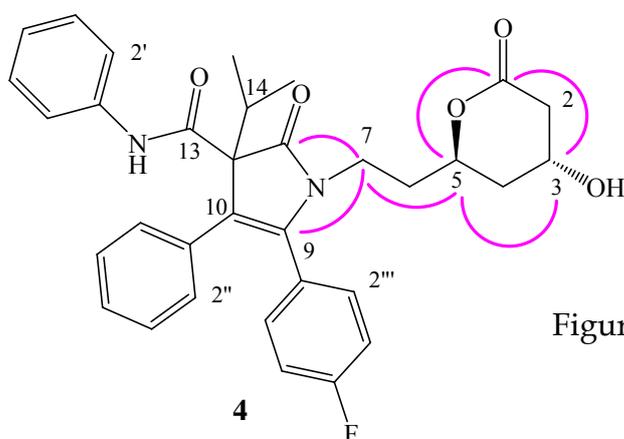


Figura 9

picco molecolare a  $m/z$  579  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  nello spettro ESI-MS. L'esperimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY evidenzia le correlazioni del segnale del metilene a  $\delta$  3.79 e 3.56 assegnato ad H-7 con il metilene a  $\delta$  1.85, il quale

risulta a sua volta accoppiato con il protone metinico a  $\delta$  4.52. Quest'ultimo ha mostrato correlazione con il metilene a  $\delta$  1.77, esso stesso accoppiato con il metino a  $\delta$  4.16, e correlato con i protoni metilenici a  $\delta$  2.59 and 2.42. I due doppietti a  $\delta$  1.16 e 0.95, attribuiti a due protoni metilici, correlano con il metino a  $\delta$  2.78. Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR di **4** sono presenti i segnali di ventisette carboni di cui due metili, quattro metileni, undici metini e dieci carboni quaternari. Lo studio dello spettro HSQC ha permesso di assegnare i protoni ai corrispondenti carboni. Nello spettro HMBC il protone H-7 correla con C-5, C-9, e C-12, mentre il protone H-14 con i carboni C-10, C-11, C-12, C-13, C-15, and C-16. Le correlazioni del multipetto a  $\delta$  4.52 (H-5) con C-1 e C-3, e di H-3 con C-1, C-2 e C-5, confermano la struttura del composto **4** (figura 9).

Il composto **5** si presentava inizialmente come una miscela ca. 1 : 1 di due diastereoisomeri poi separati e caratterizzati sotto forma di esteri metilici. Il primo dei due isomeri di **5** come estere metilico, **5a-bis** mostra un picco molecolare a  $m/z$  587  $[\text{M}+\text{H}]^+$  nello spettro ESI-MS suggerendo la formula

molecolare  $C_{34}H_{35}FN_2O_6$ . Lo spettro  $^1H$  NMR mostra la presenza di un anello aromatico a cui sono legati tre protoni accoppiati tra di loro e accoppiati

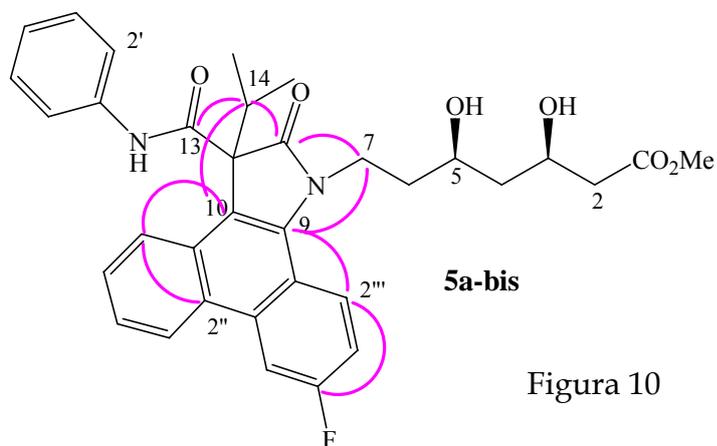


Figura 10

contemporaneamente ad un atomo di fluoro, che compaiono come due doppi doppietti  $\delta$  8.51 (H-6''), 8.45 (H-3'') e un doppio doppio doppietto a  $\delta$  7.45. Sempre nella zona aromatica sono presenti quattro protoni

appartenenti ad un anello aromatico 1,2 disostituito, come doppietti a  $\delta$  8.76 (H-6''), 8.60 (H-3''), e come tripletti a  $\delta$  7.69 (H-5'') e 7.60 (H-4'') e un gruppo fenilico (H-2'-H-6'). La regione alifatica dello spettro  $^1H$  NMR mostra la presenza della tipica catena a sette atomi di carboni, e dei gruppi isopropilico e metilico. Nello spettro  $^{13}C$  NMR si rilevano trenta segnali, distinti in base all'esperienza DEPT in tre metili, quattro metileni, e tredici metini. La combinazione dei dati ottenuti dagli esperimenti COSY, DEPT, HSQC e HMBC ha permesso di chiarire la struttura. In particolare, lo spettro HMBC ha mostrato la correlazione dei protoni H-7 e H-14 con il carbonio carbonilico (C-12), per il protone H-7 si osserva correlazione con C-5 and C-9, il protone H-14 dà correlazione con C-10, C13 e C-11 il quale a sua volta correla con i protoni metilici (H-15 e H-16). Anche in questo caso l'insieme dei dati conferma l'ipotesi di una struttura di tipo 1-*H*-pirrol-2(3*H*)-one. Nello spettro HMBC le correlazioni spettrali di H-2''' con i carboni C-9, C-4''', C-3''', di H-6'' con i carboni C-10, C-2'' e C-4'' e H-3'' con C-2'' e C-5'' indicano la presenza di un nucleo fenantrenico (Figura 10).

L'altro isomero di **5**, sotto forma di estere metilico **5b-bis** di formula molecolare  $C_{34}H_{35}FN_2O_6$  come dedotto dal picco molecolare  $m/z$  587  $[M+H]^+$  nello spettro ESI-MS ha mostrato dati NMR molto simili a quelli ottenuti per il primo diastereoisomero analizzato, le differenze più significative si ritrovano nello *shift* dei segnali dei metili e del metino 6''.

Dalla figura 6 appare evidente che le strutture di tutti i prodotti caratterizzati differiscono dalla molecola di partenza per l'ingresso di un ossigeno a livello dell'anello pirrolico e *shift* di un sostituente alchile/arile a formare la struttura lattamica descritta per i fotoprodotti.

In aggiunta all'ossidazione del pirrolo i composti **4** e **5** subiscono rispettivamente processi di lattonizzazione e ciclizzazione.

### 2.1.2 Prove meccanicistiche

Al fine di ottenere maggiori informazioni riguardo ai possibili meccanismi di reazione che intervengono per via fotochimica sono stati condotti alcuni esperimenti variando le condizioni di irradiazione. Si è preferito utilizzare una lampada UV (filtro pyrex) come sorgente luminosa per accorciare i tempi di reazione.

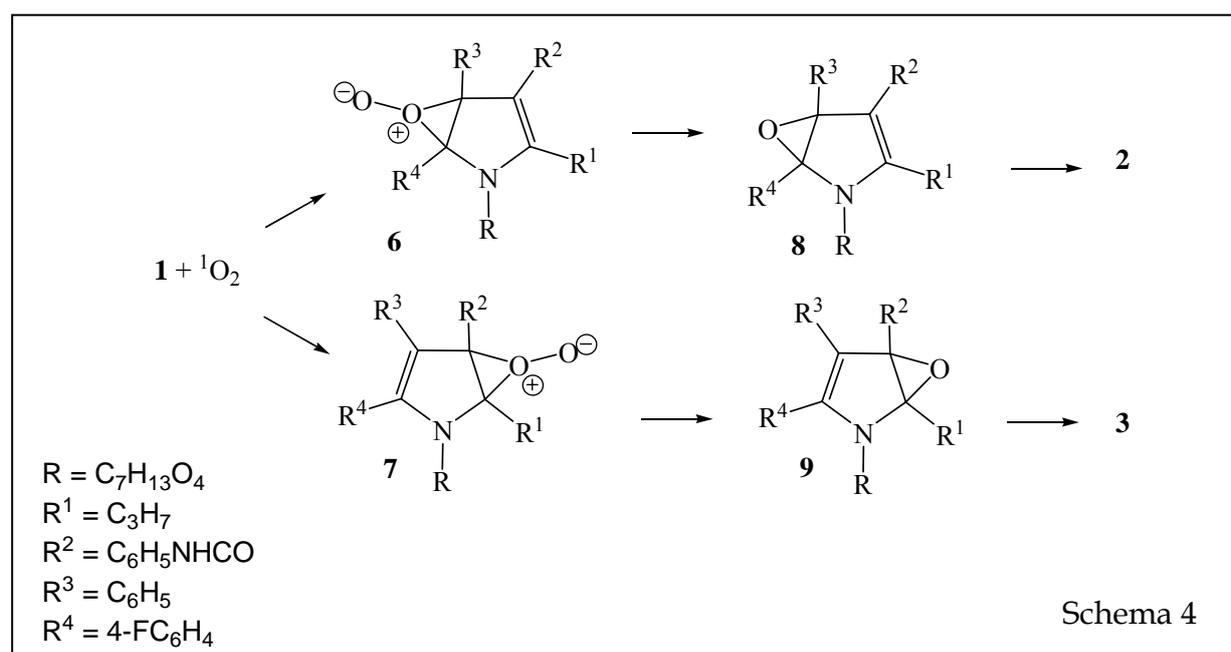
Un primo esperimento è stato condotto alla lampada UV per 8 ore saturando la soluzione con argon, in questo caso la reazione non procede e una volta allontanato il solvente dal mezzo è stato possibile recuperare l'atorvastatina tal quale, ciò conferma un diretto coinvolgimento dell'ossigeno nella reazione. Altro dato interessante in questo senso è l'inibizione rilevata con sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ), noto *quencher* di ossigeno singoletto. D'altra parte se la fotossigenazione viene condotta in presenza di rosa bengala, un potente sensibilizzatore di ossigeno singoletto in solventi polari, la reazione appare completa già dopo 8 ore di irradiazione (diversamente dal controllo che mostra una trasformazione pari al 50%), analisi NMR effettuate sulla miscela ottenuta irradiando in presenza di blu di metilene hanno mostrato come principali prodotti i composti **2-5** descritti precedentemente.

### 2.1.3 Ipotesi meccanicistica

I dati raccolti puntano al coinvolgimento di ossigeno singoletto nella fotodegradazione del farmaco e suggeriscono una fotossigenazione di tipo II (mediata dall'ossigeno singoletto). Alcune esperimenti sono stati effettuati irradiando alla lampada UV in presenza di inibitori di radicali quali 3-*t*-butil-4-

anisolo (BHA); in questo caso non è stato osservato un netto cambiamento della cinetica ma è comunque possibile apprezzare un lieve rallentamento nella formazione dei prodotti. Sebbene non si possa escludere il coinvolgimento di specie radicaliche nel meccanismo di reazione, il contributo principale alla trasformazione è fornito dall'ossigeno singoletto, che una prima ipotesi suggerisce possa essere prodotto attraverso un meccanismo self-sensitizing talvolta verificato in molecole contenenti sistemi pirrolici (Lin et al., 1997). D'altra parte in letteratura è riportato che il sistema pirrolico è particolarmente reattivo nei confronti dell'ossigeno singoletto. La reazione è alquanto complessa in quanto si ottengono miscele di prodotti derivanti dall'addizione dell'ossigeno in posizione 2,5 e/o 2,3, o da specie reattive quali idroperossidi o intermedi zwitterionici in dipendenza delle condizioni di reazione e dei sostituenti sull'anello pirrolico. Rimane ancora incerto quale sia l'addotto primario in questo tipo di fotossigenazioni. In letteratura è riportato che idrossilattami sono stati ritrovati nella fotossigenazione di  $\alpha$ - o  $\alpha,\alpha'$ pirroli non sostituiti (Iesce M. R. et al., 2005)

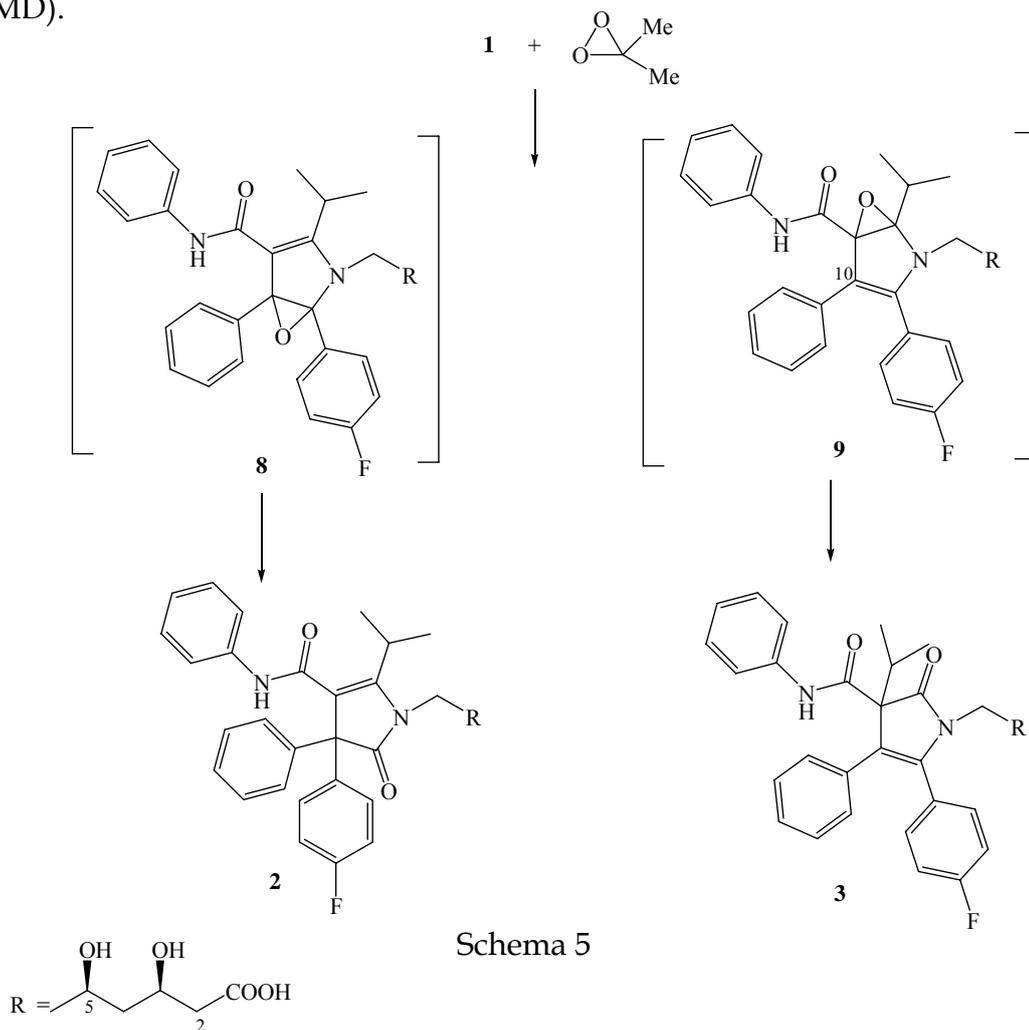
Dunque sulla base delle evidenze sperimentali e dei dati di letteratura è stata proposta l'interpretazione meccanicistica riportata nello schema 4.



Una volta prodotto ossigeno singoletto in soluzione avviene addizione 2,3 di ossigeno alla funzione pirrolica per formare il perepossido **6** o **7**, che successivamente evolve ad epossido **8** o **9**. La migrazione della funzione alchilica o arilica produce i pirroloni **2** o **3** rispettivamente (Wasserman, H. H. *et al.*,1991).

Le specie epossidiche **8** e **9** non sono state osservate sperimentalmente, è probabile che esse siano estremamente instabili in soluzione e riarrangino rapidamente per fornire i corrispondenti composti carbonilici, in accordo con quanto riportato in letteratura sulla instabilità di analoghe strutture epossidiche (Adam, W.; *et al.*, **1991**; Baylon, C. *et al.* 1995; Katritzky, A., R. *et al.* 1996; Cermola, F. *et al* 2002).

Per avallare l'ipotesi del coinvolgimento di questi intermedi è stata condotta una reazione di ossidazione dell'atorvastatina utilizzando dimetildiossirano (DMD).

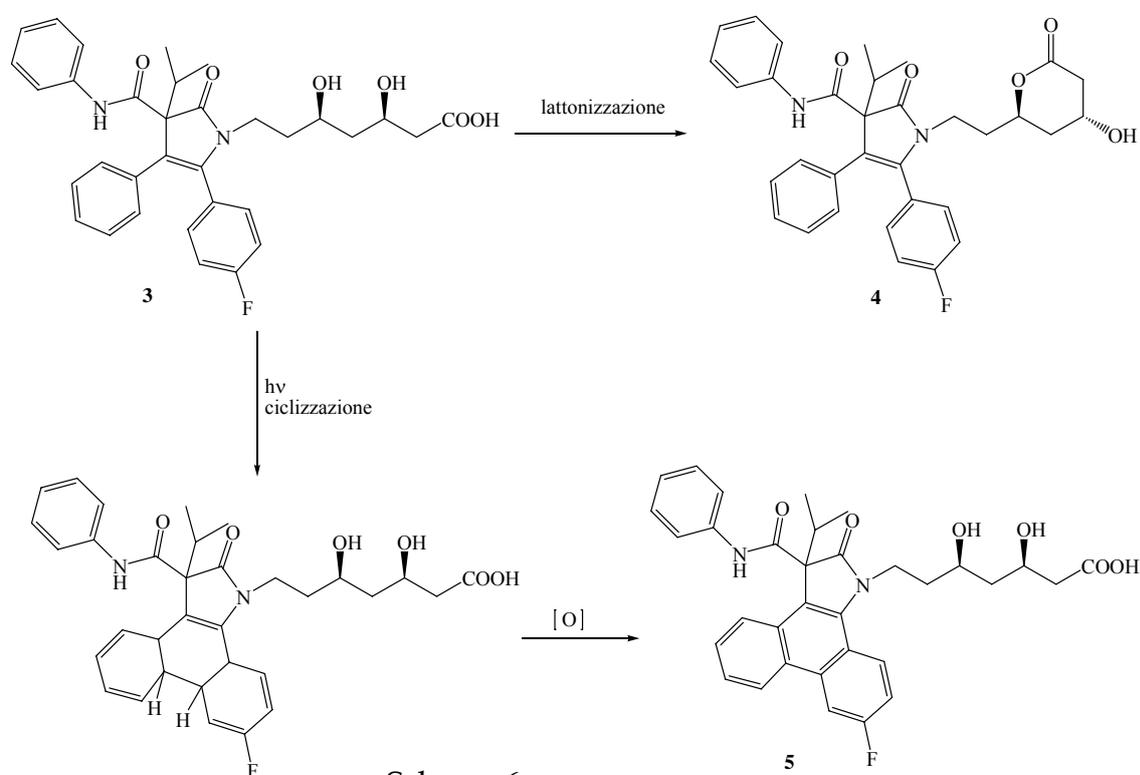


Schema 5

Questo composto è un potente agente epossidante in grado di reagire con substrati olefinici e aromatici, in particolare reagisce con *N*-acilindoli per formare i corrispondenti epossidi che poi riarrangiano fornendo 2-indolinoni come prodotti finali. (Adam, W. *et al.* 1994;; Xiaojun, Z. *et al.* 1993)

L'atorvastatina sciolta in acetone è stata tenuta a reagire con dimetildiossirano (DMD) per 4 ore sotto agitazione; nello spettro  $^1\text{H}$  NMR della miscela di reazione sono stati rilevati i prodotti **2** e **3**, che confermano la capacità di specie epossidiche analoghe a quelle ipotizzate nel meccanismo di fotodegradazione di riarrangiare nei composti carbonilici isolati in acqua (schema 5).

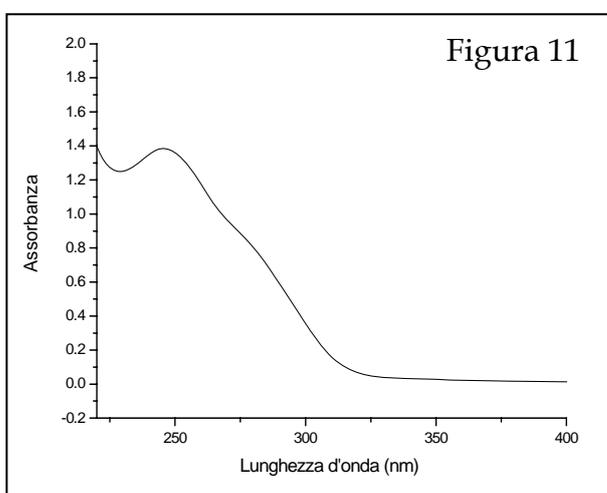
I fotoprodotto **4** e **5** sembrano in prima approssimazione provenire da ulteriori modificazioni a carico del composto **3**. La lattonizzazione della catena laterale diidrossieptanoica fornisce il composto **4**, mentre il fenantrene **5** è formato in seguito a un processo di ciclizzazione a carico della struttura di tipo stilbenico (Gilbert, A. 2004) che procede fotochimicamente per via elettrociclica con ossidazione in condizioni aerobiche dell'intermedio non coniugato (schema 6).



#### 2.1.4 Studi fotofisici

Gli studi fotofisici riportati per l'atorvastatina sono stati condotti presso i laboratori de "Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC; Universidad Politécnica de Valencia" sotto la guida del Prof. Miguel Angel Miranda e della Dott. Virginie Lhiaubet-Vallet durante un periodo di sei mesi (giugno-dicembre) del 2006.

A questo stadio non era chiaro quale fosse la specie in grado di sensibilizzare la produzione di ossigeno singoletto in soluzione. La prima ipotesi formulata prevedeva la formazione di ossigeno singoletto a partire dallo stato di tripletto dell'atorvastatina secondo un meccanismo di *self-sensitizing*.



La polarità tanto simile dei prodotti ossidati dell'atorvastatina ha reso difficile condurre uno studio cinetico di degradazione, l'analisi spettroscopica delle miscele effettuata a tempi differenti ha sempre mostrato la presenza di tutti i fotoprodotto isolati, e poichè tutti i fotoprodotto osservati sono

interessati dall'ingresso di ossigeno questo ci ha portato a pensare che la reazione di ossidazione all'anello pirrolico fosse la prima reazione fotochimica ad avere luogo in soluzione.

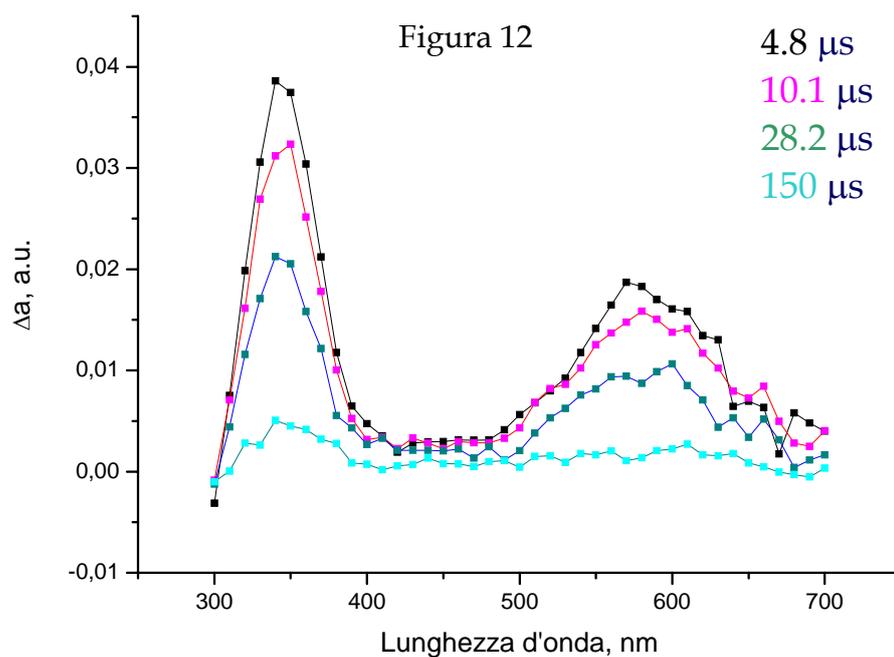
A questo proposito sono stati effettuati esperimenti sulle caratteristiche fotofisiche del prodotto di partenza e del fotoprodotto **5** il cui cromoforo differisce in modo sostanziale dal cromoforo dell'atorvastatina. In figura 11 è mostrato lo spettro UV-vis del farmaco.

L'atorvastatina non mostra emissione di fluorescenza. Sono stati effettuati esperimenti di *laser flash photolysis* con il principale scopo di determinare se l'atorvastatina sia in grado di sensibilizzare la produzione di ossigeno singoletto.

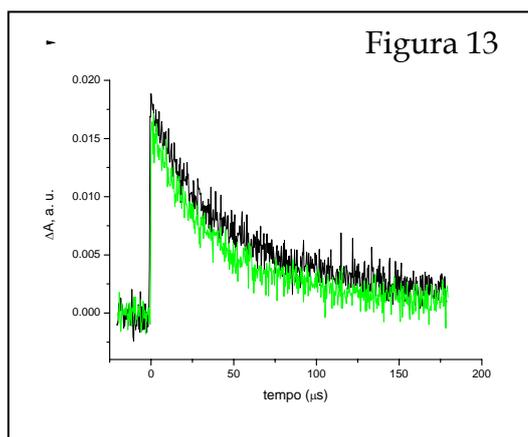
In figura 12 è mostrato lo spettro *laser flash photolysis* registrato in seguito all'eccitazione del substrato con una sorgente laser a 266 nm, in atmosfera di

azoto, sciogliendo il farmaco in metanolo. L'esperimento laser nelle stesse condizioni è stato ripetuto utilizzando una sorgente laser a 308 nm; esperimenti analoghi sono stati condotti sciogliendo il farmaco in acqua e in acetonitrile, i risultati non variano apprezzabilmente in funzione della lunghezza d'onda di eccitazione e del solvente impiegato. Le due bande presenti nello spettro con massimi a 360 e 580 nm (figura 12) decadono con uguale andamento e sono attribuibili ad un'unica specie che si identifica con l'intermedio fotochimicamente reattivo dell'atorvastatina in soluzione. La presenza di ossigeno non influisce sul tempo di vita della specie eccitata, in figura 13 è mostrata la sovrapposizione dei tempi di vita della specie registrati in assenza e in presenza di ossigeno a 580 nm.

Il fit dei dati suggerisce un tempo di vita di 36  $\mu\text{s}$  per questa specie.

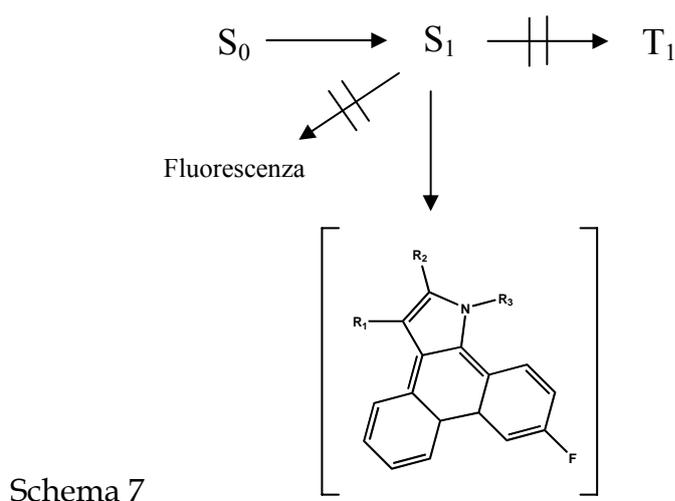


Dati di letteratura riguardanti lo studio di sistemi stilbenici riportano che a seguito di irradiazione i trans-stilbeni possono dar luogo ad isomerizzazione geometrica cis-trans e fluorescenza con una resa quantica di  $\Phi_f=0.05$ , mentre gli stilbeni cis non sono in grado di dare emissione di fluorescenza, essi reagiscono fotochimicamente per dare sia isomerizzazione geometrica che ciclizzazione a



partire dallo stato di singoletto eccitato della molecola; in assenza di ossidanti quali ossigeno o iodio il prodotto di reazione è il diidrofenantrene. (Turro N. J., 1991, Rodier J-M., et al., 1993) La reazione procede attraverso un intermedio ciclico instabile, che subisce *shift*

sigmatropico di idrogeno per dare il diidrofenantrene. La reazione in questo caso è di equilibrio. I processi di ciclizzazione e l'isomerizzazione geometrica dallo stato di singoletto eccitato sono in competizione per cui il *quantum yield* per la formazione del diidrofenantrene è basso in queste condizioni. Se si opera in presenza di un ossidante la reazione procede irreversibilmente fino alla formazione del fenantrene, in tali condizioni è possibile convertire quantitativamente sia gli stilbeni *cis* che *trans* in fenantreni (Turro N. J., 1991, Roberts C. et al., 2005). Nel caso dell'atorvastatina la struttura è bloccata in posizione *cis* a causa della presenza dell'anello pirrolico, l'unica specie rilevabile è consistente con l'intermedio di reazione dovuto alla formazione di un nuovo legame in posizione 2'', 6''' (schema 7).



Alla luce dei risultati osservati l'atorvastatina reagisce fotochimicamente nello stato di singoletto eccitato; poiché non è stata osservata alcuna specie che

subisce *quenching* da parte dell'ossigeno tripletto appare altamente improbabile che il farmaco possa dar luogo ad una specie di tripletto in grado di agire come *self-sensitizer* per la produzione della specie ossigeno singoletto.

Una volta scartata l'ipotesi secondo cui sia il farmaco stesso nello stato eccitato ad agire da *self-sensitizer*, e, visto che il primo processo fotochimico è in realtà la ciclizzazione del sistema stilbenico, è stato ipotizzato che il sensibilizzatore di ossigeno singoletto fosse un intermedio fenantrenico formatosi in seguito alla ciclizzazione in ambiente ossidante. Abdel-Shafi riporta che in cicloesano il fenantrene presenta efficienza di produzione di ossigeno singoletto pari a  $f_{\Delta}=0.5-0.6$  a partire dallo stato di tripletto eccitato. Per tale molecola  $E_{S_1}-E_{T_1}<94$   $\text{KJmol}^{-1}$  il *gap* energetico non è sufficiente affinché il *quenching* da parte dell'ossigeno dello stato di singoletto eccitato del fenantrene produca direttamente ossigeno singoletto. Il *quantum yield* di *intersystem crossing* riportato per il fenantrene in solventi apolari è  $\Phi_{ISC}=0.82$ . (Abdel-Shafi *et al.*, 2001).

Al fine di provare l'esistenza di un derivato con un ciclo addizionale generatosi in seguito all'irradiazione diretta dell'atorvastatina in soluzione e non isolabile nel mezzo di reazione poiché estremamente reattivo in condizioni aerobiche, è stato condotto un esperimento di irradiazione in presenza di un ossidante

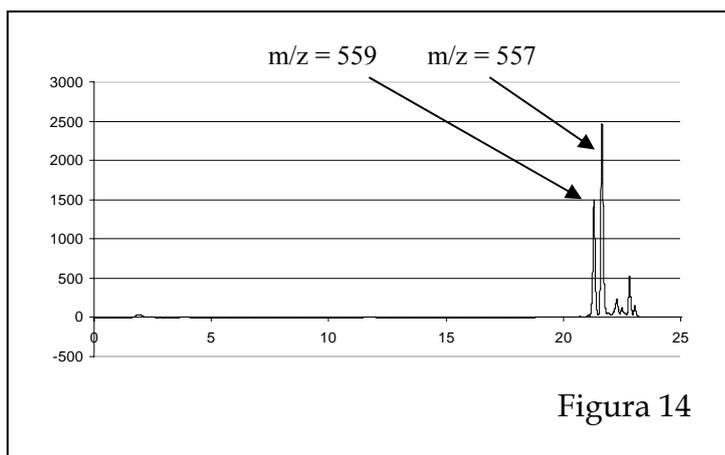


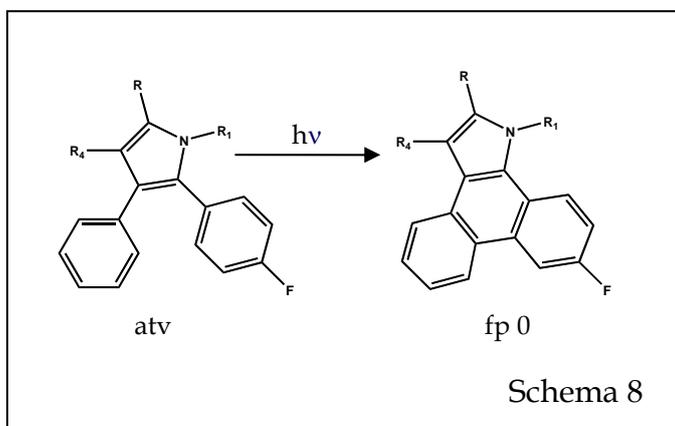
Figura 14

diverso dall'ossigeno, iodio molecolare, in atmosfera di azoto (Olsen, R. J. *Et al.*, 1985).

La miscela di reazione è stata iniettata direttamente all'HPLC-MS che mostra due picchi principali con *m/z*

rispettivamente di 559 e 557 (figura 14) attribuibili al farmaco e ad un prodotto con un tempo di ritenzione molto simile nel quale risultano assenti due idrogeni, compatibile con il fotoprodotto risultante dalla reazione di ciclizzazione della funzione stilbenica seguita da rapida ossidazione per

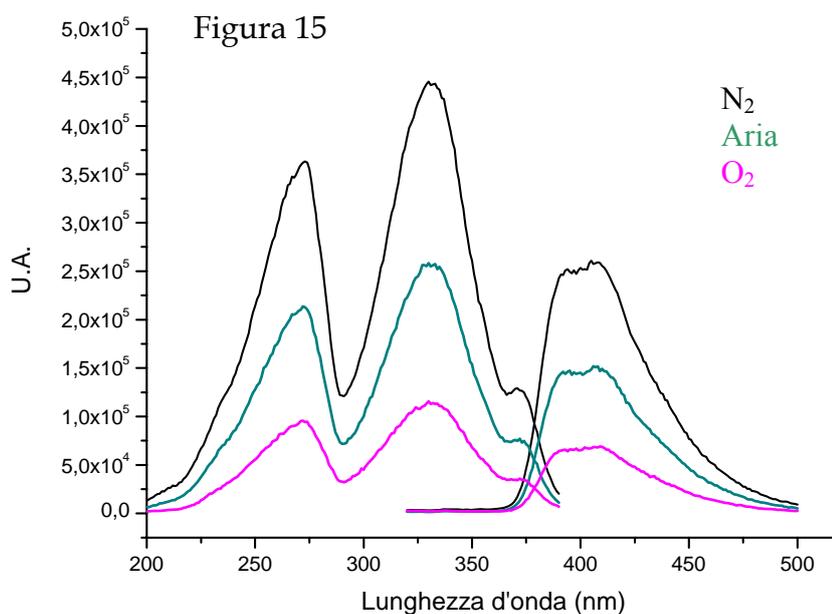
formare un derivato tetraciclico coniugato (indicato in figura come fp. 0). Il prodotto osservato è molto reattivo in presenza di ossigeno e difficilmente isolabile.



Il composto tetraciclico mostrato nello schema 8, fotoprodotto 0, probabilmente reagisce rapidamente con l'ossigeno per dare il composto 5, che è, al contrario di quanto inizialmente supposto, il primo prodotto

della trasformazione fotochimica dell'atorvastatina in acqua.

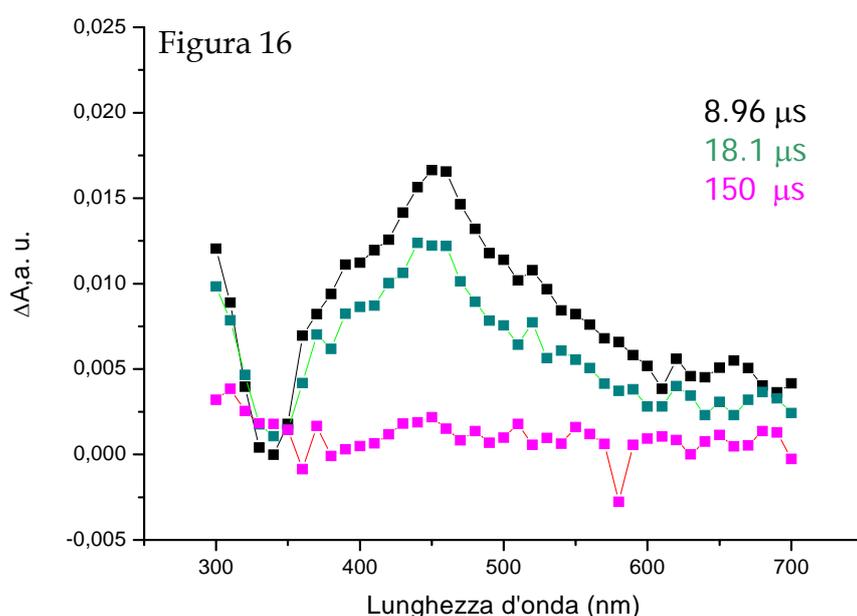
La miscela diastereoisomerica 5 è stabile in soluzione e i due diastereoisomeri sono stati isolati e caratterizzati mediante spettroscopia NMR, le differenze strutturali tra il fotoprodotto 0 e il fotoprodotto 5 consistono nell'ossidazione all'anello pirrolico e *shift* del sostituente alchile, per tale motivo ulteriori esperimenti sono stati condotti su questo substrato supponendo che ci sia affinità nel comportamento fotochimico con il composto 0 instabile.



In primo luogo sono state effettuate misure di fluorescenza in metanolo in atmosfera di azoto, sono state calcolate l'energia dello stato di singoletto,  $E_s=318 \text{ KJmol}^{-1}$  e la resa quantica di fluorescenza,  $\Phi=0.35$ , utilizzando naprossene come standard. L'emissione di fluorescenza subisce *quenching* da parte dell'ossigeno; in figura 15 è mostrata la sovrapposizione dei segnali ottenuti in atmosfera di azoto, in aria e saturando la soluzione con ossigeno. I tempi di vita dello stato di singoletto in azoto, aria ed ossigeno sono stati misurati impiegando tecniche ad impulsi, i decadimenti analizzati rispecchiano il *quenching* osservato nelle misure di fluorescenza dello stato stazionario:  $\tau_f = 15 \text{ ns}$  ( $\text{N}_2$ ),  $9 \text{ ns}$  (aria),  $3.9 \text{ ns}$  ( $\text{O}_2$ ).

La costante di *quenching* è stata calcolata con l'equazione di Stern-Volmer e risulta dell'ordine di quella di diffusione del gas nel solvente ( $K_q = 1.8 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Sul fotoprodotto **5** sono stati effettuati esperimenti di *laser flash photolysis* impiegando un laser a  $266 \text{ nm}$ , lo spettro registrato in metanolo sotto azoto mostra una specie con un massimo di assorbimento a  $450 \text{ nm}$  (figura 16), registrando lo stesso spettro in aria è apprezzabile la scomparsa della banda a  $450 \text{ nm}$ , i decadimenti a confronto, registrati a  $450 \text{ nm}$ , sono mostrati in figura 17, il tempo di vita della specie in soluzione satura di azoto è di  $26 \mu\text{s}$ .



Sia il quenching da parte dell'ossigeno che la zona dello spettro in cui appare la banda fanno pensare che la specie osservata corrisponda al tripletto eccitato del composto **5**, dati di letteratura riportano il massimo della banda di assorbimento del tripletto del fenantrene a  $\lambda=482$  nm.

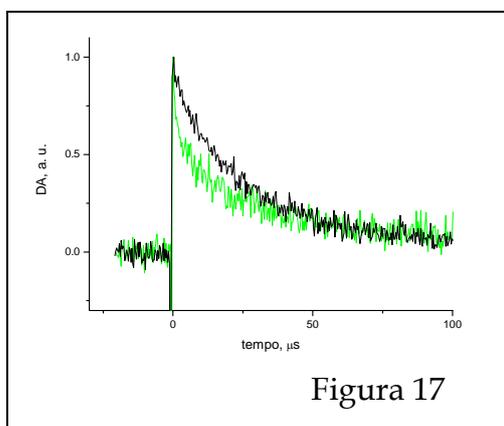


Figura 17

Per testare la reattività dell'atorvastatina con l'ossigeno singoletto sono stati condotti alcuni esperimenti utilizzando il farmaco **1** come *quencher*.  $^1\text{O}_2$  è stato prodotto bombardando con un laser a 308 nm una soluzione di perinaftene (Cosa G. et al., 2004; Schimdt R. et al., 2000), la cui resa di produzione di ossigeno singoletto è

molto vicina all'unità e varia di poco a seconda del solvente (Cosa G. et al., 2004).

Soluzioni a diversa concentrazione di atorvastatina sono state aggiunte al campione, la capacità di *quenching* è stata valutata registrando volta per volta il tempo di vita dell'ossigeno singoletto prodotto in soluzione. La strumentazione necessaria comprende una sorgente ad impulsi e un rilevatore particolare a diodi di germanio che registra l'intensità dell'emissione di fosforescenza in soluzione a  $\lambda = 1270$  nm, ossia alla lunghezza d'onda a cui tipicamente emette il primo stato eccitato dell'ossigeno (Cosa G. et al., 2004).

La costante di *quenching*,  $K_q = 1.5 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$  è stata calcolata utilizzando l'equazione di Stern-Volmer.

In figura 18 sono mostrate la sovrapposizione dei tempi di vita di  $^1\text{O}_2$  registrati a differenti concentrazioni di quencher, e la relazione lineare che intercorre.

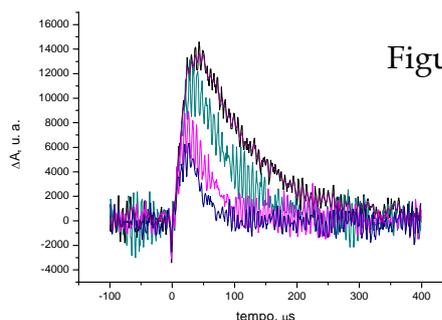
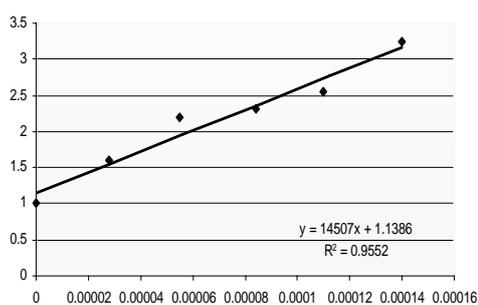


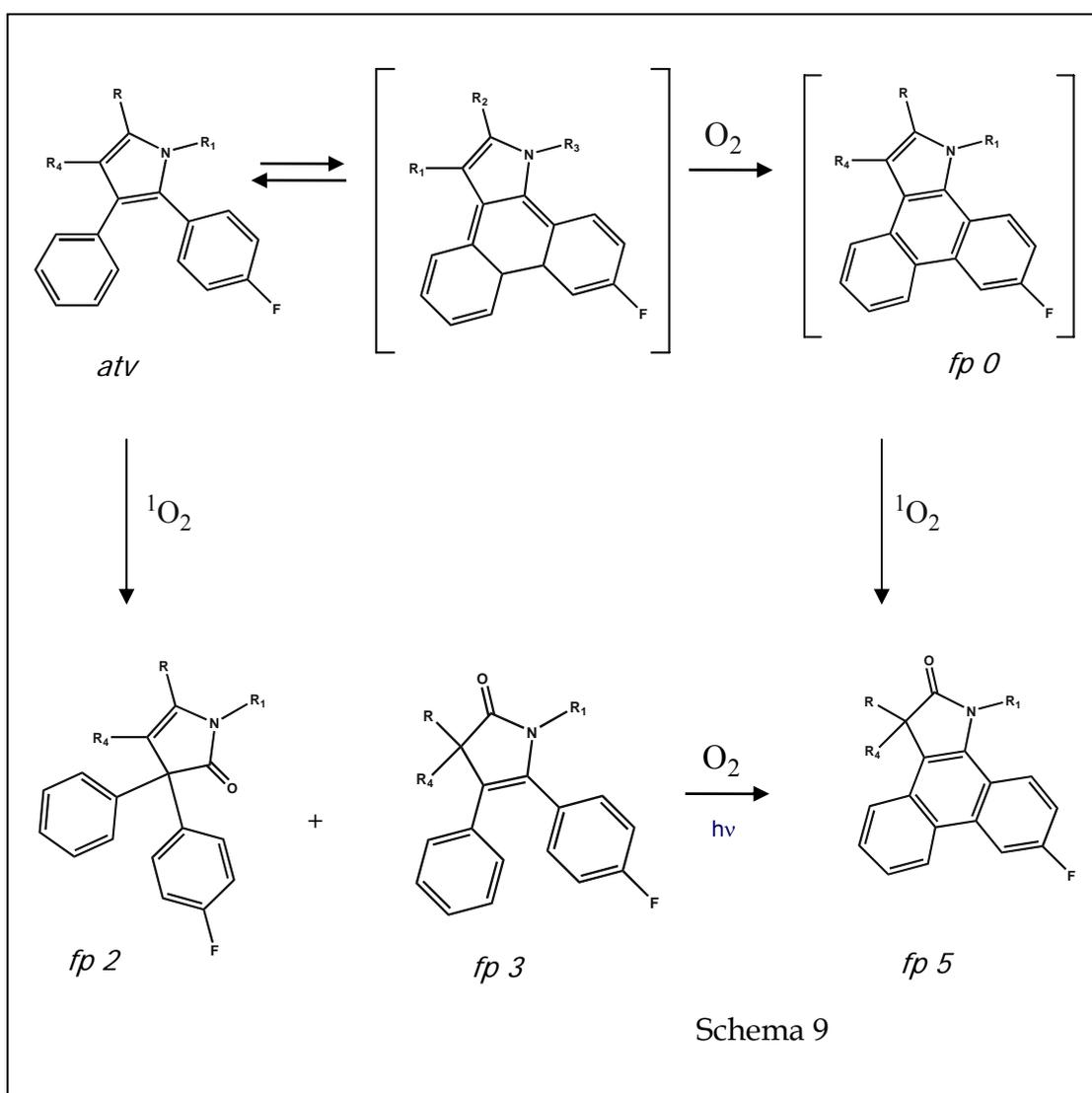
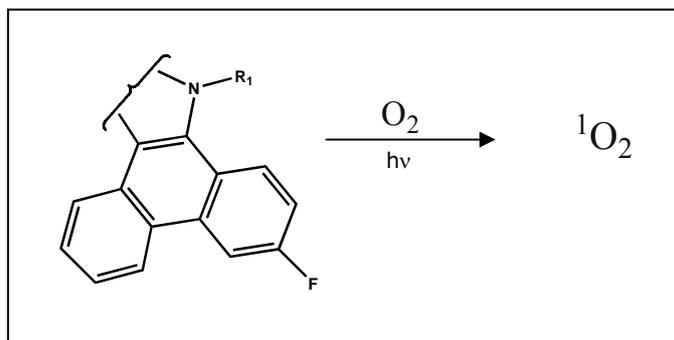
Figura 18

### 2.1.5 Produzione di ossigeno singoletto

Razionalizzando i dati è stato dedotto che l'atorvastatina reagisce con ossigeno singoletto ma non è in grado di produrlo per irradiazione diretta, lo stato eccitato reattivo del farmaco è lo stato di singoletto che evolve in acqua e in presenza di ossigeno per formare un fotoprodotto tetraciclico coniugato instabile (fotoprodotto **0**). Il derivato ciclico sensibilizza la produzione di ossigeno singoletto in soluzione e reagisce con lo stesso per dare il composto **5**.

Nel mezzo di reazione entrambi i composti con funzione fenantrenica, composto **0** e composto **5**, sono in grado di produrre ossigeno singoletto che reagisce con la percentuale di farmaco non trasformato per dare i fotoprodotti **2** e **3** (schema 9).

In realtà l'unica specie stabile in queste condizioni e quindi significativamente in grado di produrre ossigeno singoletto è il composto **5**, per quanto il composto **0** sia in origine l'unico sensibilizzatore di  $^1\text{O}_2$ , e quindi il reale responsabile del meccanismo di ossidazione.



## 2.2 Fluvastatina

La fluvastatina (**10**) presenta una struttura chimica caratterizzata da un nucleo indolico sostituito in  $\alpha$  con una funzione vinilica e in  $\beta$  con un *p*-fluorofenile; la catena ossidrilata è analoga a quella presente nella struttura dell'atorvastatina ma presenta un'insaturazione ai carboni C6-C7 (figura 19).

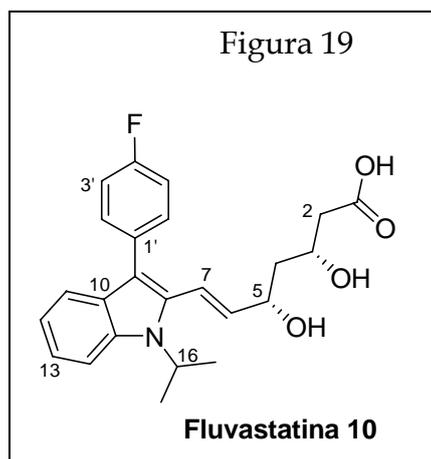
Il farmaco è solubile in acqua e in solventi polari.

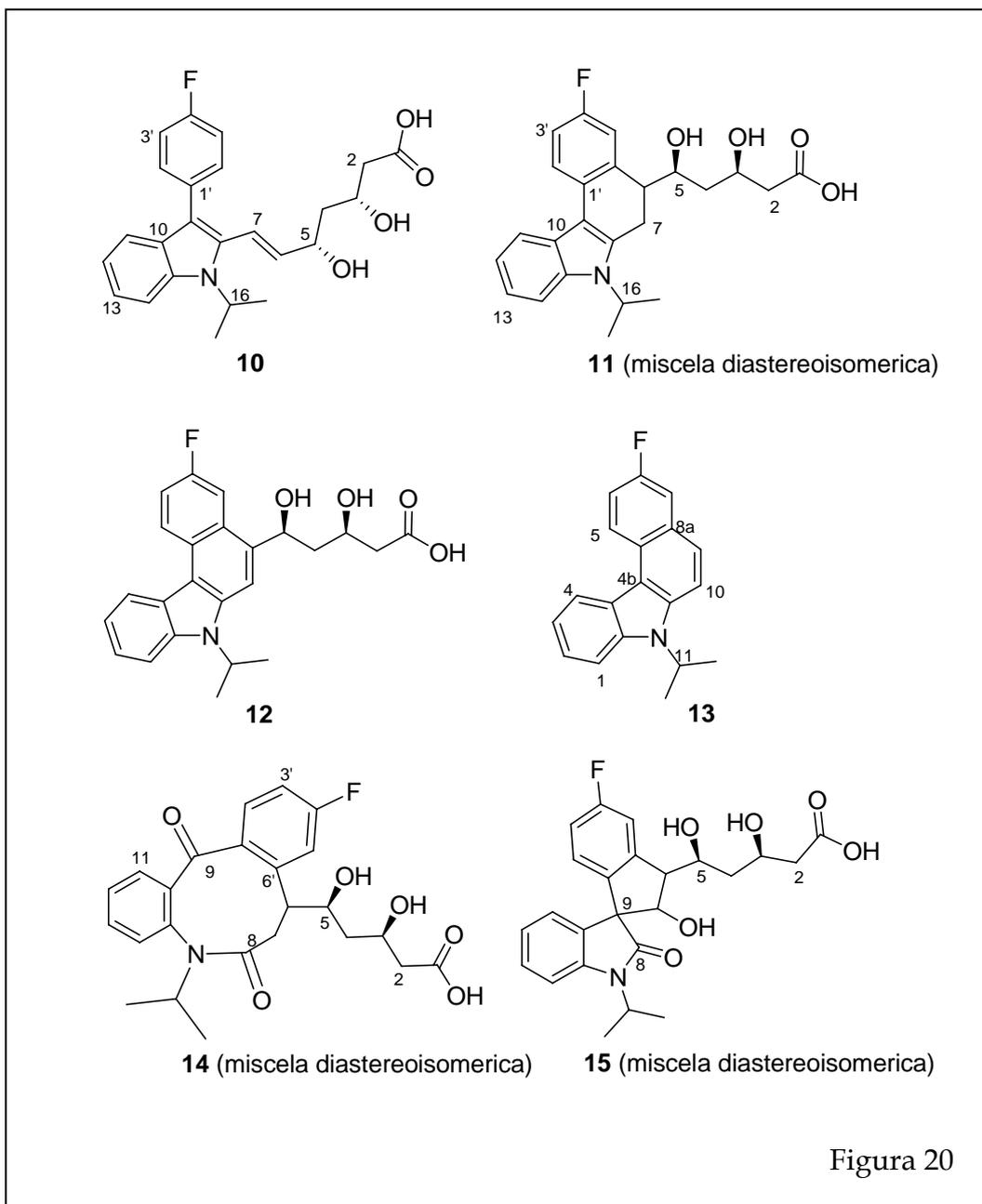
Inizialmente sono state preparate alcune soluzioni di fluvastatina in acqua Milli Q e in tampone a pH 7.0 da tenere al buio per valutare possibili reazioni idrolitiche. In entrambi i casi controlli su TLC e analisi NMR

fino a sette giorni hanno dimostrato che il farmaco è stabile in acqua.

Il comportamento fotochimico è stato valutato utilizzando come fonte luminosa il sole. L'analisi NMR ha mostrato che la fluvastatina già dopo un solo giorno di esposizione è completamente trasformata in una miscela di prodotti. La separazione dei componenti della miscela mediante tecniche cromatografiche ha richiesto l'impiego di differenti fasi mobili e stazionarie.

I fotoprodotti isolati corrispondono ad un diidrobencocarbazolo **11** (32%) in forma di miscela diastereoisomerica, un benzocarbazolo sostituito **12** (12%), il benzocarbazolo **13** (22%), il lattame **14** (6%) e un composto spiranico **15** (24%), gli ultimi due presenti anch'essi sotto forma di miscele diastereoisomeriche (figura 20). La separazione della miscela diastereoisomerica corrispondente al composto **2** è stata ottenuta metilando con diazometano e separando su colonna HPLC C-18 per ottenere gli esteri metilici **11a** e **11b**.





### 2.2.1 Caratterizzazione dei fotoprodotti

Le strutture dei composti isolati sono state ipotizzate sulla base degli spettri ottenuti impiegando diverse tecniche NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) e dai dati degli spettri di massa EI-MS.

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati i valori degli spettri NMR dei composti **11**, **12** e del farmaco di partenza **10**.

**Tabella 1** Dati <sup>1</sup>H NMR di **10** - **12** (CD<sub>3</sub>OD)<sup>a</sup>

Pos.	<b>10</b>	<b>11a-bis</b> <sup>b</sup>	<b>11b-bis</b> <sup>b</sup>	<b>12</b>
2	2.35 dd (4.8, 15.6); 2.27 dd (7.8, 15.6)	2.24 dd (3.9, 14.6) ; 2.13 dd (7.8, 14.6)	2.30 dd (4.8, 15.6) ; 2.13 dd (7.8, 15.6)	2.52 m 2.47 m
3	3.97 m	4.01 m	3.97 m	4.24 m
4	1.70 m, 1.52 m	1.46 m, 1.36 m	1.58 m, 1.51 m	2.15 m
5	4.39 m	3.83 m	3.61 m	5.71 m
6	5.73 dd (6.8, 16.6)	3.16 m	2.99 m	
7	6.70 d (16.6)	3.40 obscured, 3.06 dd (7.8, 16.6)	3.61 m, 2.93 m	8.17 s
11	7.57 d (8.9)	7.12 d (8.8)	7.91 d (8.0)	8.54 d (8.0)
12	7.13	7.11 m	7.11 m	7.31 t (8.2)
13	7.00 t (7.8)	7.11 m	7.11 m	7.42 t (8.2)
14	7.41	7.55 d (8.8)	7.53 d (8.8)	7.78 d (8.2)
16	4.95 sept (7.0)	4.88 sept (7.5)	4.88 sept (7.5)	5.29 sept (6.8)
17	1.65 d (7.0)	1.66* d (7.5)	1.65* d (7.5)	1.77 d (6.8)
18	1.65 d (7.0)	1.65* d (7.5)	1.64* d (7.5)	1.77 d (6.8)
2'	7.41	7.81 dd (8.8, 7.8)	7.78 dd (8.8, 7.8)	8.88 dd (5.4, 3.6)
3'	7.15	7.01 m	7.03 m	7.47 m
5'	7.15	7.01 m	7.03 m	8.03 dd (5.7, 1.5)
6'	7.41			
OMe		3.43 s	3.48 s	

<sup>a</sup> In parentesi sono mostrati i valori di *J* (in Hz). I valori con lo stesso apice sono interscambiabili. <sup>b</sup> I dati mostrati sono dell'estere metilico.

**Tabella 2** Dati <sup>13</sup>C NMR di **10** - **12** (CD<sub>3</sub>OD)<sup>a</sup>

Posizione	<b>10</b>	<b>11a-bis</b> <sup>b</sup>	<b>11b-bis</b> <sup>b</sup>	<b>12</b>
1	180.2	174.0	174.1	179.0
2	45.3*	43.1	43.1	45.5
3	68.8	69.2	69.0	69.8
4	45.6*	39.8	43.1	47.5
5	72.2	74.8	71.2	71.5
6	141.4	47.6	48.5	140.4
7	123.1	22.8	24.8	112.5
8	130.2	137.4	137.4	140.4
9	113.3	110.4	110.6	128.8
10	130.2	126.6	126.4	125.1
11	120.6	120.6	120.5	123.3
12	120.6	121.4	121.3	121.1
13	121.0	122.1	122.1	125.5
14	113.3	112.8	112.6	112.5
15	138.0	138.0	138.1	140.4
16	48.9	48.7	48.5	48.5
17	22.4	22.5	22.3	21.9
18	22.4	22.5	22.3	21.9
1'	134.6	132.3	132.2	127.6
2'	133.7	124.9	124.9	127.3
3'	116.7	117.8	118.3	116.9
4'	163.5	161.7	161.4	160.5
5'	116.7	115.1	115.1	110.2
6'	133.7	137.9	138.1	129.4
OMe		52.3	52.4	

<sup>a</sup> I valori con lo stesso apice sono interscambiabili. <sup>b</sup> I dati mostrati sono dell'estere metilico.

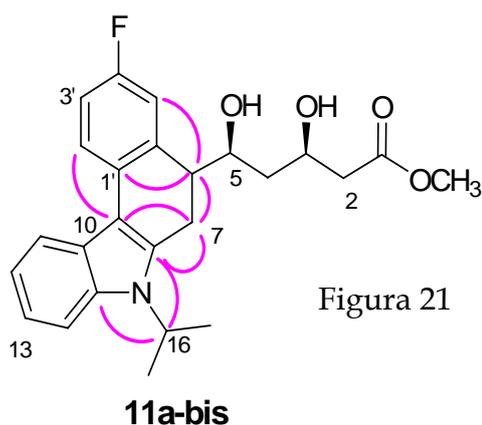


Figura 21

Il composto **11** si presenta come una miscela di due diastereoisomeri in rapporto di ca. 1 : 1, che sono stati separati e caratterizzati come esteri metilici. Uno dei due isomeri dell'estere metilico **11a-bis**, mostra un picco molecolare a  $m/z$  425  $[M]^+$  nello spettro di massa EI-MS suggerendo una formula molecolare

$C_{25}H_{28}FNO_4$ . Nello spettro UV risulta una banda a 313 nm. Lo spettro  $^1H$  NMR (Tabella 1) mostra sette protoni aromatici, quattro metinici a  $\delta$  4.88, 4.01, 3.83, e 3.16, sei metilenici a  $\delta$  3.40/ 3.06, 2.24/2.13, e 1.46, e tre metilici a  $\delta$  3.43, 1.66 and 1.65. Nello spettro  $^{13}C$  NMR sono stati osservati ventiquattro segnali, due carboni metilici, tre metilenici, e undici metinici in base allo spettro DEPT; le correlazioni con i protoni sono state attribuite sulla base dello spettro HSQC. L'assenza del segnale del legame olefinico e di uno dei protoni aromatici in confronto con i dati spettrali della fluvastatina **10** suggerisce la presenza di un nuovo ciclo. L'ipotesi è stata poi confermata dallo studio degli altri spettri NMR. Lo spettro  $^1H$ - $^1H$  COSY mostra le correlazioni della catena 3,5-diidrossipentanoica, indicando che parte della catena è presente e legata all'anello addizionale. Nello stesso esperimento il metino H-5 risulta correlato al protone metinico H-6, che mostra a sua volta correlazione con il metilene H-7. La struttura planare è stata determinata in base ai dati ricavati dall'esperimento HMBC. Nell'assegnazione della struttura rivestono notevole importanza le correlazioni long-range esistenti tra il protone H-6 e i carboni C-7, C-4, C-5, C-5', C-1' e C-8, e tra i protoni H-7 e i carboni C-6, C-5, C-9, C-6' e C-8. Sono presenti inoltre le correlazioni tra il protone H-16 ( $\delta$  4.88) e i carboni C-8 e C-15, i protoni H-2' e H-11 e il carbonio C-9. Le correlazioni osservate sono consistenti con la struttura **11-bis** mostrata in figura 21.

L'aspetto generale degli spettri NMR dell'isomero **11b-bis** risulta del tutto simile. Fanno eccezione (Tabelle 1 e 2) i chemical *shift*  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  alle posizioni C-4, C-5, C-6 e C-7.

Il composto **12** è caratterizzato nello spettro di massa da un picco molecolare a

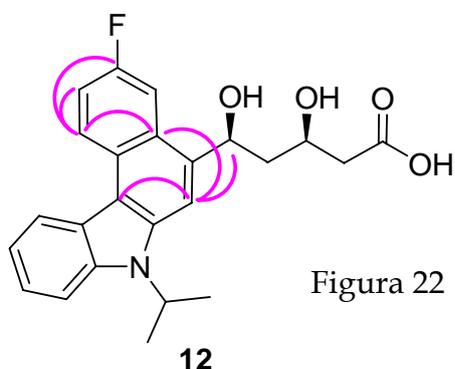


Figura 22

$m/z$  409  $[\text{M}]^+$  che suggerisce la formula molecolare  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{FNO}_4$ . Nello spettro UV si osserva la presenza di tre bande a 332, 363 and 378 nm. Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR (Tabella 2), mostra venti segnali. Lo spettro DEPT indica due metili, due metileni, e undici metini. Lo studio degli spettri protonici e

al carbonio ottenuti e l'analisi dei dati osservabili nell'esperimento HSQC ha permesso l'attribuzione dei protoni ai corrispondenti carboni. La struttura planare della molecola è stata determinata sulla base delle informazioni ricavate dagli esperimenti  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC. Le correlazioni long-range più significative sono quelle che legano il protone H-7 a  $\delta$  8.17 ai carboni C-5, C-9, C-6', e C-6/C-8, e il protone H-2' a  $\delta$  8.88 ai carboni C-3', C-6', e C-4' (figura22).

Al composto **13** è stata assegnata formula molecolare  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}$  sulla base dello spettro di massa EI-MS che presenta un picco molecolare a  $m/z$  277. Lo spettro UV mostra tre bande a 332, 359 e 379 nm. Risulta evidente negli spettri  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  NMR per confronto con la fluvastatina **10** e con i composti **11** e **12** l'assenza dei

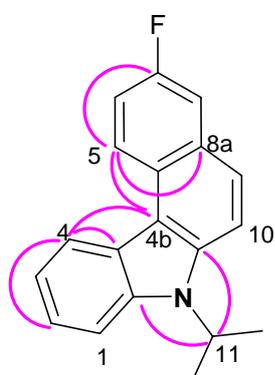


Figura 23

**13**

segnali relativi alla catena laterale. Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR indica diciotto segnali di cui sono stati riconosciuti, in base all'analisi dello spettro DEPT, due metili e dieci metini. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR ha mostrato nove protoni aromatici, un metino e due metili. L'assegnazione dei protoni ai carboni corrispondenti è stata effettuata mediante i dati dello spettro HMBC. Si evidenziano le correlazioni long-range del protone H-4 ( $\delta$  8.57) con i carboni C-4a ( $\delta$  123.7), C-4b ( $\delta$  119.7), e C-2 ( $\delta$  122.3). Ai

fini dell'assegnazione della struttura sono da considerare inoltre le correlazioni

esistenti tra il protone H-5 ( $\delta$  8.79) e i carboni C-7 ( $\delta$  158.9), C-8a ( $\delta$  129.5), e C-4b, e tra il protone H-11 ( $\delta$  5.21) e i carboni C-1a ( $\delta$  138.6) e C-10a ( $\delta$  137.2). L'interpretazione delle correlazioni eteronucleari si è dimostrata consistente con la struttura **13** (figura 23).

Il composto **14** è stato ottenuto come miscela di diastereoisomeri in rapporto ca. 1 : 1 poi separata mediante HPLC a fase inversa. Uno dei due isomeri di **14**, i.e. **14a**, mostra nello spettro di massa EI-MS un picco molecolare a  $m/z$  443  $[M]^+$  che suggerisce la formula molecolare  $C_{24}H_{26}FNO_6$ .

**Tabella 3** Dati del composto **14a** in  $CD_3OD^a$

Posizione	$\delta_H^b$	J (Hz)	NOESY	$\delta_C^c$	HMBC <sup>d</sup>
1				179.0 (q)	
2	2.30 m, 2.35 m			44.0 (s)	1, 3, 4
3	3.98 m			68.5 (t)	1, 2
4	1.20 m, 1.45 m			42.3 (s)	2, 3, 5
5	3.98 m		5'	72.8 (t)	3, 7, 6'
6	2.97 q brd	8.8		45.3 (t)	4, 5, 1', 5', 6'
7	2.30 dd, 2.65 dd	13.7, 7.8, 15.8		44.0 (s)	5, 6, 8, 6'
8				172.8 (q)	
9				197.0 (q)	
10				143.7 (q)	
11	7.88 d	7.8		132.4 (t)	9, 10, 12, 15
12	7.72 m			131.9 (t)	10, 11
13	7.72 m			134.7 (t)	12, 14, 15
14	7.31 d	6.5	17/18	133.2 (t)	10, 12
15				135.2 (q)	
16	4.24 sept	6.8		48.5 (t)	8, 15, 17, 18
17	1.01* d	6.8	14	21.8 (p)	16, 18
18	0.63* d	6.8	14	20.2 (p)	16, 17
1'				135.2 (q)	
2'	7.91 dd	8.8, 6.8		134.7 (t)	9, 3', 6'
3'	7.13 ddd	10.7, 8.8, 2.9		115.9 (t)	1', 4', 5'
4'				165.0 (q)	
5'	7.42 dd	10.7, 2.9	5	116.3 (t)	6, 1', 3', 4'
6'				145.4 (q)	

<sup>a</sup> I valori con lo stesso apice sono interscambiabili <sup>b</sup> Valori di chemical shift  $^1H$  ( $\delta$  ppm da SiMe<sub>4</sub>) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz). <sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT. <sup>d</sup> Correlazioni HMBC da H a C.

Nello spettro UV si osserva una banda a 257 nm. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Tabella 3) rivela la presenza di sette protoni aromatici, quattro metini a  $\delta$  4.24, 3.98 (x 2), e 2.97, sei protoni metilenici a  $\delta$  2.65/2.30, 2.35/2.30, 1.45/1.20, e due metili a  $\delta$  1.01 e 0.63 nella regione alifatica. Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR si osservano ventuno segnali. Mediante l'esperimento DEPT è stato possibile distinguere i segnali in due metili, due metileni, e dieci metini. L'attribuzione dei protoni ai carboni corrispondenti è stata effettuata sulla base dello spettro HSQC.

Le correlazioni della catena 3,5-diidrossipentanoica visualizzate nello spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY confermano che parte della catena laterale è ancora presente; nello stesso esperimento si vede la correlazione del metino H-5 con il metino H-6, che

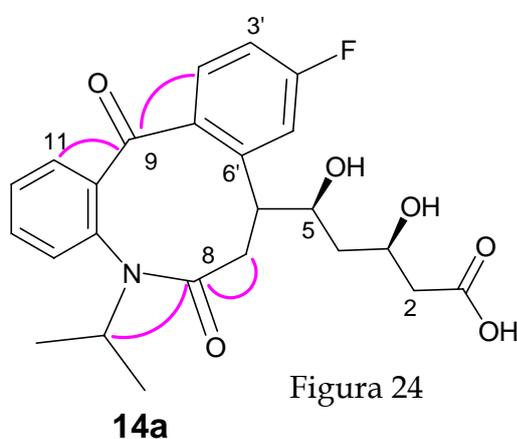


Figura 24

è a sua volta correlato con il metilene H-7.

La presenza di due ossigeni addizionali si evidenzia nell'analisi dello spettro di massa. I segnali a  $\delta$  197.0 e 172.8, nello spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR, sono conformi alla presenza di due funzioni carboniliche. Nello spettro HMBC (Tabella 3) il primo carbonile mostra correlazione con i

protoni H-11 and H-2', mentre il secondo con i protoni H-7 e H-16. Queste correlazioni hanno portato ad ipotizzare l'ossidazione dell'anello eteroaromatico per dare un azonano-2,7-dione. Tutte le altre correlazioni nello spettro HMBC confermano l'assegnazione della struttura all'isomero **14a** (figura 24).

I dati NMR registrati per l'isomero **14b** non differiscono da quelli descritti per il primo isomero **14a**, eccetto che per piccole differenze di *chemical shift* per i protoni H-3, H-4, H-5, H-7, H-2' e H-5', e per i carboni C-4, C-16, C-2' e C-6

Anche il composto **15** è stato ottenuto sottoforma di miscela diastereoisomerica di due componenti in rapporto ca. 1 : 1, poi separati su HPLC a fase inversa. Uno dei due isomeri di **15**, i.e. **15a**, mostra nello spettro di massa EI-MS un picco molecolare a  $m/z$  443  $[\text{M}]^+$ , al composto è stata assegnata formula molecolare  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{FNO}_6$ . Nello spettro UV si presenta una banda 260 nm. Lo

spettro  $^1\text{H}$  NMR (Tabella 4) mostra sette protoni nella regione aromatica, mentre nella zona alifatica si rilevano cinque metini a  $\delta$  4.58, 4.57, 4.34, 4.13 e 3.81, quattro metileni a  $\delta$  2.55/2.44 e 2.01, e due metili a  $\delta$  1.49 e 1.48. Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR indica la presenza di ventitre carboni. Lo spettro DEPT mostra un metile, due metileni, e dodici metini che sono stati relazionati ai protoni corrispondenti in base ai dati ricavati dall'esperimento HSQC.

**Tabella 4** Dati NMR del composto **15a** in  $\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$

Posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	J (Hz)	NOESY	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	HMBC <sup>d</sup>
1				179.4 (q)	
2	2.55 dd, 2.44 dd	12.7, 7.8, 2.0		44.0 (s)	
3	4.34 m			69.3 (t)	
4	2.01 m		6, 7, 5'	43.5 (s)	2, 3, 5
5	4.13 m		7	73.3 (t)	3, 4, 6, 7, 6'
6	3.81 dd	9.3, 5.8	4	55.0 (t)	5, 7, 1', 6'
7	4.58 d	9.3	4, 5, 11	85.5 (t)	5, 6, 8, 9, 10
8				178.2 (q)	
9				65.8 (q)	
10				134.0 (q)	
11	7.15 d	7.5	7	125.4 (t)	9, 10, 12, 14, 15
12	7.11 t	7.5		124.3 (t)	10, 13, 14
13	7.34 t	7.5		130.2 (t)	11
14	7.20 d	7.5	17/18	111.5 (t)	10, 12
15				145.7 (q)	
16	4.57 m			46.0 (t)	8, 15, 17, 18
17	1.49* d	6.8		20.1 (p)	16, 18
18	1.48* d	6.8		20.1 (p)	16, 17
1'				139.0 (q)	
2'	6.53 dd	8.0, 5.5		124.6 (t)	9, 3', 6'
3'	6.86 ddd	10.7, 8.0, 1.9		115.9 (t)	2', 4'
4'				164.7 (q)	
5'	7.47 dd	8.8, 1.9	4	114.6 (t)	1', 3', 4'
6'				148.0 (q)	

<sup>a</sup> I valori con lo stesso apice sono interscambiabili. <sup>b</sup> Valori di chemical shift  $^1\text{H}$  ( $\delta$  ppm da  $\text{SiMe}_4$ ) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz). <sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT. <sup>d</sup> Correlazioni HMBC da H a C.

Nello spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY sono presenti le correlazioni attribuite alla catena 3,5-diidrossipentanoica di conseguenza almeno parte della catena è ancora presente nel composto in esame, nello stesso esperimento è possibile osservare le

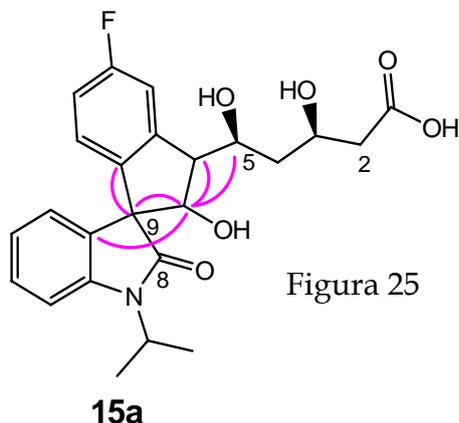


Figura 25

correlazioni del metino H-5 con il metino H-6, che è a sua volta correlato al metino H-7.

Dallo spettro di massa è stata dedotta la presenza di due ossigeni addizionali. I segnali a  $\delta$  178.2 e 85.5, nello spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR, hanno portato ad ipotizzare l'esistenza di una funzione carbonilica e di una carbinolica. Il carbonio carbinolico a  $\delta$  85.5 ha mostrato

correlazione con il protone  $\delta$  4.58 nell'esperimento HSQC, e con i protoni H-5 e H-6 nello spettro HMBC (Tabella 4). Nello stesso esperimento si osservano le correlazioni del protone H-7 a  $\delta$  4.58 con i carboni C-5 - C-10. Il carbonio quaternario a  $\delta$  65.8 è stato assegnato al C-9 in base alle correlazioni esistenti con i protoni H-7 e H-11. Il carbonio carbonilico a  $\delta$  178.2 invece correla con i protoni H-7 e H-16. Tutti i dati NMR registrati risultano consistenti con la struttura planare attribuita all'isomero **15a** (figura 25). Il valore di 9.3 Hz della costante di accoppiamento tra i protoni H-6 e H-7 indica una conformazione *cis* relativamente a questi protoni. In accordo con la struttura proposta l'analisi dello spettro NOESY evidenzia effetto NOE del protone H-4 con i protoni H-6 e H-7, del protone H-5 con i protoni H-7, di H-7 con H-11, e di H-14 con i metili 17/18.

L'altro isomero di **15**, i.e. **15b**, mostra gli stessi segnali negli spettri NMR dell'isomero descritto sopra, fanno eccezione per piccole differenze i chemical shift dei protoni alle posizioni H-3, H-4, H-5, H-7 e H-5', e dei carboni C-5, C-7, C-5'. Per questo isomero l'analisi degli spettri NOESY mostra effetto NOE del protone H-14 con i metili 17/18.

### 2.2.2 Prove meccanicistiche

La fluvastatina (**10**) si trasforma facilmente in soluzione acquosa quando esposta alla luce solare per dare una miscela di prodotti (**11-15**).

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR di una miscela di irradiazione ottenuta in seguito ad esposizione prolungata (10 giorni) mostra la presenza del composto **13** (circa il

90%) e del composto **14** (tracce). Per ottenere maggiori informazioni sul meccanismo fotochimico sono stati condotti esperimenti in condizioni differenti.

Si è ricorso all'utilizzo di una lampada UV (filtro pyrex) come sorgente luminosa per accorciare i tempi di reazione, in queste condizioni il composto di partenza risulta totalmente trasformato dopo un'ora di irradiazione, lo spettro  $^1\text{H}$  NMR mostra che nella miscela sono presenti gli stessi prodotti ottenuti dopo un giorno di esposizione alla luce solare.

Conducendo la stessa reazione in atmosfera di argon si ottiene come unico prodotto la miscela diastereoisomerica **11**, da ciò è facile dedurre un diretto coinvolgimento dell'ossigeno nella formazione dei prodotti **12-15**.

Per chiarire se i prodotti avessero tutti origine direttamente dalla fluvastatina è stata valutata singolarmente la fotolabilità dei prodotti **11-13**, quadruplicando il tempo di irradiazione alla lampada UV. Dall'analisi NMR delle miscele di irradiazione si ricava che la miscela diastereoisomerica **11** se irradiata nelle stesse condizioni del farmaco reagisce in soluzione acquosa per formare la miscela di prodotti **12**, **13** e **14** mentre i composti **12** e **13** risultano stabili. Di conseguenza, mentre il prodotto **11** si forma per irradiazione diretta della fluvastatina, i prodotti **12** e **13** si formano mediante processi secondari.

Un'irradiazione prolungata dei composti **12** e **13** ha indicato che mentre il **12** viene lentamente decomposto il **13** rimane pressoché inalterato. Da un confronto con i tempi di trasformazione fotochimica osservati per la molecola del farmaco, estremamente labile alla luce solare, risulta che il prodotto tetraciclico aromatico senza catena laterale presenta un grado di persistenza notevole.

Evidenze sperimentali hanno mostrato che irradiando i fotoprodotti **11** e **12** non si osserva formazione del composto **15** in soluzione, pertanto si è ipotizzato che la miscela diastereoisomerica **15** possa originarsi in seguito ad addizione di ossigeno alla fluvastatina **10**.

Esperimenti condotti in presenza di  $\text{NaN}_3$ , che agisce come inibitore di ossigeno singoletto, hanno mostrato un netto rallentamento della cinetica di trasformazione del farmaco (Iesce M. R. *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Ipotesi meccanicistica

Il confronto dei risultati ottenuti e lo studio di dati riportati in letteratura per substrati analoghi hanno portato ad ipotizzare il meccanismo di reazione riportato nello schema 10.

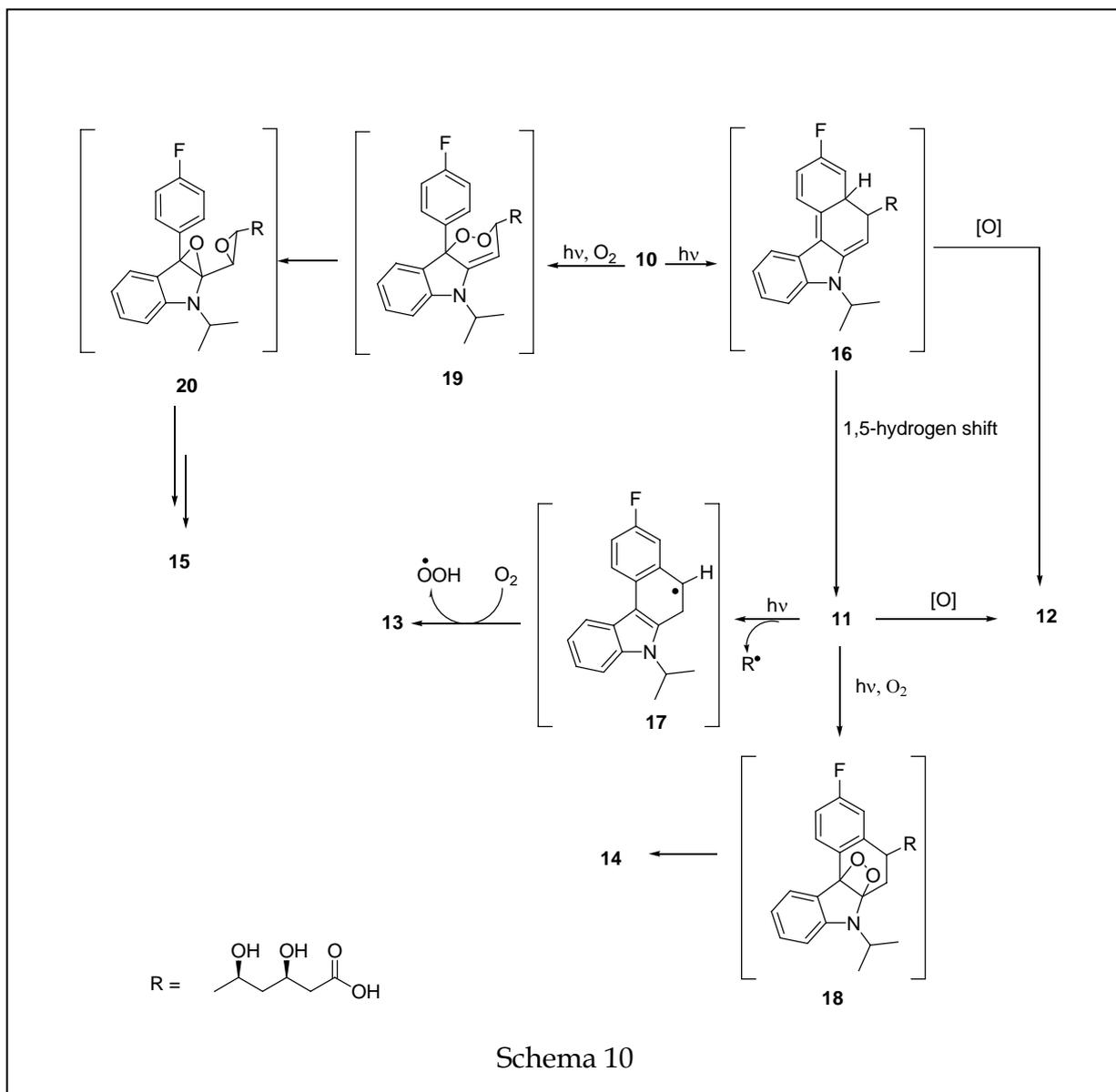
Come atteso in base agli studi descritti in letteratura sul comportamento fotochimico degli *o*-vinilbifenili (Mallory, F. B., *et al.*, 1998) la principale reazione è rappresentata dalla ciclizzazione elettrociclica seguita dallo shift 1,5 di idrogeno che porta alla formazione del diidrobencocarbazolo **11** via l'intermedio **16**, non isolabile nel mezzo di reazione.

Il composto **12** è verosimilmente generato a partire dall'ossidazione di **10**, via **16**, e/o **11**. Quest'ultimo può dare il benzocarbazolo **13** attraverso una scissione fotoindotta del legame C6-C7, con allontanamento della catena laterale e ossidazione del radicale benzilico **17** stabilizzato per risonanza (Albini, A. *et al.*, 2004).

La fotoossigenazione della funzione indolica del fotoprodotto **11** porta alla formazione del macrociclo **14**, secondo un meccanismo basato sulla rottura dei legami O-O e C-C di un diossetano intermedio **18** non rilevato risultante dall'addizione di ossigeno [2+2] all'anello eterociclico. La formazione di analoghe molecole macrocicliche era stata osservata in precedenza in caso di fotoossigenazione di alcaloidi indolici (Nakagawa, M. *et al.*, 1982).

Lo spiro composto **15** si formerebbe per addizione dell'ossigeno alla funzione dienica della fluvastatina e successivi riarrangiamenti, passando per un intermedio diepossidico di tipo **20**. Relativamente a reazioni di questo tipo è riportato in letteratura che l'addizione 1,4 di ossigeno singoletto a derivati vinilici di eterocicli a cinque termini che coinvolge il doppio legame esociclico [4+2] prevale nettamente sull'addizione al sistema dienico interno all'anello [2+2] (Iesce M. R. *et al.*, 2005; Bloodworth, A. J., *et al.*, 1985). Sono stati inoltre

descritti simili processi di contrazione ossidativa d'anello e ossidrilazione.  
(Griffin, G. W., *et al*, 1985; Nagakawa, M. *et al.*, 1982.)



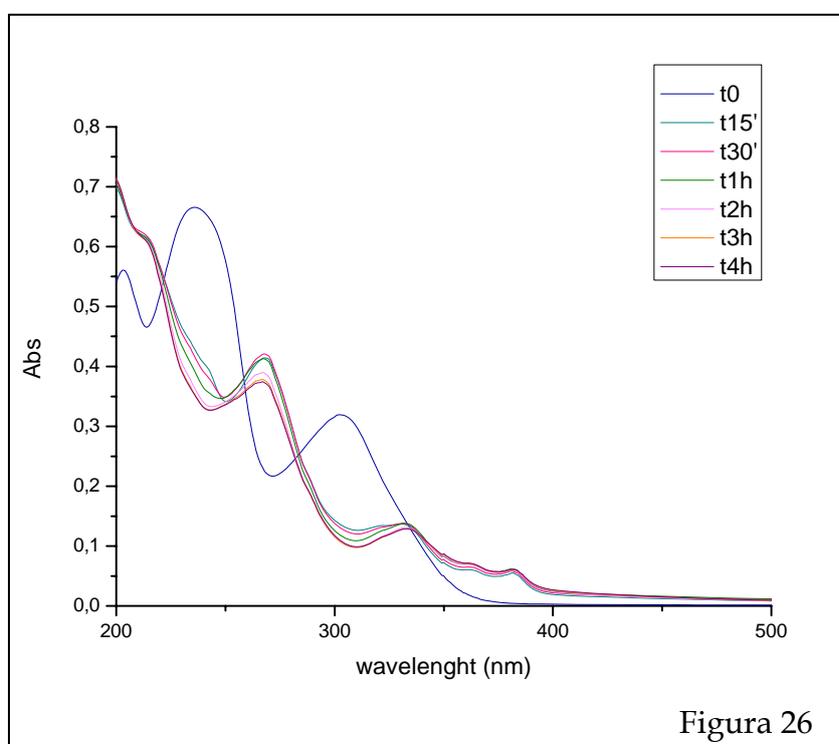
Allo scopo di verificare il coinvolgimento di ossigeno singoletto sono stati effettuati tipici esperimenti di controllo irradiando in presenza di blu di metilene, un efficiente sensibilizzatore di ossigeno singoletto in solventi polari (Iesce M. R. *et al.*, 2005). Conducendo l'irradiazione di fluvastatina **10** in queste condizioni si è avuta una significativa accelerazione della reazione che in questo caso fornisce principalmente lo spirocomposto **15**, mentre l'irradiazione in

presenza dello stesso sensibilizzatore del derivato **11** porta alla formazione quasi esclusiva del macrociclo **14**. Gli esperimenti descritti suggeriscono il coinvolgimento della specie ossigeno singoletto nel meccanismo di fotoossigenazione anche se non si può escludere, dato l'ambiente acquoso, il coinvolgimento di altre specie ossigenate come l'anione superossido. Rimane a questo stadio il dubbio sulla identità della specie in grado di sensibilizzare la formazione dell'ossigeno eccitato.

#### 2.2.4 Studi fotofisici preliminari

Gli studi fotofisici riportati per la fluvastatina sono stati condotti presso i laboratori de "Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC; Universidad Politécnica de Valencia" sotto la guida del Prof. Miguel Angel Miranda e della Dott. Virginie Lhiaubet-Vallet durante un periodo di sei mesi (giugno-dicembre) del 2006.

Per approfondire la comprensione del meccanismo che porta alla formazione dei composti isolati sono stati condotti ulteriori esperimenti sulla fluvastatina in soluzione.



In figura 26 è mostrata come linea in blu ( $t_0$ ) lo spettro UV di una soluzione di fluvastatina in acqua ( $1.1 \times 10^{-5}M$ ) le altre curve mostrano la variazione dello spettro di assorbimento del farmaco registrato a diversi tempi durante l'esposizione al sole.

Il farmaco si dimostra estremamente fotolabile in acqua, reagisce rapidamente se esposto al sole e ancor più rapidamente quando l'irradiazione è effettuata con lampade UV; alla luce dei risultati ottenuti dallo studio allo stato stazionario, la reattività fotochimica sembra coinvolgere più di un processo.

Il farmaco reagisce secondo due vie principali: ciclizza per formare il prodotto **11** e reagisce direttamente con l'ossigeno per produrre il derivato **15**, gli altri fotoprodotti isolati sono stati attribuiti a processi secondari (schema 10).

La struttura e la chimica della fluvastatina ricordano quelle degli *o*-vinilbifenili, in questo caso in luogo di un sostituente fenile la ciclizzazione avviene coinvolgendo un anello indolico.

La ciclizzazione di *o*-vinilbifenili a 9,10-diidrofenantreni è stata ampiamente studiata (Horgan *et al.*, 1973), il meccanismo in due step comprende un'elettrociclizzazione  $4n+2$  seguita da shift di idrogeno. I vinilbifenili producono in seguito ad irradiazione in mezzo non ossidante derivati diidrofenantrenici stabili, a differenza degli stilbeni la cui ciclizzazione in assenza di ossigeno è una reazione di equilibrio per la quale la resa di reazione è bassa (Turro N., 1991).

In letteratura sono presenti numerosi studi riguardanti la fotochimica degli *o*-vinilbifenili e molecole analoghe, sia dal punto di vista stazionario che mediante tecniche risolte nel tempo; secondo questi dati la fotoreattività degli *o*-vinilbifenili è soggetta a controllo conformazionale dello stato stazionario (Lewis F. D. *et al.*, 2002). Il conformero *cis* e il conformero *trans* reagiscono diversamente, il conformero *cis* è l'unico che può dar luogo a ciclizzazione mentre il conformero *trans* è responsabile dell'emissione di fluorescenza (Lewis F. D. *et al.*, 2003).

De Violet riporta uno studio di *laser flash photolysis* (de Violet, P. *et al.*, 1978) su 1-(*o*-fenil)-1-feniletilene; questa molecola, quando irradiata con radiazione UV,

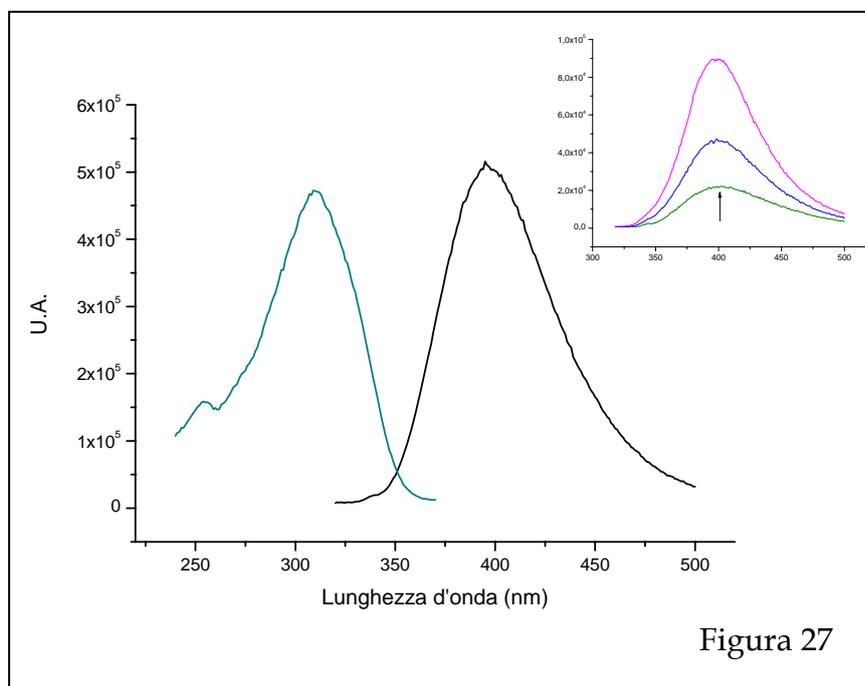
reagisce producendo in ambiente anaerobico 9-fenil-9,10-diidrofenantrene, mentre in presenza di agenti ossidanti, quali l'ossigeno dell'aria, porta alla formazione di 9-fenilfenantrene. Lo spettro *laser flash photolysis* indica la presenza di due specie, la prima con un massimo di assorbimento a 370 nm caratterizzata da un tempo di vita breve di 1.75  $\mu$ s in assenza di aria che risente fortemente della presenza di ossigeno in soluzione ( $k_q=10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), la seconda con due massimi di assorbimento a 300 nm e 570 nm il cui tempo di vita non viene significativamente affetto dall'ossigeno ( $k_q=10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Le due specie sono state attribuite da de Violet al tripletto eccitato della molecola e all'intermedio 9-fenil-8a,9-diidrofenantrene che in ambiente non ossidante subisce uno shift sigmatropico di idrogeno, termicamente permesso, per dare il prodotto osservato 9-fenil-9,10-diidrofenantrene.

Sulla fluvastatina sono state condotte misure di fluorescenza dello stato stazionario.

In figura 27 sono mostrati lo spettro di eccitazione e di emissione della fluvastatina in metanolo. Lo spettro di emissione mostra un massimo a 394 nm; lo spettro di eccitazione ottenuto per questa lunghezza d'onda di emissione corrisponde allo spettro di assorbimento della fluvastatina indicando che l'emissione avviene significativamente dallo stato di singoletto del farmaco e non da un complesso o un aggregato dello stesso. Dall'intersezione tra gli spettri normalizzati di emissione ed eccitazione normalizzati è stata calcolata un'energia dello stato di singoletto pari a 341 KJ/mol. In metanolo, a  $\lambda_{\text{exc}}=254$  nm, il farmaco esibisce una resa quantica di fluorescenza di  $\Phi_F = 0.12$ , eccitando a 308 nm è stato ottenuto un valore comparabile di  $\Phi_F = 0.17$ . In acqua, eccitando a 254 nm, è stato osservato un valore minore di  $\Phi_F = 0.08$ .

I tempi di vita dello stato di singoletto misurati mediante l'impiego di tecniche pulsate (*single photon counting technique*) sono  $\tau_s = 1.4$  ns in acqua e  $\tau_s = 2.4$  ns in metanolo. Lo spettro di fluorescenza della fluvastatina sia in acqua che in metanolo mostra che il farmaco non è stabile in queste condizioni. L'assorbimento della radiazione fornita dallo strumento induce la reazione del farmaco e la registrazione di spettri di fluorescenza sullo stesso campione a

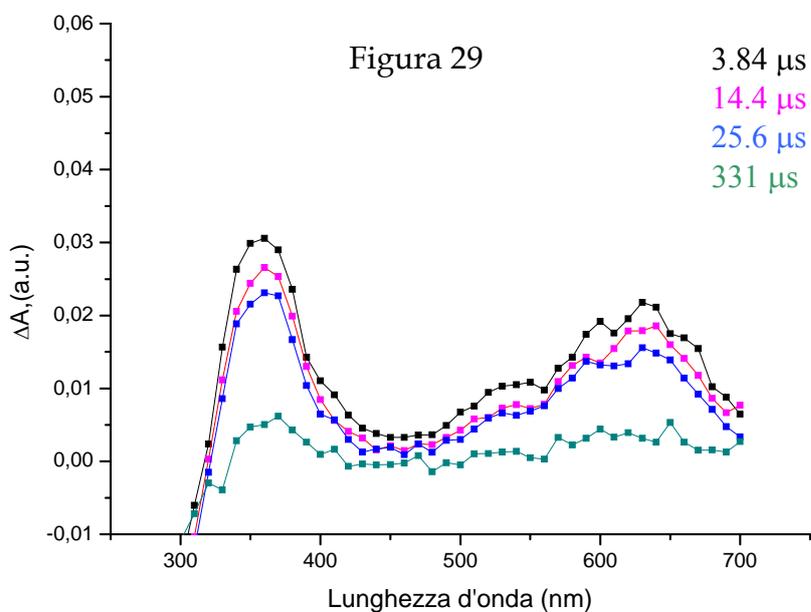
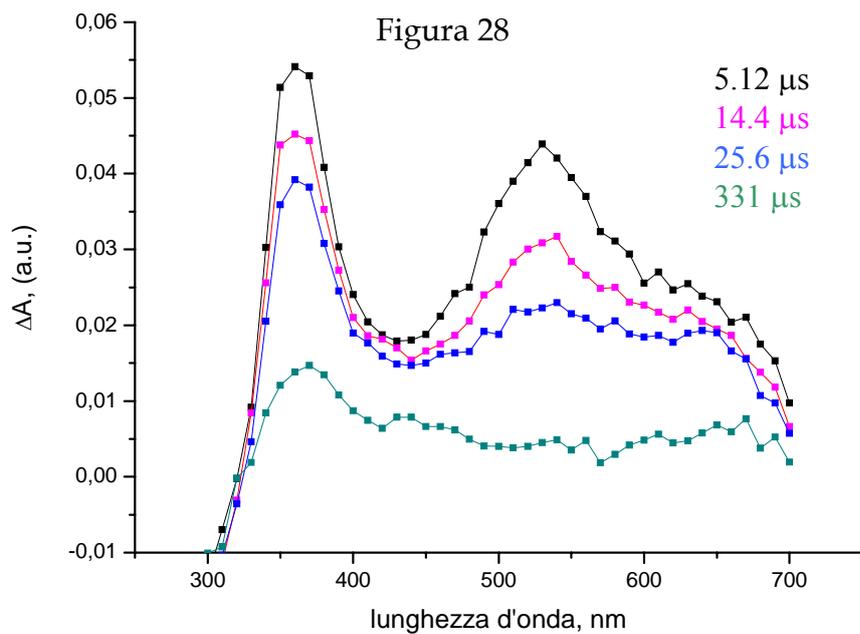
distanza di pochi minuti mostra una continua variazione negli spettri di emissione ed eccitazione con aumento dell'intensità dell'emissione.



Dopo circa venti minuti l'equilibrio è raggiunto e non si registrano altre variazioni a tempi più lunghi, nell'inserito in alto della figura 27 è mostrata la variazione dello spettro di emissione registrato in acqua a  $t = 0, 10, 20$  minuti. In letteratura sono riportati dei casi analoghi di variazione di fluorescenza per *o*-vinilbifenili particolarmente reattivi (Lewis F. D. *et al.*, 2002).

Sono stati condotti diversi esperimenti di *laser flash photolysis* in acqua e in acetonitrile impiegando sorgenti laser a 266 e 308 nm, con lo scopo principale di studiare la capacità della fluvastatina di generare ossigeno singoletto.

Nelle figure 28 e 29 sono riportati i differenti spettri *laser flash photolysis* registrati per la fluvastatina in acqua in atmosfera di azoto e in aria, rispettivamente. In azoto sono apprezzabili due massimi di assorbimento a 360 e 540 nm, lo spettro in aria mostra l'abbassamento della banda a 540 nm e permette di apprezzare un nuovo massimo di assorbimento a 620 nm.



Esperimenti analoghi effettuati in acetonitrile mostrano gli stessi risultati.

Il decadimento corrispondente al massimo di assorbimento a 360 nm non si dimostra compatibile con un fit monoesponenziale né biesponenziale, ciò suggerisce la presenza di più di due specie allo stesso massimo di assorbimento, la qual cosa, considerando anche il completo cambio dello spettro registrato in presenza di ossigeno, rende complicata l'identificazione dei transienti.

In presenza di ossigeno, la scomparsa del massimo a 540 nm fa supporre che il segnale in esame appartenga alla specie di tripletto del farmaco in analogia al caso studiato da de Violet (de Violet *et al.*, 1978).

In base alle lunghezze d'onda dei massimi di assorbimento è altamente probabile la presenza in soluzione di un intermedio ciclico precursore del composto **11**, con due massimi intorno a 360 e a 540 nm. In ogni caso è necessaria un'analisi più approfondita per chiarire questo contributo poiché tale specie si va parzialmente a sovrapporre con una terza specie con massimo intorno a 620 nm.

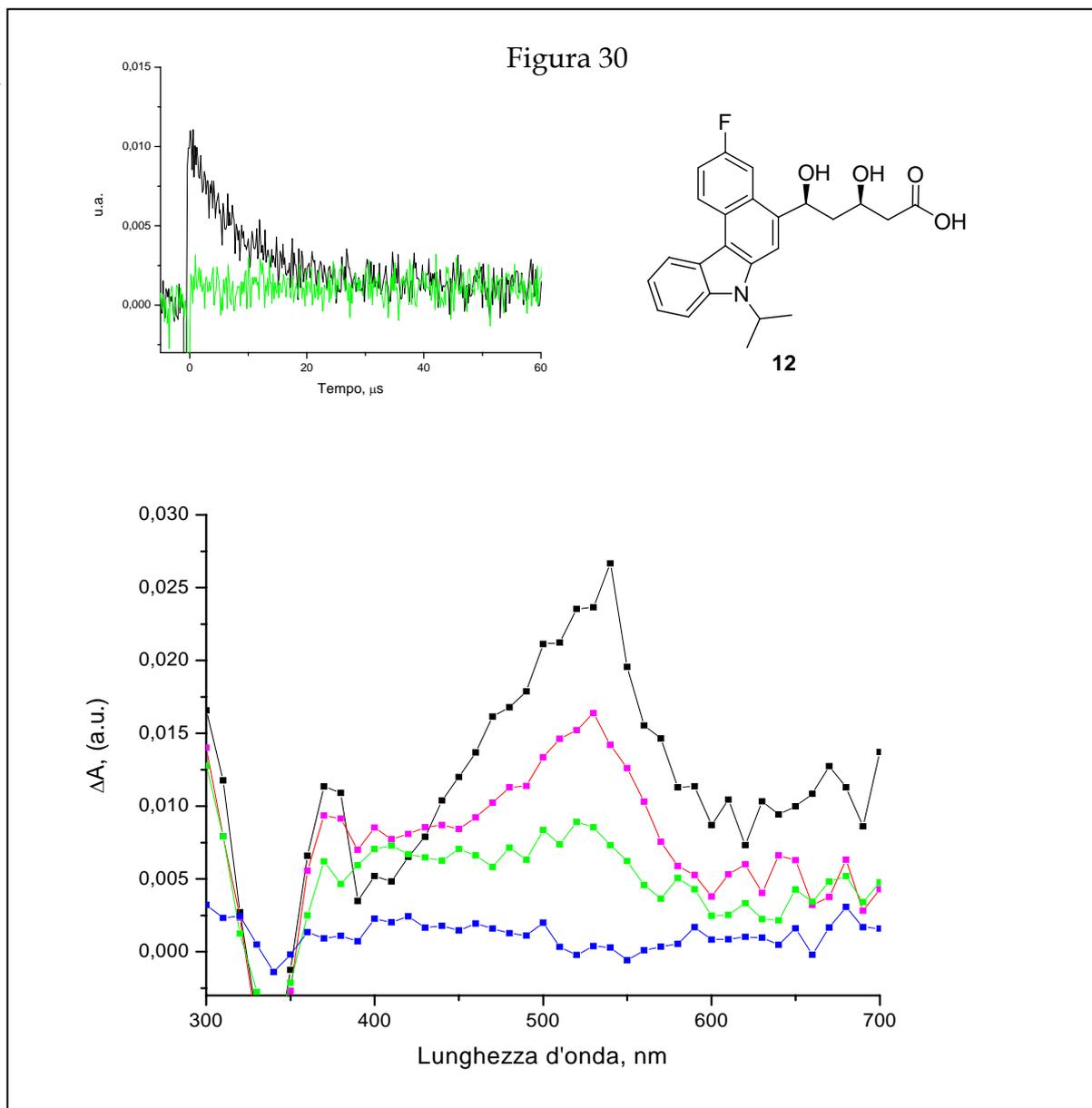
A questo stadio i dati ottenuti dagli spettri di *laser flash photolysis* indicano che la fluvastatina è in grado di dare *intersystem crossing* per formare uno stato di tripletto eccitato, è dunque probabile che questa costituisca una via per la generazione di ossigeno singoletto. E' quindi probabile che la reazione tra ossigeno singoletto e il farmaco sia all'origine della formazione del derivato **15**, mentre il composto **14** provenga dalla reazione di  $^1\text{O}_2$  con il composto ciclico **11**.

Inoltre, l'ossidazione del composto **11** dà luogo ai composti tetraciclici aromatici **12** e **13** che possono fungere da efficienti sensibilizzatori di ossigeno singoletto (Pari, K. *et al.*, 2000).

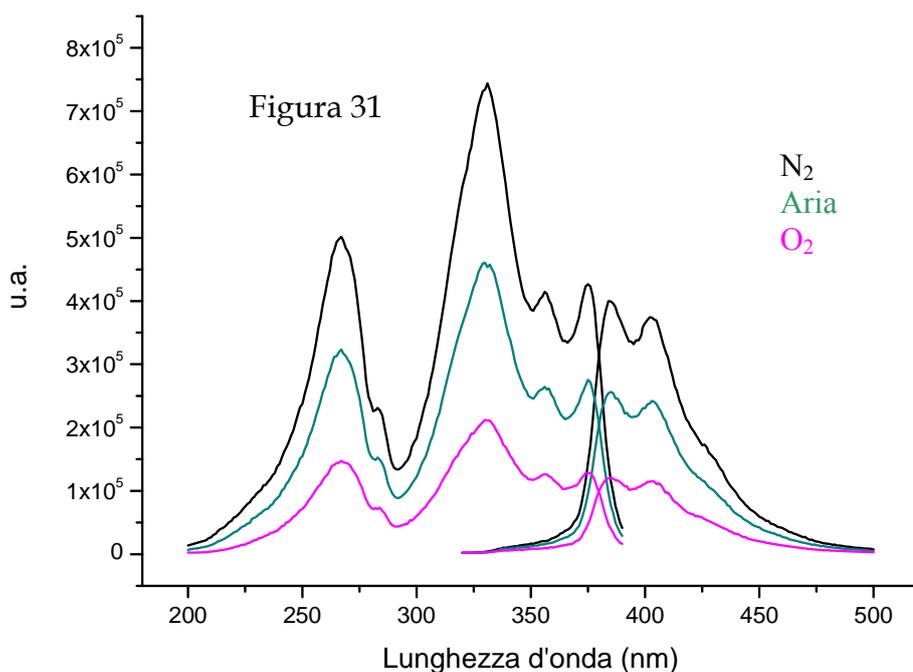
Il derivato **12**, diverso strutturalmente dal **13** solo per la presenza della catena laterale ossidrilata, è stato anch'esso analizzato mediante *laser flash photolysis*.

Lo spettro in metanolo registrato dopo l'impulso del laser a 266 nm in atmosfera di azoto mostra un'unica banda ampia con massimo di assorbimento a 540 nm e un tempo di vita di 6.1  $\mu\text{s}$ .

Questa specie scompare del tutto quando l'esperimento è condotto in atmosfera di aria; su questa base il transiente è stato assegnato ad una transizione tripletto-tripletto, nelle condizioni utilizzate lo stato di tripletto sembra essere l'unico transiente per questo fotoprodotto (figura 30).



Sempre sul derivato **12** sono stati condotti esperimenti di fluorescenza in metanolo eccitando a 308 nm; lo spettro di emissione mostra un massimo a XXX nm. Dall'intersezione degli spettri di eccitazione ed emissione normalizzati è stata ricavata un'energia di singoletto di 317 KJ/mol. La resa quantica,  $\Phi_F = 0.47$ , è stata misurata impiegando naprossene come riferimento.



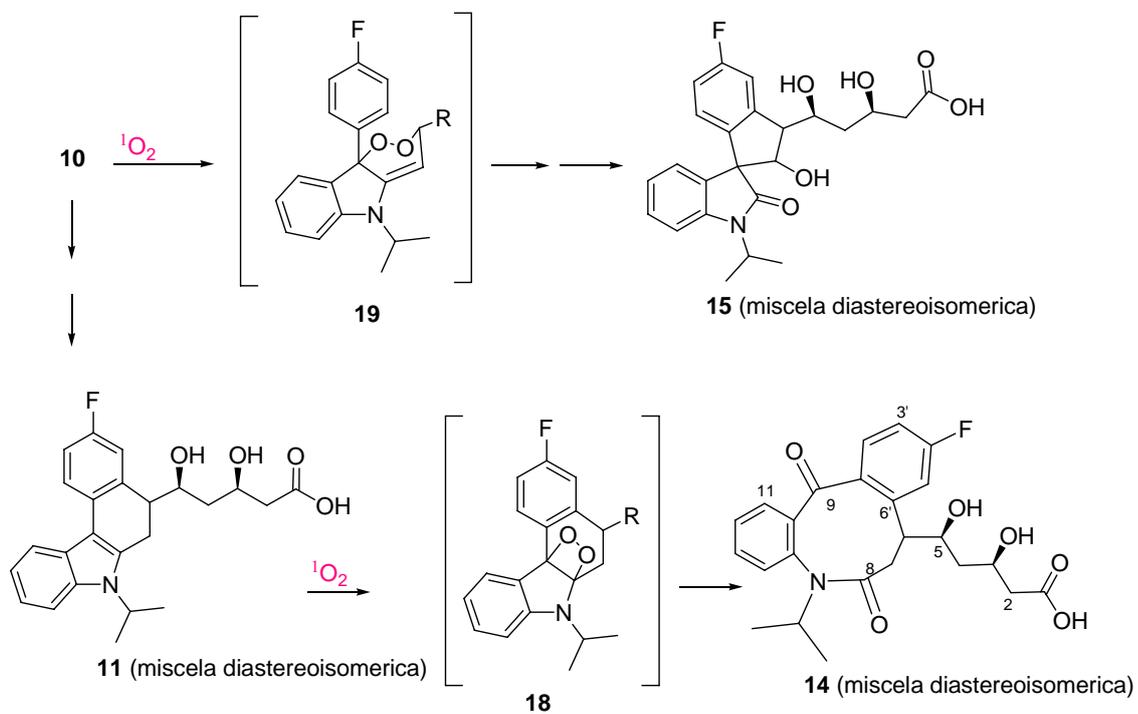
Sia le misure di fluorescenza dello stato stazionario che ad impulsi mostrano chiaramente che l'ossigeno influenza l'emissione agendo da *quencher*, le misure di fluorescenza sono state effettuate in atmosfera di azoto, in aria e in ossigeno, la costante di *quenching* dell'ossigeno è stata calcolata  $K_q = 1.8 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ossia dell'ordine della costante di diffusione dell'ossigeno nel solvente impiegato.

Infine sono stati estrapolati i tempi di vita dello stato di singoletto in azoto,  $\tau_s = 8.4 \text{ ns}$ , aria,  $\tau_s = 6 \text{ ns}$ , e ossigeno,  $\tau_s = 3.3 \text{ ns}$ . In figura 31 è mostrato il *quenching* dell'emissione di fluorescenza dello stato stazionario per ossigeno.

In conclusione esperimenti preliminari allo stato stazionario e mediante tecniche *time resolved* sulla fotochimica della fluvastatina hanno permesso la rilevazione degli stati di singoletto e di tripletto del farmaco **10** e del derivato **12**.

La complessità del modello non ha permesso l'identificazione di tutti i transienti coinvolti, in ogni caso sulla base delle evidenze sperimentali raccolte è lecito ipotizzare il contributo dell'ossigeno singoletto generato in soluzione alla formazione dei fotoprodotti **15**, per reazione diretta con la molecola del farmaco, e del fotoprodotto **14** per reazione con il derivato **11**.

Inoltre, nella miscela di irradiazione sono diverse le specie eccitate in grado di produrre ossigeno singoletto come mostrato per il farmaco e per il fotoprodotto **12**.

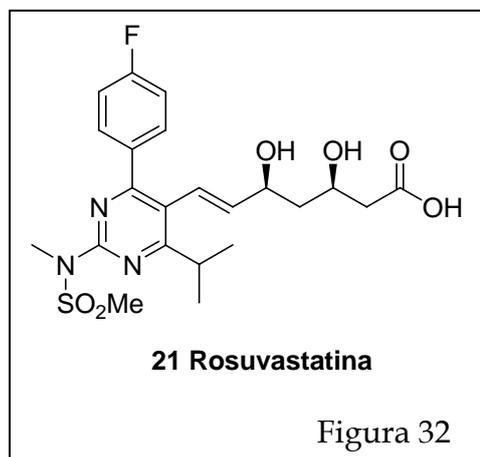


Schema 11

## 2.3 Rosuvastatina

La rosuvastatina (**21**) presenta una struttura analoga a quella della fluvastatina, in questo caso l'anello indolico è sostituito da una pirimidina; si presenta come polvere cristallina bianca poco solubile in acqua e del tutto solubile in metanolo (figura 32).

In primo luogo il farmaco è stato conservato in soluzione acquosa al buio per valutare eventuali processi idrolitici. Sono state preparate soluzioni in acqua MilliQ e in soluzione tamponata a pH 7.0. In entrambi i casi il farmaco risulta stabile in soluzione; controlli su TLC e di spettroscopia NMR a distanza di una settimana hanno dimostrato che il composto non subisce trasformazioni.

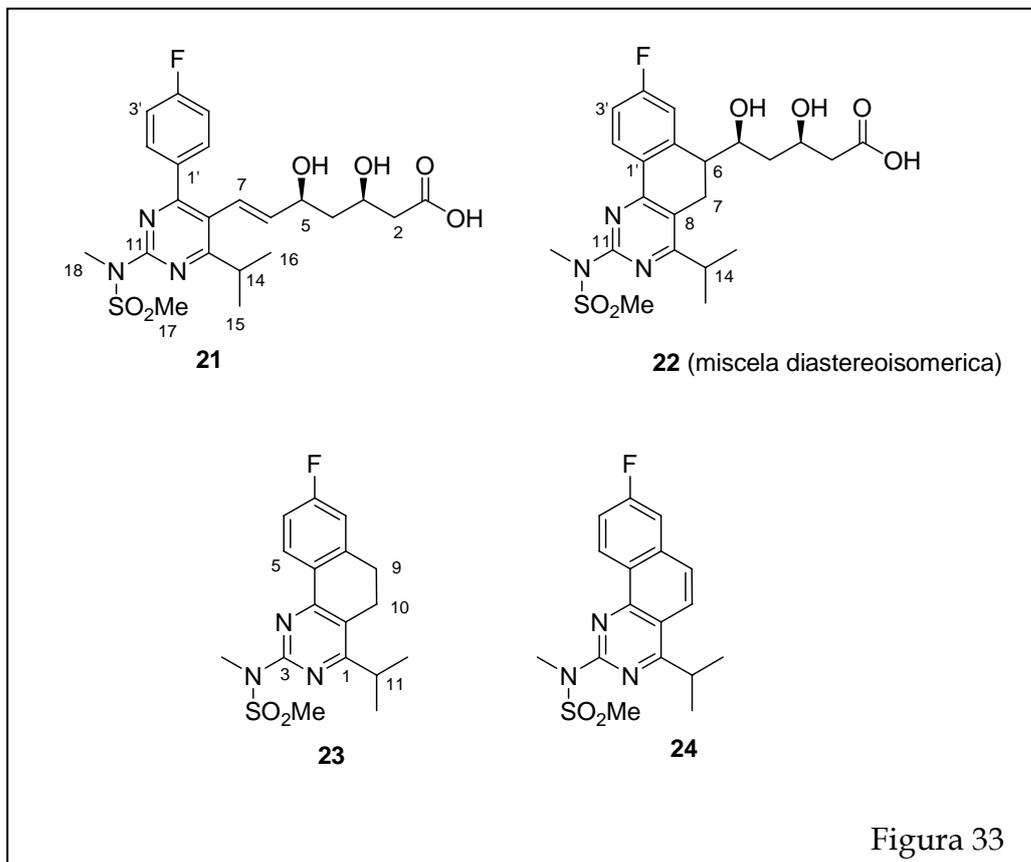


Il comportamento fotochimico della rosuvastatina in acqua pura è stato valutato in seguito a diretta esposizione alla luce solare. Una soluzione di rosuvastatina ( $10^{-5}\text{M}$ ) è stata esposta al sole quindi portata a secco a tempi differenti ed analizzata. Analisi su TLC e  $^1\text{H}$  NMR sulla miscela di irradiazione hanno indicato che il farmaco risulta completamente trasformato dopo quattro giorni di esposizione nei fotoprodotti **22-24**, il composto **22** è presente come miscela diastereoisomerica. (figura 33)

### 2.3.1 Caratterizzazione dei fotoprodotti

Per ottenere quantità sufficienti ad effettuare un'analisi spettroscopica per ogni fotoprodotto, sono stati condotti ulteriori esperimenti di irradiazione su dispersioni del farmaco (80 ppm) in acqua. L'analisi  $^1\text{H}$  NMR ha confermato che in queste condizioni si formano gli stessi fotoprodotti ritrovati in soluzioni diluite. I fotoprodotti **22-24** osservati nella miscele di irradiazione sono stati

separati mediante tecniche cromatografiche impiegando diverse fasi mobili e stazionarie.



Tutte le strutture proposte sono state ricavate mediante l'impiego di tecniche NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) ed esperimenti di spettrometria di massa EI-MS.

Il composto **22**, una diidrobenzochinazolina, è stato isolato come miscela di diastereoisomeri in rapporto 1 : 1. Uno dei due isomeri **22**, i.e. **22a**, mostra un picco a massa  $m/z$  463  $[M - CH_3OH]^+$  nello spettro di massa EI-MS suggerendo la formula molecolare  $C_{22}H_{28}FN_3O_6S$ . Nello spettro UV compare una banda a 314 nm. Nelle tabelle 5 e 6 sono riportati i dati  $^1H$  e  $^{13}CNMR$  del composto **22** e del farmaco di partenza **21** e della. Lo spettro  $^1H$  NMR (Tabella 5) mostra tre protoni aromatici, e quattro metinici a  $\delta$  4.11, 3.74, 3.41, and 3.08, sei protoni metilenici a  $\delta$  3.29/2.98, 2.37/2.26, e 1.64/1.52, e quattro metilici a  $\delta$  3.57, 3.54, 1.35 e 1.25 nella zona alifatica.

**Tabella 5** Dati <sup>1</sup>H NMR del composto **21 - 22** in CD<sub>3</sub>OD<sup>a</sup>

Posizione	<b>21</b>	<b>22a</b>	<b>22b</b>
2	2.37 dd (3.9, 15.6); 2.27 dd (8.8, 15.6)	2.37 d (2.0, 15.6) ; 2.26 dd (6.8, 14.6)	2.33 m 2.27 m
3	4.01 m	4.11 m	4.03 m
4	1.65m, 1.50 m	1.64 m, 1.52 m	1.62m, 1.57 m
5	4.35 m	3.74 m	3.59 obscured
6	5.55 dd (5.9, 15.6)	3.08 m	2.99 m
7	6.62 d (15.6)	3.29 obscured, 2.98 dd (6.8, 16.6)	3.59 obscured, 2.85 dd (6.8, 17.6)
14	3.48 m	3.41 m	3.41 m
15	1.27 d (6.5)	1.35 <sup>^</sup> d (6.5)	1.36 <sup>^</sup> d (6.5)
16	1.27 d (6.5)	1.25 <sup>^</sup> d (6.5)	1.26 <sup>^</sup> d (6.5)
17	3.53 <sup>*</sup> s	3.57 <sup>*</sup> s	3.57 <sup>*</sup> s
18	3.51 <sup>*</sup> s	3.54 <sup>*</sup> s	3.55 <sup>*</sup> s
2'	7.70 dd (4.9, 8.9)	8.34 dd (5.8, 7.8)	8.31 dd(5.8, 7.8)
3'	7.16 t (8.9)	7.12 m	7.14 m
5'	7.16 t (8.9)	7.12 m	7.14 m
6'	7.70 dd (4.9, 8.9)		

<sup>a</sup>In parentesi sono mostrati i valori di *J* (in Hz). I valori con lo stesso apice sono intercambiabili.

**Tabella 6** Dati <sup>13</sup>C NMR del composto **21 - 22** in CD<sub>3</sub>OD<sup>a</sup>

Posizione <sup>a</sup>	<b>21</b>	<b>22a</b>	<b>22b</b>
1	182.4	175.0	175.7
2	45.4	42.5	40.1
3	69.1	68.9	69.2
4	44.7	40.9	42.5
5	72.1	73.9	72.3
6	142.3	45.5	45.7
7	124.4	25.0	24.6
8	123.6	119.4	119.5
9	163.6	160.4	160.3
11	159.3	159.5	160.3
13	176.9	175.0	175.7
14	33.7	32.8	32.9
15	22.6	22.1	22.1
16	22.6	22.1	22.1
17	42.8	41.6	42.5
18	34.3	34.3	34.4
1'	136.6	130.9	131.0
2'	134.0	130.0	130.2
3'	116.6	115.9	116.1
4'	165.2	167.3	165.1
5'	116.6	118.1	117.7
6'	134.0	144.5	144.7

<sup>a</sup>Assegnati in base agli esperimenti DEPT, HSQC e HMBC.

Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR sono stati evidenziati venti segnali (Tabella 6). Nell'esperimento DEPT sono stati rilevati tre metili, tre metileni, e sei metini correlati ai corrispondenti protoni nell'esperimento HSQC.

Dal confronto con i dati spettrali della rosuvastatina **21** (tabelle 5 e 6) si evince la presenza di un nuovo anello e l'assenza del segnale assegnato al legame olefinico e di un protone aromatico.

Lo spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY mostra le correlazioni della catena 3,5-diidrossipentanoica. Il metino H-5 presenta correlazione, nello stesso esperimento, con il metino H-6, che a sua volta risulta correlato con il metilene

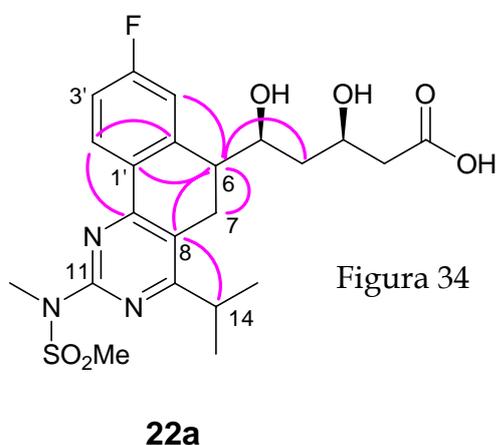


Figura 34

H-7. La struttura planare è stata determinata sulla base degli esperimenti HMBC.

È possibile osservare le correlazioni long-range del protone H-6 con i carboni C-7 ( $\delta$  25.0), C-4 ( $\delta$  40.9), C-5 ( $\delta$  73.9), C-5' ( $\delta$  118.1), C-1' ( $\delta$  130.9) e C-8 ( $\delta$  119.4), del protone H-7 con i carboni C-6 ( $\delta$  45.5), C-5, C-9 ( $\delta$  160.4), C-6' ( $\delta$  144.5) e C-8.

Altre correlazioni interessanti sono quelle del protone H-14 ( $\delta$  3.41) con i carboni C-13 ( $\delta$  175.0), C-8, e C-15/C-16 ( $\delta$  22.1), e del protone H-2' con C-9 e C-6'. Tutte le correlazioni sono consistenti con la struttura **22** (Figura 34)

L'altro isomero di **22**, i.e. **22b**, presenta formula molecolare  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_6\text{S}$  come dedotto dal picco a  $m/z$  463  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$  nello spettro di massa EI-MS. Lo spettro UV rivela una banda a 312 nm. Gli aspetti generali degli spettri NMR ricordano da vicino quelli del primo isomero (tabelle 5 e 6), fatta eccezione per il chemical shift dei protoni in posizione H-5, H-6 e H-7.

Il composto **23** presenta un picco molecolare a  $m/z$  349  $[\text{M}]^+$  nello spettro EI-MS suggerendo la formula molecolare  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ . Nello spettro UV si rileva la presenza di una banda a 312 nm. Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR (Tabella 7), mostra 16 segnali di carboni identificati dallo spettro DEPT come tre metili, due metileni,

e quattro metini. Un esame più attento degli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR del composto **23** attraverso gli spettri HMBC permette l'attribuzione dei protoni ai corrispondenti carboni. (Tabella 7).

**Tabella 7** Dati NMR dei composti **23** - **24** ( $\text{CDCl}_3$ )<sup>a</sup>

Posizione	<b>23</b>		<b>24</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		173.1		175.8
1a		118.5		126.9
3		157.6		156.0
4a		158.6		151.0
5a		129.8		129.7
5	8.26 dd (6.0, 8.7)	128.4	9.15 dd (6.0, 8.7)	128.1
6	7.04 dt (9.0, 2.7)	114.5	7.44 dt (9.0, 2.4)	116.3
7		165.6		162.6
8	6.95 dd (9.0, 2.4)	114.5	7.52 dd (8.7, 2.4)	112.1
8a		141.8		137.0
9	2.93 s	27.8	7.67 d (9.0)	125.4
10	2.93 s	21.9	7.96 d (9.0)	121.8
11	3.24 m	31.3	3.92 m	31.3
12	1.24 d (6.5)	21.2	1.45 d (6.5)	21.8
13	1.24 d (6.5)	21.2	1.45 d (6.5)	21.8
14	3.61* s	42.2	3.77* s	42.3
15	3.58* s	33.2	3.67* s	33.4

<sup>a</sup> in parentesi sono mostrati i valori di  $J$  (in Hz). I valori con lo stesso apice sono intercambiabili; <sup>b</sup>La molteplicità dei carboni è stata assegnata in base all'esperimento

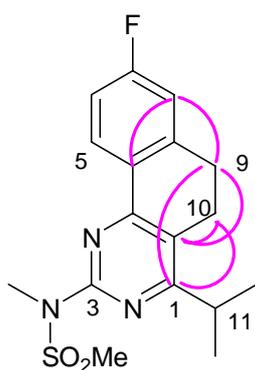


Figura 35

**23**

diidrobencchinazolinica **23** (figura 35).

La formula molecolare del composto **24**  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$  è stata assegnata in base all'osservazione nello spettro di massa EI-MS dello ione molecolare a  $m/z$  347.

Nello spettro UV è visibile una banda a 357 nm. Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR rivela

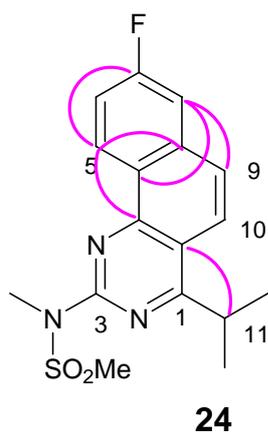


Figura 36

sedici segnali nell'esperimento DEPT compaiono tre metili, e sei metini (Tabella 7). Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR ha mostrato cinque protoni aromatici, un metino e tre metili. (Tabella 7). Le correlazioni tra protoni e carboni direttamente legati sono state ottenute dallo spettro HSQC. Nell'esperimento

HMBC il protone H-5 ( $\delta$  9.15) correla con i carboni C-7 ( $\delta$  162.6), C-4a ( $\delta$  151.0), e C-8a ( $\delta$  137.0) mentre il protone H-8 ( $\delta$  7.52) correla con i carboni C-9 ( $\delta$  125.4), C-5a ( $\delta$  129.7), e C-7 e il protone H-11 ( $\delta$  3.92) con i carboni C-1a ( $\delta$  126.9) e C-1 ( $\delta$  175.8). Le correlazioni riscontrate sono tutte consistenti con la struttura **24** ipotizzata (figura 36).

### 2.3.2 Prove meccanicistiche

Per avere informazioni di tipo meccanicistico sono state condotte una serie di prove impiegando come sorgente luminosa una lampada UV (filtro pyrex) allo scopo di accorciare i tempi di reazione.

E' stato verificato che quando la rosuvastatina è irradiata in queste condizioni in una provetta di pyrex aperta, la trasformazione è completa dopo solo otto ore e porta agli stessi prodotti osservati al sole.

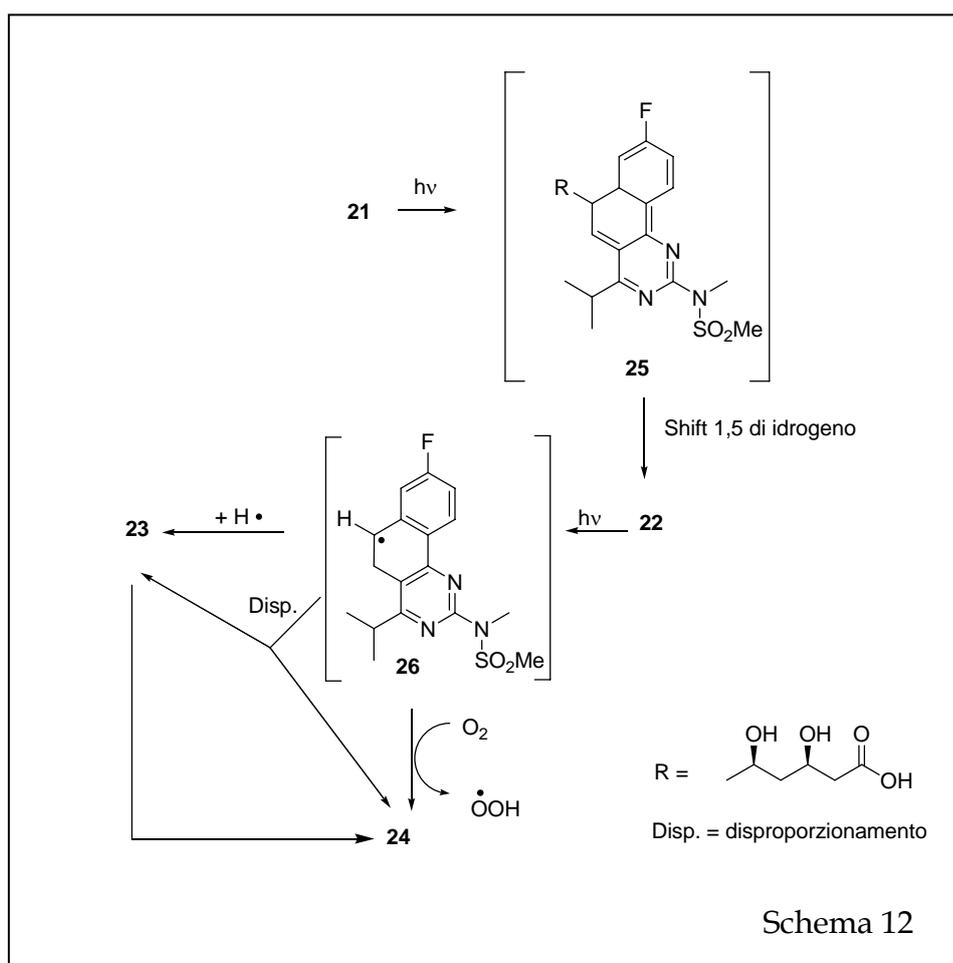
La stessa irradiazione alla lampada UV è stata eseguita in atmosfera di argon. Anche in questo caso il prodotto di partenza è assente dopo otto ore; tuttavia l'analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR mostra solo la formazione dei composti **22** e **23**.

Una soluzione ( $10^{-5}$  M) del composto **22** è stata esposta alla luce solare per tre giorni al fine di valutarne la fotostabilità. L'analisi della miscela di irradiazione ha mostrato che la miscela diastereoisomerica **22** è instabile fotochimicamente e si trasforma per dare una miscela dei fotoprodotto **23** e **24**.

### 2.3.3 Ipotesi meccanicistica

La principale trasformazione fotoindotta è la ciclizzazione del farmaco per dare la miscela diastereoisomerica dei fotoprodotto **22**. I composti **23** e **24** sono invece prodotti con processi secondari che avvengono a carico del fotoprodotto **22**, come mostrato dalle prove di fotostabilità di quest'ultimo.

Un'ipotesi meccanicistica è riportata nello schema 12. La rosuvastatina **21** presenta caratteristiche strutturali analoghe a quelle degli *o*-vinilbifenili che ciclizzano facilmente secondo un processo elettrociclico seguito da shift di idrogeno per dare prodotti diidrofenantrenici (Mallory, F. B., *et al*, 1998). Pertanto, verosimilmente, in seguito alla stimolazione luminosa il farmaco produce l'intermedio **25** non ritrovato in soluzione il quale riarrangia attraverso uno shift 1,5 di idrogeno nel composto **22**.



Secondo l'ipotesi formulata i composti **23** e **24** sono ottenuti in seguito alla scissione fotoindotta del legame C6-C7 con perdita della catena laterale a sette atomi di carbonio e formazione del radicale benzilico **26** stabilizzato per risonanza. Dal radicale benzilico, per estrazione di idrogeno da parte del frammento radicalico di catena o da altre specie presenti in soluzione, si genera il diidroderivato **23**.

Alternativamente sebbene in misura minore lo stesso radicale può disproporzionare formando contemporaneamente **23** e **24** (Albini, A. *et al.*, 2004; Mizuno, K., *et al.*, 1994). In condizioni aerobiche, l'ossigeno può fungere da accettore di idrogeno favorendo di gran lunga la benzochinazolina **24**; una via alternativa per la formazione del fotoprodotto **24** è rappresentata dalla fotoossidazione di **23**.

## 2.4 Statine a confronto

In conclusione è stato studiato il comportamento fotochimico in acqua di tre statine disponibili in commercio, atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina. I tre farmaci sono prodotti relativamente nuovi, interamente di sintesi e utilizzati in terapie a lungo termine; per uno solo dei tre sono disponibili in letteratura dati analitici sul ritrovamento nell'ambiente.

Le strutture chimiche differiscono sostanzialmente da composto a composto pur essendo accomunate dalla presenza di un sistema eterociclico azotato e da una catena laterale ossidrilata; presentano cromofori in grado di assorbire radiazione nello spettro solare e reagire per fotolisi diretta in soluzione o in dispersione per formare miscele di fotoprodotto.

Per ogni farmaco in esame sono state proposte delle ipotesi meccanicistiche che spiegano le modalità di trasformazione nei fotoprodotto che sono stati isolati e caratterizzati; in alcuni casi sono state effettuate delle indagini di tipo fotofisico per valutare l'attendibilità delle ipotesi suggerite sulla base di esperimenti allo stato stazionario.

Alla luce degli studi condotti risulta interessante esaminare il comportamento delle tre statine a confronto.

In ciascun caso è fondamentale nel processo fotochimico la reazione di elettrocicizzazione che avviene a carico di un sistema di tipo stilbenico per l'atorvastatina, e di sistemi analoghi a vinilbifenili per gli altri due farmaci, a seguire si può osservare lo *shift* 1,5 sigmatropico di idrogeno o reazioni con l'ossigeno che portano a derivati con diverso grado di ossidazione. Questo comporta la formazione di molecole policicliche aromatiche (fenantreni, benzocarbazoli, benzochinazoline) più fotostabili della molecola di partenza.

Sia nel caso dell'atorvastatina che nel caso della fluvastatina la presenza di un anello pirrolico (o indolico) rende la molecola suscettibile alle reazioni di fotoossigenazione con formazione di prodotti di mono- o diossigenazione. Le prove meccanicistiche e le analisi di tipo fotofisico condotte fanno supporre la generazione della specie ossigeno singoletto in soluzione mediante un

sensibilizzatore tripletto che può identificarsi con il farmaco stesso e/o con uno dei fotoprodotti policiclici aromatici.

### 3 Amlodipina

L'amlodipina appartiene alla classe di farmaci antipertensivi: la sua funzione consiste nell'influenzare la regolazione dei canali del calcio (Arrowsmith, J. E. *et al.*, 1986). Si trova in commercio sotto forma di amlodipina besilato con il nome Norvasc® e si presenta come una polvere cristallina bianca poco solubile in acqua e in metanolo (figura 37).

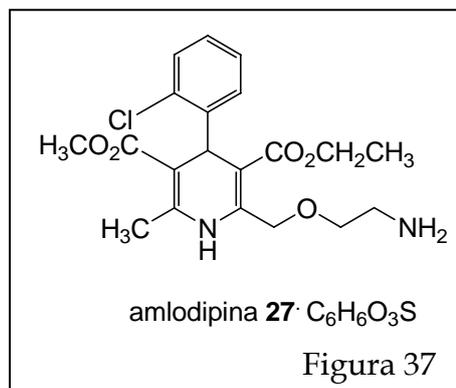
Al momento è uno dei farmaci più venduti al mondo e si trova al terzo posto della rxlist per l'anno 2006. Il metabolismo dell'amlodipina ha luogo nel fegato, solo il 10% della dose orale è escreto come composto di partenza. (**rx-list**).

L'amlodipina in realtà non è presente sul mercato solo come Norvasc®, negli ultimi anni è stato messo in commercio un farmaco con il nome Caduet® nel quale sono combinati i principi attivi dell'amlodipina, antipertensivo, e dell'atorvastatina, inibitore della sintesi del colesterolo, entrambi utilizzati nel trattamento dei disturbi cardiaci.

Strutturalmente l'amlodipina appartiene alla classe delle 4-fenildiidropiridine di cui è molto nota la capacità antiossidante; questo tipo di molecole è ampiamente usata nel trattamento dei disturbi cardiaci. La struttura delle 4-fenildiidropiridine comporta la presenza di due sistemi  $\pi$  indipendenti, separati da un atomo di carbonio ibridato  $sp^3$ .

La classe delle 4-fenildiidropiridine presenta spiccata fotolabilità e in letteratura è possibile trovare molti lavori in cui si riportano problemi legati alla fotolabilità relativamente al processo di sintesi di farmaci a struttura simile (A.L. Zanocco *et al.*, 1992).

L'amlodipina presenta nello spettro UV una banda con un massimo a 366 nm, la fotolabilità del farmaco è riportata in letteratura e crea alcuni problemi sia in



fase di produzione che nelle determinazioni analitiche della molecola (Ragno G. et al., 2002).

Il comportamento fotochimico dell'amlodipina è stato valutato in condizioni mimiche di quelle ambientali esponendo al sole il composto in acqua MilliQ tal quale e a differenti pH, è stata inoltre studiata l'influenza di acidi umici e nitrati in soluzione.

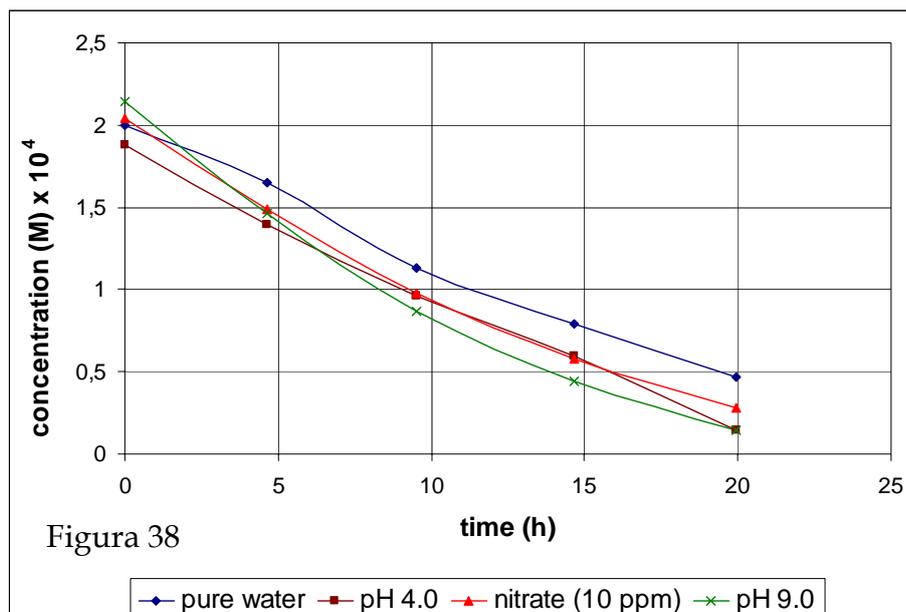
I nitrati assorbono luce ( $\lambda_{\max}$  302 nm) e sono in grado di produrre in acqua specie radicaliche particolarmente reattive quali OH radicalico (Zepp, R. G. et al., 1987). Gli acidi umici derivano da processi di degradazione della lignina ed hanno elevato grado di acidità e aromaticità (Zepp, R. G. et al., 1985). Assorbono nella stessa regione dei nitrati e sono in grado di dare reazioni a trasferimento di energia e di produrre ossigeno singoletto. Pertanto questi fotosensibilizzatori naturali, attraverso la formazione di specie radicaliche reattive o reazioni a trasferimento di energia, possono accelerare le trasformazioni fotoindotte di composti organici che risulterebbero stabili alla fotolisi diretta in acqua pura. Inoltre gli acidi umici sono in grado di adsorbire molecole di varia natura attraverso diversi meccanismi come scambio ionico, legame idrogeno, forze di Van der Waals. L'adsorbimento dei composti organici da parte degli acidi umici ne comporta una modifica della solubilità, del comportamento degradativo e quindi della persistenza nell'ambiente.

### *3.1 Irradiazione*

In primo luogo il farmaco è stato conservato in soluzione al buio al fine di valutare eventuali processi non fotochimici. Le soluzioni di amlodipina sono state preparate in acqua pura e a differenti pH nel range ambientale; controlli fino a trenta giorni su TLC e mediante analisi  $^1\text{H}$ NMR dimostrano che il farmaco rimane invariato in queste condizioni.

Successivamente una soluzione di amlodipina in acqua ( $10^{-4}$  M) è stata esposta direttamente alla luce solare, utilizzando PNAP-PYR (p-nitroacetofenone-piridina) come attinometro è stato calcolato una resa quantica di  $2.2 \times 10^{-4}$  e un tempo di dimezzamento di 0.42 giorni. Il comportamento fotochimico del

farmaco in acqua è stato analizzato in diverse condizioni utilizzando la stessa concentrazione  $10^{-4}$  M, variando la sorgente di radiazione (lampada UV, filtro pyrex), in ambiente aerobico o anaerobico, valutando l'effetto del pH e la presenza di sostanze normalmente presenti nell'ambiente quali acidi umici e nitrati.



In figura 48 è riportato l'abbattimento del farmaco quando esposto alla luce del sole in soluzione acquosa, a pH 4 e a pH 9 e in presenza di nitrati (dieci equivalenti) monitorato mediante variazione di assorbanza a  $\lambda$  366 nm. Il tempo di dimezzamento risulta di circa dieci ore; in condizioni basiche e in presenza di nitrati si rileva una leggera accelerazione della cinetica di conversione (figura 38). L'effetto degli acidi umici non può essere analizzato cineticamente in queste modalità poiché l'assorbimento degli acidi umici cade nello stesso range di lunghezze d'onda dell'amlodipina. In ogni caso analisi condotte mediante <sup>1</sup>H NMR su una soluzione del farmaco in presenza di 40 ppm di acidi umici mostra completa trasformazione dopo venti ore di esposizione al sole.

Sia l'analisi TLC che gli spettri NMR di tutte le miscele di irradiazione analizzate mostrano la presenza di un unico prodotto isolato e caratterizzato come derivato di tipo piridinico **28** (figura 39).

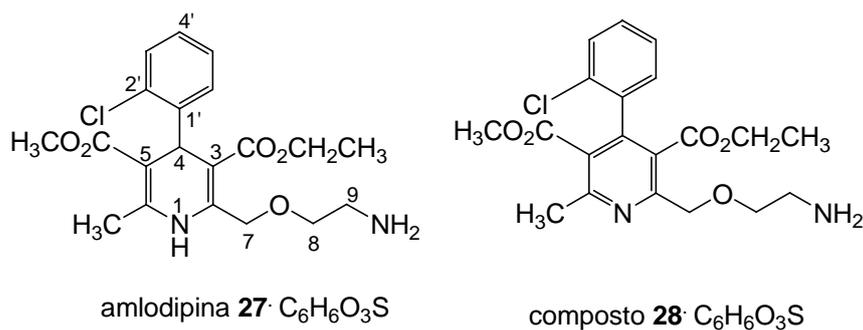


Figura 39

Il composto **28** mostra un picco molecolare a  $m/z$  406  $[M_{\text{drug}} - 2H]^+$  nello spettro EI-MS; nello spettro NMR risulta rilevante per l'identificazione del prodotto l'assenza dei segnali del protone ( $\delta_{\text{H}}$  5.40) e del carbonio ( $\delta_{\text{C}}$  38.8) del gruppo CH in posizione 4 a causa dell'aromatizzazione dell'anello eterociclico.

Nella parte alifatica dello spettro sono presenti il tripletto a  $\delta$  0.92 e il quartetto a  $\delta$  4.0 del gruppo etossicarbonile, i tre segnali relativi ai protoni metilenici H-7, H-8 e H-9, il singoletto deschermato a  $\delta$  2.6 del metile legato in posizione 6 e il singoletto a  $\delta$  3.5 del gruppo metossi carbonile. La regione aromatica, invece, presenta i due doppietti e i due tripletti del gruppo clorofenile.

Nello spettro <sup>13</sup>C NMR si notano l'assenza dei segnali a  $\delta$  38.8 relativo al CH in posizione 4 e dei segnali tra 99 e 110 ppm presenti invece nella zona di risonanza tra 130 e 155 ppm, confermando dunque la natura aromatica del fotoprodotto. L'assegnazione dei chemical shift ai carboni della molecola è stata effettuata sulla base di esperimenti HSQC ed HMBC.

A conferma nello spettro UV non si rileva la banda della funzione diidropiridinica ( $\lambda$  max 366 nm). Allo scopo di avere informazioni meccanicistiche la resa quantica dell'amlodipina è stata calcolata in acqua e in acetonitrile, in presenza e in assenza di ossigeno, e i risultati sono riportati in tabella 8.

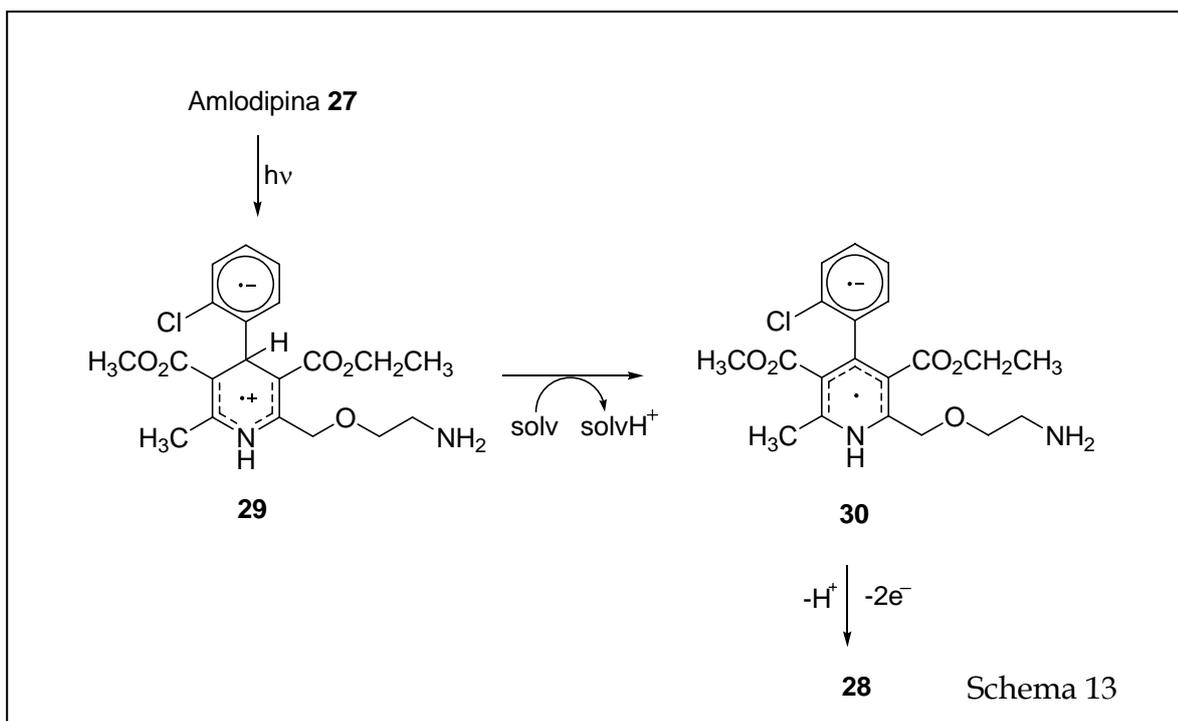
Tabella 8 Resa quantica di fotolisi diretta dell'amlodipina

Conditions	$\Phi$	$t_{1/2}$ (day)
H <sub>2</sub> O (air)	$2.2 \times 10^{-4}$	0.42
H <sub>2</sub> O (Ar)	$1.7 \times 10^{-4}$	0.56
CH <sub>3</sub> CN (air)	$6.1 \times 10^{-5}$	2.3
CH <sub>3</sub> CN (Ar)	$6.7 \times 10^{-5}$	2.1

Come si può osservare, la resa quantica non varia significativamente se le misure sono effettuate in presenza o in assenza di ossigeno mentre dipende dalla natura del solvente impiegato ed è un ordine di grandezza in meno nel solvente organico ( $\Phi_{\text{water}} 2.2 \times 10^{-4}$  contro  $\Phi_{\text{MeCN}} 6.1 \times 10^{-5}$ ). Anche in questi casi le analisi sia TLC che NMR confermano la trasformazione del farmaco nel solo composto **28**.

### 3.2 Meccanismo

L'aromatizzazione dell'anello diidropiridinico è l'unica reazione fotochimica osservata. In accordo con quanto riportato in letteratura (Shibuya, J. *et al.*, 1988) l'ossigeno non influenza apprezzabilmente la trasformazione del farmaco, e infatti il composto **28** è formato con uguale velocità anche quando l'irradiazione avviene in atmosfera di argon. Si rileva invece un rallentamento della cinetica di conversione dell'amlodipina nel derivato **28** quando la reazione è condotta in acetonitrile piuttosto che in acqua, indicando una possibile partecipazione da parte del solvente.



In accordo con i dati riportati da Albini per analoghi di tipo 4-aril-1,4-diidropiridine (Fasani, E. *et al.*, 2006) il meccanismo ipotizzato è mostrato nello schema 13: si verifica un trasferimento elettronico intramolecolare fotoindotto che genera il diradiale zwitterionico **29**, il ruolo del solvente è quello di allontanare il protone promuovendo la formazione dell'anione **30** che subisce quindi ossidazione per formare il prodotto finale **28**.

La cinetica è favorita in solventi con caratteristiche basiche e, quindi procede più velocemente in solventi quali l'acqua che in acetonitrile.

Il meccanismo suggerito permette di razionalizzare alcune osservazioni sperimentali (schema 13): la trasformazione del substrato favorita a pH 9 è dovuta alla completa disponibilità della coppia di elettroni sull'azoto mentre le proprietà ossidanti dei nitrati (Zepp, R. G. *et al.*, 1987) e la capacità degli acidi umici di agire da sensibilizzatori (Zepp, R. G., *et al.* 1985) giustificano l'accelerazione della cinetica di conversione in presenza di queste sostanze.

L'amlodipina subisce facilmente aromatizzazione fotoindotta per formare il derivato piridinico **28** isolato e caratterizzato; la conversione è particolarmente favorita in mezzo acquoso. Sono stati calcolati e confrontati le rese quantiche in

acqua e in acetonitrile ed è stato possibile osservare l'azione di fotosensibilizzatori naturali quali acidi umici e nitrati che, secondo meccanismi che non sono ancora del tutto chiari, partecipano alla fotolisi del farmaco e aumentano la velocità della reazione.

Sul farmaco tal quale e sul fotoprodotto **28** sono stati condotti alcuni esperimenti di tossicità acuta e cronica su organismi acquatici presso il laboratorio della Prof. M. Isidori del Dipartimento di Scienze della Vita, Seconda Università di Napoli. Secondo gli studi effettuati il derivato **28** mostra più alta tossicità cronica sull'organismo *Ceriodaphnia dubia* rispetto all'amlodipina.

#### 4. Tadalafil

Il tadalafil è il principio attivo di un farmaco in commercio con il nome di Cialis® (figura 40). Appartiene alla famiglia degli inibitori dell'enzima fosfodiesterasi di tipo 5, insieme al sildenafil (Viagra®) e al vardenafil (Levitra®) è utilizzato nel trattamento delle disfunzioni erettili.

Il farmaco ha avuto l'approvazione nel 2003 negli Stati Uniti dall'organismo deputato alla commercializzazione dei farmaci, il *Food and Drug Administration* e da allora è disponibile in commercio; rispetto al più noto sildenafil che presenta un'emivita di 4 ore, il tadalafil ha un'azione più duratura con un'emivita di 17,5 ore.

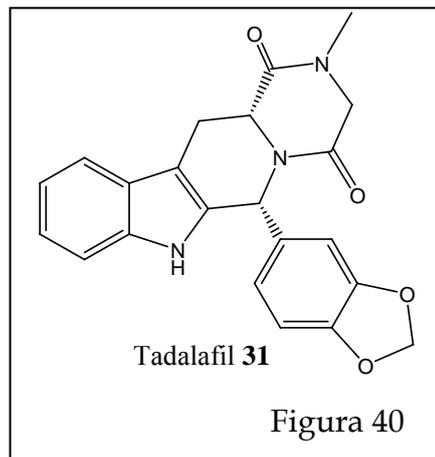
Il tadalafil, sebbene ben pubblicizzato, non ha ancora raggiunto i livelli di vendita del sildenafil che vanta il trentaduesimo posto nella lista dei farmaci più venduti negli USA mentre il Cialis® è al settantaquattresimo.

Il tadalafil è in commercio solo da pochi anni e al meglio delle nostre conoscenze non sono disponibili dati di letteratura che riportino il ritrovamento di questo farmaco in acque superficiali, né studi sul comportamento fotochimico di questa molecola.

##### 4.1. Esperimenti di irradiazione

Il tadalafil si presenta sotto forma di polvere bianca, altamente insolubile in acqua ma solubile in acetonitrile e in solventi organici meno polari come il cloroformio.

Inizialmente per valutare il comportamento in soluzione del tadalafil sono state preparate delle soluzioni in acetonitrile/acqua in rapporto 1 : 1, dove il composto risulta perfettamente solubile.

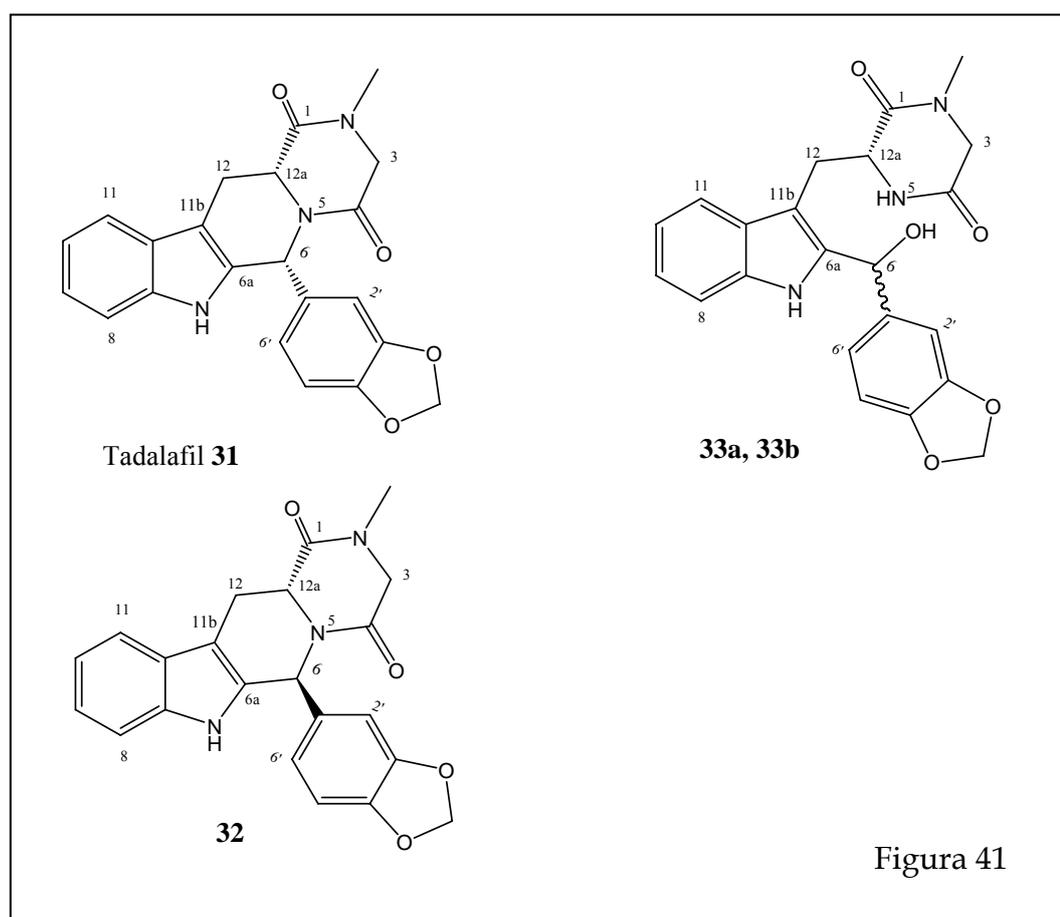


Soluzioni  $10^{-4}$  M di tadalafil in acetonitrile/acqua MilliQ e a pH 3 e 9 sono state conservate al buio per 4 giorni; l'analisi TLC ed NMR delle soluzioni ha mostrato che il farmaco rimane stabile.

Un primo esperimento d'irradiazione è stato condotto con lampade che emettono radiazione nello spettro UVA, il farmaco è stato recuperato tal quale dopo un'esposizione di 4 h in provette di quarzo.

In secondo luogo il tadalafil è stato irradiato con lampade che emettono luce UVB, in queste condizioni il composto in soluzione appare trasformarsi rapidamente. Le analisi TLC e  $^1\text{H}$  NMR sono state effettuate a diversi intervalli di tempo (30, 60, 120 e 240 minuti) e mostrano che già dopo 30 minuti di irradiazione sono visibili su TLC tre fotoprodotto in quantità paragonabili alla molecola di partenza.

Se l'esposizione alla radiazione UVB viene prolungata fino a due ore si rileva un quasi completo abbattimento dei composti in soluzione.



La separazione dei fotoprodotti ottenuti in queste condizioni (figura 41) è stata effettuata prima della conversione completa del farmaco prevalentemente mediante HPLC usando una colonna C-18 con fase mobile in gradiente.

#### 4.2 Caratterizzazione dei fotoprodotti

La struttura dei fotoprodotti isolati è stata determinata impiegando tecniche di spettroscopia NMR e di spettrometria di massa.

Il composto **32** è un isomero di **31**, mostra nello spettro di massa ESI-MS il picco dello ione molecolare a  $m/z$  390  $[M + H]^+$  che suggerisce la formula molecolare  $C_{22}H_{19}N_3O_4$ .

**Tabella 9** Dati NMR del composto **32** in  $CDCl_3$

Posizione	$\delta_H^a$	NOESY	$\delta_C$	HMBC <sup>b</sup>
1			165.4 (q)	
2 (N)				
3	4.12 d, 4.00 d		51.4 (s)	4, 1, Me
4			161.5 (q)	
5 (N)				
6	6.97 s		51.8 (t)	4, 1', 6', 12a
6a			129.7 (q)	
7 (NH)	7.87 s	6, 8		7a, 1', 11a/b
7a			136.3 (q)	
8	7.29 d		111.1 (t)	11a
9	7.20 t		120.1 (t)	11
10	7.19 t		122.8 (t)	8, 11a
11	7.54 d	12 ( $\delta$ 3.52)	118.4 (t)	7a, 11b
11a			128.2 (q)	
11b			109.1 (q)	
12	3.52 dd 2.92 dd	11	27.6 (s)	6a, 11a, 11b
12a	4.33 dd	6', 12 ( $\delta$ 3.52)	52.4 (t)	1, 4, 12
Me	3.01 s		33.4 (p)	1, 3
1'			132.0 (q)	
2'	6.79 s	12 ( $\delta$ 3.52)	108.3 (t)	6, 4', 6'
3'			148.1* (q)	
4'			148.0* (q)	
5'	6.69		109.1 (t)	1', 3',
6'	6.69	12 ( $\delta$ 3.52)	122.5 (t)	2', 6, 4'
CH <sub>2</sub>	5.95 s		101.3 (s)	3', 4'

<sup>a</sup> Valori di chemical shift  $^1H$  ( $\delta$  ppm da  $SiMe_4$ ) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz). <sup>b</sup> Correlazioni HMBC da H a C. <sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT.

Il composto **32**, leggermente meno polare del tadalafil, mostra un pattern di segnali NMR molto simile al farmaco stesso. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (tabella 9) ha mostrato 7 protoni aromatici nella zona 7.54 - 6.79 ppm, un protone direttamente legato ad un azoto, due protoni metinici a  $\delta$  6.97 e 4.33, sei protoni metilenici a  $\delta$  5.95, 4.12 e 4.00, 3.52 e 2.92 e un metile a 3.01.

Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR ha mostrato la presenza di ventidue segnali (tabella 9), di cui secondo l'esperimento DEPT uno è metilico, tre metilenici e nove metinici.

I gruppi funzionali rilevati sulla base dello studio degli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  sono gli stessi del prodotto di partenza (tabella 10). Sulla base dell'esperimento HSQC i protoni osservati sono stati attribuiti ai corrispondenti carboni.

**Tabella 10** Dati NMR del Tadalafil in  $\text{CDCl}_3$

Posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	NOESY	$\delta_{\text{C}}$
1			166.8 (q)
2(N)			
3	4.11 d, 3.94d		52.1 (s)
4			166.3 (q)
5 (N)			
6	6.15 s	12a, 1 (NH)	56.7 (t)
6a			135.3 (q)
7(NH)	7.90 s	10	
7a			136.5 (q)
8	7.27 d		111.1 (t)
9	7.16 t		120.1 (t)
10	7.18 t		122.5 (t)
11	7.61 d	12 ( $\delta$ 3.79)	118.6 (t)
11a			126.2 (q)
11b			106.5 (q)
12	3.79 dd 3.22 dd	2', 6' ( $\delta$ 3.22)	23.8 (s)
12a	4.31 dd		56.1 (t)
Me	3.05 s		33.6 (p)
1'			132.7 (q)
2'	6.73 d	13 ( $\delta$ 3.22)	107.4 (t)
3'			147.8 (q)
4'			147.1 (q)
5'	6.69 dd		108.2 (t)
6'	6.85 d	13 (d 3.22)	120.7 (t)
$\text{CH}_2$	5.88 d		101.1 (s)

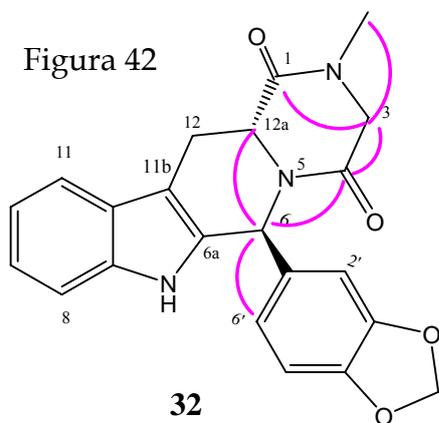
<sup>a</sup> Valori di chemical shift  $^1\text{H}$  ( $\delta$  ppm da  $\text{SiMe}_4$ ) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz).

<sup>b</sup> Correlazioni HMBC da H a C.

<sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT.

Lo spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ha rivelato le correlazioni del protone H-12a con i due protoni metilenici H-12 in analogia con il composto di partenza (tabella 10) Il protone H-6 metinico in posizione benzilica ha mostrato shift a campi bassi rispetto al farmaco **31**. I restanti sistemi di spin risultano uguali a quelli osservati per il prodotto di partenza.

Dall'esperimento HMBC è stato possibile osservare le correlazioni del protone H-6 con i carboni C-12a, C6', C1' e C-4 che indicano che lo scheletro carbonioso rimane invariato. Gli spettri NOESY a confronto del farmaco **31** e del composto



**32** indicano che il prodotto isolato è l'epimero in posizione 6 del tadalafil (figura 42). Mentre nello spettro NOESY del tadalafil sono visibili le correlazioni spaziali del protone H-6 a  $\delta$  4.31 con il protone H-12a a  $\delta$  6.15, nel fotoprodotto **32** lo stesso protone H-12a correla con il protone H-6'. Le restanti correlazioni HMBC e NOESY sono riportate

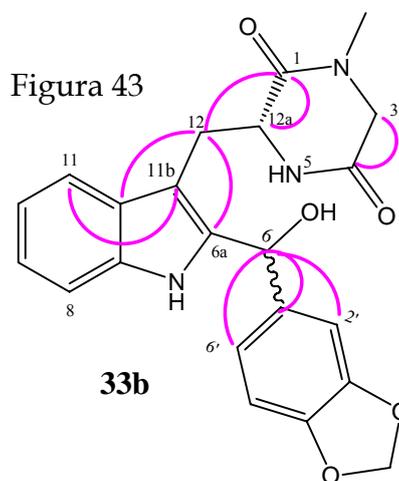
nelle tabelle 9 e 10.

I composti **33a** e **33b** sono chiaramente degli isomeri come si evince dalla stretta somiglianza dei dati spettrali.

L'isomero **33a** mostra nello spettro di massa ESI-MS i picchi a  $m/z$  390  $[\text{M} - \text{OH}]^+$ ,  $m/z$  413  $[\text{M} - \text{OH} + \text{Na}]^+$ ,  $m/z$  430  $[\text{M} + \text{Na}]^+$   $m/z$  446  $[\text{M} + \text{K}]^+$ .

Lo spettro MALDI, oltre i picchi osservati nello spettro ESI-MS, mostra un picco a  $m/z$  837  $[\text{M}_2 + \text{Na}]^+$ . Tutti questi dati sono consistenti con una formula molecolare  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ .

L'isomero **33a** presenta polarità maggiore del composto di partenza. Nello spettro  $^1\text{H}$  NMR sono presenti 21 protoni, tre protoni legati ad eteroatomi a  $\delta$  9.81, 7.40 e 4.96, sette segnali nella zona aromatica 7.51-6.76 ppm, due protoni metinici a  $\delta$  6.08 e 4.23, sei protoni



metilenici a  $\delta$  5.95, 3.55 e 3.12, 3.41 e 3.34 e un metile a  $\delta$  2.76 (tabella 11). Lo spettro  $^{13}\text{C}$  ha mostrato la presenza di ventidue segnali indicando che tutti i carboni del farmaco **31** sono presenti in questa struttura, l'unica variazione significativa è associata allo shift del segnale del carbonio in posizione 6 da  $\delta$  56.7 nel tadalafil a 67.4 nel composto **33a**. Nello spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY sono visibili le correlazioni dei protoni H-3 tra di loro, dei due protoni H-12 con il protone a H-12a, dello stesso H-12a con il protone scambiabile H-7 a  $\delta$  7.40 e del protone a  $\delta$  4.96 con il protone H-6. Dallo spettro HMBC sono visibili le correlazioni di H-12 con il carbonio C-6a, C-12a, C-11a e con C-1, dei protoni H-3 con il carbonio carbonilico C-4, e dei protoni del metile sull'azoto con il carbonio carbonilico C-1 (figura 43).

**Tabella 11** Dati NMR del composto **33a** in  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Posizione	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	NOESY	$\delta_{\text{C}}$	HMBC <sup>b</sup>
1			166.6 (q)	
2 (N)				
3	3.55 d, 3.12 d		50.9 (s)	4
4			165.0 (q)	
5 (N)	7.40 br s	12, 12a		
6	6.08 s	12	67.4 (t)	
6a			139.5 (q)	
7 (NH)	9.81			
7a			135.8 (q)	
8	7.31 d	1', o 6' (?)	111.1 (t)	10, 11a
9	7.04*	6	121.4 (t)	
10	6.97*		119.7 (t)	
11	7.51 d	10, 12, 12a	118.9 <sup>#</sup> (t)	7a, 9, 11b
11a			128.3 (q)	
11b			105.7 (q)	
12	3.41 dd 3.34 dd		30.0 (s)	1, 6a, 11a, 11b, 12a
12a	4.23 dd		56.3 (t)	
Me	2.76 s		32.7 (p)	1, 3
1'			137.1 (q)	
2'	6.98* s		107.0 (t)	
3'			147.6* (q)	
4'			146.7* (q)	
5'	6.76 d		107.6 (t)	1', 3' o 4'
6'	6.96*		118.8 (t)	
CH <sub>2</sub>	5.95 s		101.0 (s)	3' o 4'
OH	4.96			

<sup>a</sup> Valori di chemical shift  $^1\text{H}$  ( $\delta$  ppm da  $\text{SiMe}_4$ ) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz). <sup>b</sup> Correlazioni HMBC da H a C. <sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT.

Sulla base dei dati sperimentali raccolti la struttura ipotizzata per il composto **33** è quella riportata in figura 43, in cui si è avuta la scissione del legame C-N e l'aggiunta formale di una molecola di acqua.

I dati spettrali del composto **33b** sono molto simili a quelli del composto **33a**: sono presenti i medesimi sistemi di spin e lo spettro protonico mostra i due segnali a  $\delta$  7.81 e a  $\delta$  4.66 assegnati al protone H-7 legato all'azoto e al protone legato ad un ossigeno ossidrilico. L'unica differenza significativa è lo shift di uno dei due protoni H-3 a campi alti. Nell'HMBC il protone legato all'ossidrile correla con il carbonio C-1' a  $\delta$  137.1. I dati NMR sono riportati in tabella 12.

Inoltre l'isomero **33b** mostra nello spettro di massa ESI-MS i picchi a  $m/z$  390 [M - OH]<sup>+</sup>,  $m/z$  413 [M - OH + Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  430 [M + Na]<sup>+</sup>  $m/z$  446 [M + K]<sup>+</sup>.

**Tabella 12** Dati NMR del composto **33b** in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

Posizione	$\delta_H^a$	NOESY	$\delta_C$	HMBC <sup>b</sup>
1			167.2 (q)	
2 (N)				
3	3.36 d, 2.17 d	12	51.3 (s)	4, Me
4			169.7 (q)	
5 (N)	7.81	12a, 6		
6	6.15 d		68.2 (t)	1', 6', 2'
6a			140.5 (q)	
7 (NH)	10.08 s	7		
7a			136.4 (q)	
8	7.34 d		111.0 (t)	10, 11a
9	7.06 t		121.7 (t)	11, 7a
10	6.98 t		118.8 <sup>#</sup> (t)	8, 11a
11	7.42 d	10, 12	119.0 <sup>#</sup> (t)	7a, 11b, 9
11a			127.7 (q)	
11b			104.5 (q)	
12	3.49 dd 3.32 dd		29.8 (s)	1, 6a, 11a, 12a, 11b
12a	4.33 dd		57.1 (t)	1,
Me	2.41 s		33.3 (p)	1, 3
1'			137.1 (q)	
2'	6.94 d		106.4 (t)	6', 1', 3', 4'
3'			147.6 <sup>*</sup> (q)	
4'			146.6 <sup>*</sup> (q)	1', 2'
5'	6.72 d		107.6 (t)	2', 3', 4'
6'	6.83 dd		119.1 <sup>#</sup> (t)	6, 4', 2'
CH <sub>2</sub>	5.92 s		100.9 (s)	
OH	4.66			

<sup>a</sup> Valori di chemical shift <sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm da SiMe<sub>4</sub>) seguiti da molteplicità e costanti di accoppiamento (J in Hz). <sup>b</sup> Correlazioni HMBC da H a C. <sup>c</sup> Le lettere, p, s, t e q, indicate in parentesi, identificano i carboni primari, secondari, terziari e quaternari assegnati in base al DEPT.

Lo spettro MALDI, oltre i picchi osservati nello spettro ESI-MS, mostra un picco a  $m/z$  837  $[M_2 + Na]^+$ . Tutti questi dati sono consistenti con una formula molecolare  $C_{22}H_{21}N_3O_5$ .

Il composto **33a** e il composto **33b** sono epimeri in posizione 6.

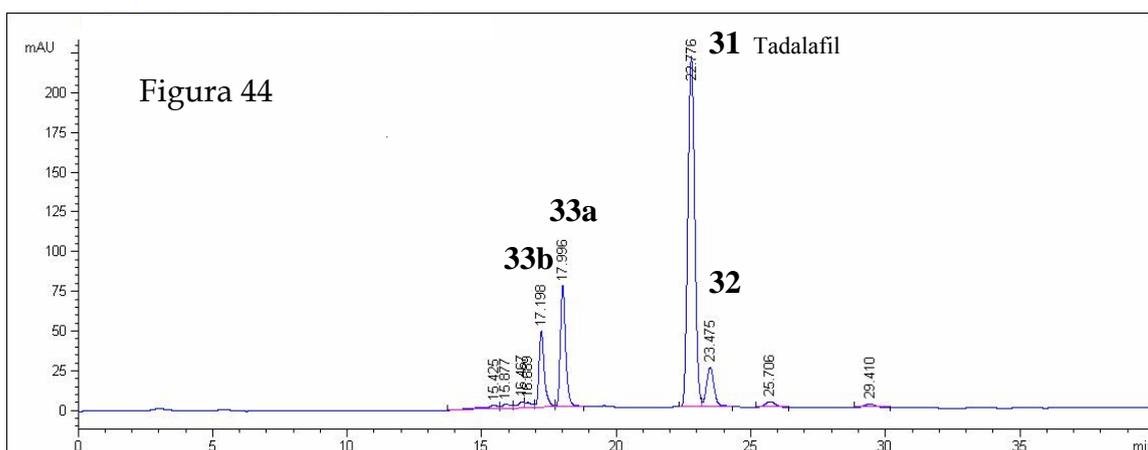
Alla luce dei risultati sperimentali ottenuti dall'irradiazione del tadalafil in soluzione acqua/acetonitrile la principale trasformazione sembra coinvolgere il legame tra il carbonio benzilico C-6 e l'azoto ammidico 5.

Per ottenere maggiori informazioni sul meccanismo della reazione sono stati condotti esperimenti in diverse condizioni.

#### 4.3 Prove meccanicistiche

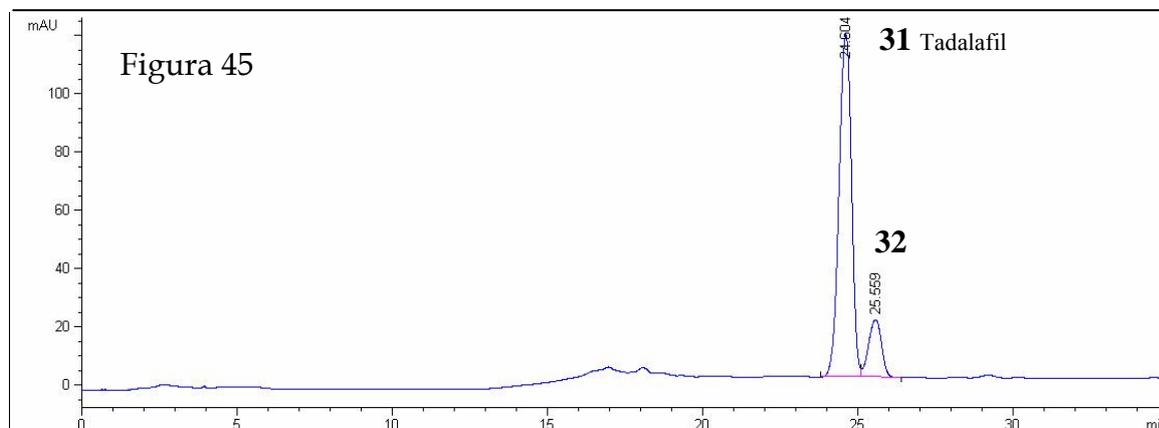
L'irradiazione della soluzione del farmaco, in acqua/acetonitrile (1 : 1), è stata seguita parallelamente in aria e saturando la soluzione con argon e con ossigeno. I fotoprodotti osservati sono gli stessi e la cinetica di reazione non sembra variare significativamente.

In figura 44 è mostrato il cromatogramma HPLC del tadalafil dopo 20 minuti di irradiazione UVB in acqua/acetonitrile.



Quando l'irradiazione è effettuata sciogliendo il farmaco in solo acetonitrile (soluzione  $10^{-4}$  M), in atmosfera di aria, argon ed ossigeno rispettivamente, per 1 h con luce UVB, nelle tre soluzioni si rileva, oltre alla presenza del tadalafil, la formazione del solo composto **32**.

In figura 45 è mostrato il cromatogramma HPLC del tadalafil dopo 20 minuti di irradiazione in solo acetonitrile.



L'irradiazione è stata quindi effettuata sciogliendo il tadalafil in acetonitrile/metanolo in rapporto 1:1, in questo caso l'analisi NMR mostra, dopo un'ora di esposizione a radiazione UVB, il farmaco tal quale, il composto **32** e due prodotti differenti da quelli ottenuti in acetonitrile/acqua (1 : 1); il confronto degli spettri  $^1\text{H}$  NMR dei due composti con i dati spettrali dei composti **32**, **33a**, **33b** suggerisce l'apertura del legame C-N e l'ingresso di un metossile in posizione 6.

Esperimenti di irradiazione del tadalafil sono stati condotti in solo acetonitrile in presenza di BHA, un inibitore radicalico, di DABCO e di DMB rispettivamente, saturando le soluzioni con argon, in tutti i casi la reazione di epimerizzazione procede ugualmente: si rileva la presenza del prodotto di partenza e del composto **32** dopo un'ora di irradiazione UVB.

Una soluzione  $10^{-4}\text{M}$  di tadalafil è stata irradiata con luce UVA in presenza di un noto iniziatore radicalico, il di-*tert*-butilperossido. Dopo quattro ore di esposizione il residuo analizzato ha mostrato che il farmaco non subisce trasformazione in queste condizioni.

Gli esperimenti effettuati hanno portato ad escludere che la formazione dei fotoprodotti osservati coinvolga meccanismi radicalici.

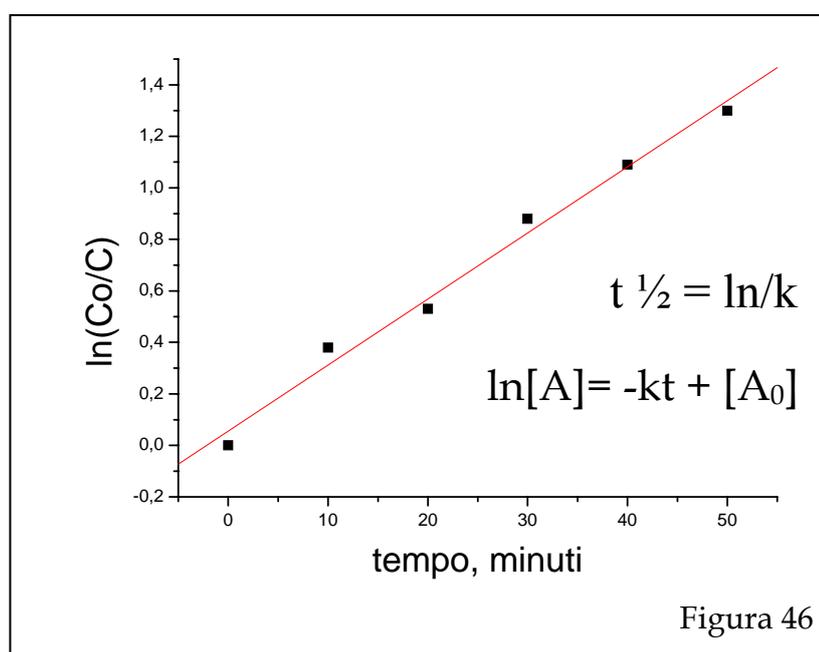
Alcune prove sono state condotte sciogliendo il farmaco in acqua/acetonitrile a pH acido e basico (pH 3 per HCl e pH 11 per KOH). Il tadalafil è

completamente degradato se sottoposto a radiazione UVB per un'ora a pH 3: in queste condizioni si ottiene una miscela complessa di prodotti polari e non si isola nessuno dei fotoprodotti precedentemente osservati.

La prova a pH 3 è stata ripetuta a tempi più brevi per verificare che la degradazione del prodotto di partenza passasse per i derivati isolati in soluzione acquosa neutra; dopo un'irradiazione di 15 minuti a pH 3 sono presenti tutti i prodotti mostrati in figura 41 per cui l'abbassamento del pH comporta una cinetica di degradazione più rapida.

A pH 11 non si notano apprezzabili variazioni: è stata rilevata la presenza di tutti e 3 i prodotti di trasformazione isolati a pH neutro.

La cinetica di degradazione fotochimica del tadalafil è stata studiata in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN irradiando con lampade UVB (figura 46). La cinetica procede con un andamento del primo ordine. Il tempo di dimezzamento calcolato in queste condizioni è di 27 minuti.



Riassumendo è stato osservato che il comportamento del tadalafil non varia in presenza o in assenza di ossigeno né è influenzato dalla presenza di radicali. L'unico parametro che influenza la trasformazione fotochimica del tadalafil è il

solvente. Infatti, quando l'irradiazione è effettuata in solo acetonitrile si osserva unicamente il prodotto di epimerizzazione, mentre la presenza di acqua o metanolo porta alla formazione di prodotti di apertura.

Le evidenze sperimentali raccolte suggeriscono che il tadalafil, nelle condizioni di irradiazione utilizzate, subisce fotoisomerizzazione e fotosolvolisi per dare i fotoprodotto **32-33**.

Secondo diversi studi riportati in letteratura la frammentazione fotochimica del legame  $\sigma$  in posizione  $\beta$  ad un anello aromatico è un fenomeno piuttosto comune quando in posizione benzilica siano legati dei sostituenti tipo gruppi fosfato, ammonio, gruppi ossidrilici o gruppi esterei (Hilborn J. W. *et al.*, 1994).

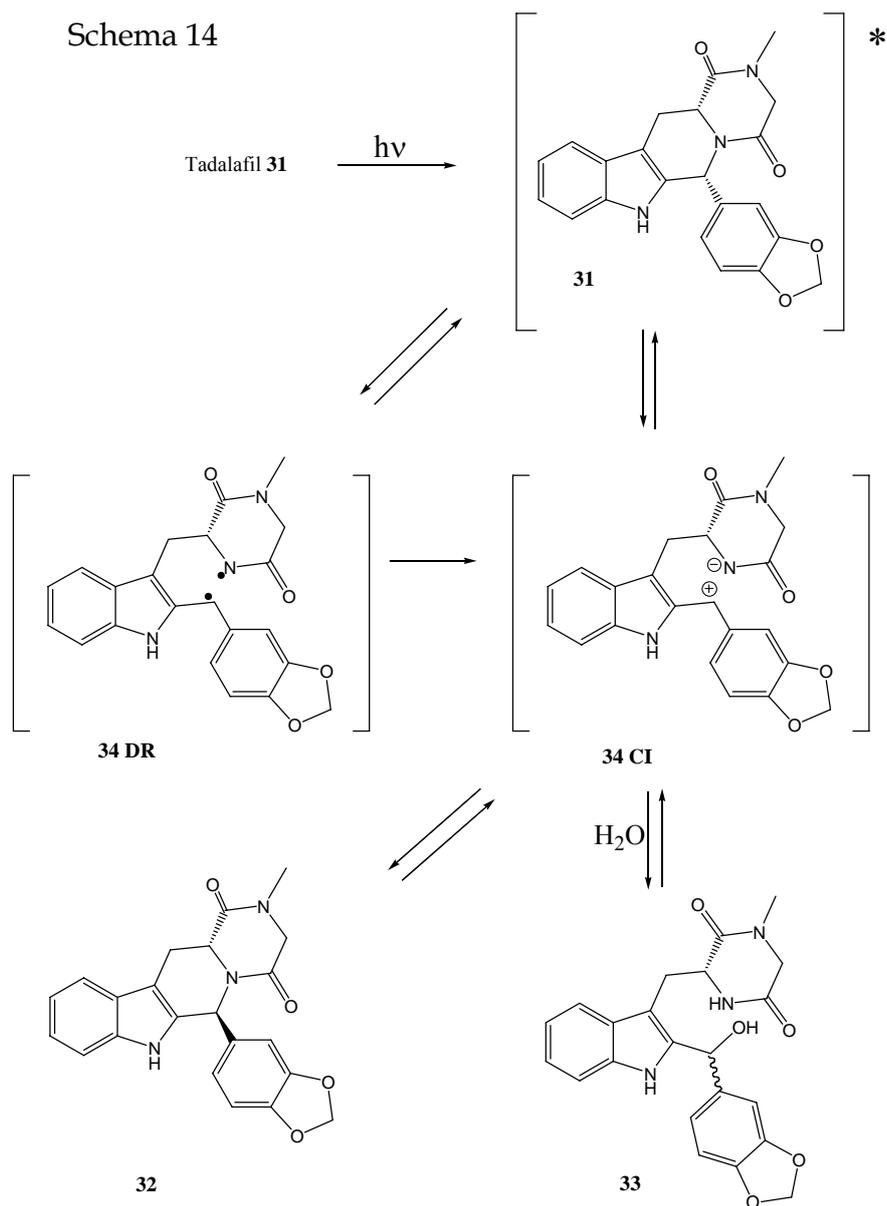
Il processo prende il nome di fotosolvolisi se conducendo la reazione in solventi nucleofili si osserva sostituzione alla posizione benzilica da parte di una molecola di solvente.

La frammentazione del legame  $\sigma$  può avvenire sia per via radicalica che per via ionica, studi più approfonditi hanno mostrato che la rottura eterolitica nello stato eccitato è spesso un processo minoritario anche in solventi nucleofili. La formazione della coppia ionica (CI) avviene prevalentemente a causa di un processo di electron-transfer a carico della coppia radicalica (DR) generata dalla scissione omolitica nello stato eccitato. Fattori quali la polarità del solvente, il tipo di gruppo uscente e i sostituenti presenti sull'anello aromatico possono influenzare la competizione esistente tra gli intermedi coppia ionica e coppia radicalica (Hilborn J. W. *Et al.*, 1994; Pincock J. A. , 1997).

Nel caso in esame la scissione del legame può essere vista come processo eterolitico diretto o, più probabilmente, come scissione omolitica seguita da rapido electron-transfer per fornire l'intermedio coppia ionica sul quale avviene l'attacco del solvente nucleofilo acqua o metanolo a seconda del caso.

La scissione in  $\beta$  all'anello aromatico coinvolge un azoto ammidico a testa di ponte tra due anelli condensati e la sostituzione da parte dell'acqua avviene al carbonio benzilico C(6) con un meccanismo tipo  $S_N1$ .

Schema 14



In conclusione, lo studio del comportamento fotochimico del tadalafil in soluzione evidenzia che il farmaco si presenta estremamente reattivo nelle condizioni descritte. Né il tadalafil né i fotoprodotti osservati mostrano indizi di persistenza ambientale.

## 5 Conclusioni

Le indagini svolte sui farmaci atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, amlodipina e tadalafil hanno evidenziato la loro notevole suscettibilità alla luce anche in condizioni ambientali. I prodotti di trasformazione sono stati isolati e caratterizzati e i meccanismi di formazione indagati. La presenza nei farmaci di strutture di tipo o-vinilbifeniliche o cis-stilbeniche determina la formazione di composti policiclici che in condizioni ossidanti, come sono quelle ambientali, facilmente aromatizzano. Sono stati infatti isolati derivati appartenenti alla classe fenantrene, benzocarbazolo, benzochinazolo. Composti policiclici aromatici sono notoriamente a potenziale attività biologica; a questo proposito ad esempio alcuni derivati benzochinazolinici sono stati recentemente classificati come erbicidi che agiscono come perossidanti con un enzima cruciale nella biosintesi della clorofilla (Sumida M. *et al.*, 1996).

Altro aspetto interessante messo in luce è la formazione di specie ossigenate attive (ossigeno singoletto da sistemi indolici o composti policiclici aromatici, radicali OOH da didropiridine) il che pone il rischio di fotosensibilizzazioni indotte dai farmaci stessi o dai fotoprodotto. La fotosensibilizzazione è un argomento di crescente interesse che riguarda effetti tossici evidenziati principalmente in nuovi farmaci (Lhiaubet-Vallet *et al.*, 2007; Lhiaubet-Vallet *et al.*, 2003; Encinas *et al.*, 1998).

Nell'ottica quindi di un'opportuna valutazione ambientale, in base ai risultati ottenuti, si conferma che il mancato ritrovamento di uno xenobiotico nell'ambiente non rappresenta la fine del problema e l'attenzione dovrebbe essere rivolta anche ai prodotti di trasformazione. Parallelamente ad indagini analitiche, appare opportuno condurre anche esami tossicologici ed ecotossicologici. La formazione di composti policiclici aromatici ed eteroaromatici che oltre ad essere notoriamente bioattivi hanno mostrato una notevole persistenza può giustificare la preoccupazione riguardo il diffondersi di xenobiotici nell'ambiente dimostrando che le trasformazioni ambientali sia biotiche che abiotiche svolgono effetti non trascurabili. Secondo gli studi effettuati ad esempio il fotoderivato dell'amlodipina di struttura piridinica ha

mostrato una più alta tossicità cronica sull'organismo *Ceriodaphnia dubia* rispetto al farmaco. Verosimilmente il calcolo del rischio dei farmaci dovrebbe differenziarsi da quello di altri prodotti industriali generalmente limitato ad alcuni test standard. Le sostanze mediche, per loro natura, sono biologicamente attive e hanno una varietà di modi specifici d'azione. Pertanto dovrebbero essere investigati altri endpoints qual ad es. effetti mutageni e includerli nell'assessment del rischio ambientale perché composti che non presentano tossicità possono essere mutageni (Isidori, M. et al., 2006).

Oltre alle evidenti informazioni di interesse ambientale, l'altro aspetto interessante di questo lavoro di tesi è rappresentato dagli studi meccanicistici. Infatti, lo studio dell'interazione dei farmaci esaminati con la luce ha evidenziato la straordinaria versatilità delle reazioni fotochimiche evidentemente dovute alla complessità delle strutture che presentano diverse funzionalità. Gli studi meccanicistici hanno fornito ulteriori contributi alle conoscenze di processi fotochimici già noti, ma hanno anche evidenziato nuove vie fotoindotte che potrebbero rappresentare un punto di partenza per ulteriori studi nell'ambito della letteratura delle trasformazioni fotochimiche: ad esempio, la fotoossigenazione di pirroli a lattami, la formazione di spirocomposti ossigenati da indoli, la scissione di legami C-N di benzilammidi.

## 6. Parte Sperimentale

### 6.1 Generale

Gli esperimenti di fluorescenza, di fluorescenza *time resolved*, di *laser flash photolysis* e di rilevazione di ossigeno singoletto sono stati condotti presso i laboratori de "Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC; Universidad Politécnica de Valencia" sotto la guida del Prof. Miguel Angel Miranda e della Dott. Virginie Lhiaubet-Vallet.

*Spettroscopia NMR*: Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) sono stati registrati 500 MHz per [ $^1\text{H}$ ] e 125 MHz per [ $^{13}\text{C}$ ] su uno spettrometro NMR Varian 500 Unity Inova a trasformata di Fourier, e a 400 MHz per [ $^1\text{H}$ ] e 100 MHz per [ $^{13}\text{C}$ ] su uno spettrometro Bruker AC 400. La molteplicità di spin è stata evidenziata con esperimenti DEPT. L'accoppiamento protonico è stato rilevato con esperimenti  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Le correlazioni di chemical shift eteronucleare sono state determinate con sequenze pulsate HMQC e HMBC.

Le prossimità  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  all'interno di una molecola sono state messe in evidenza da esperimenti NOESY.

*Spettrometria di massa*: Gli spettri MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) sono stati registrati su uno spettrometro di massa Voyager DE MALDI-TOF, mentre gli spettri electrospray su uno spettrometro di massa WATERS Z-Q dotati di una camera di ionizzazione electrospray operante in modalità positiva o negativa con range di scansione 80-2000 m/z. Gli spettri EI-MS (Electron- Impact Ass Spectra) sono stati ottenuti operando a 70 eV su un GC-MS QP-5050a Shimadzu.

*Spettroscopia UV-vis*: Gli spettri UV-vis sono stati registrati su uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 7 o Varian Cary 100.

*Spettroscopia IR*: Per gli spettri IR è stato usato uno spettrofotometro Nicolet 5700 FT-IR, nel caso dell'amlodipina è stato usato uno spettrofotometro Jasco FT/IR-430.

*HPLC*: Gli esperimenti HPLC sono stati condotti su un apparecchio Agilent 1100, il sistema HPLC è dotato di un sistema di rilevazione UV.

Gli esperimenti HPLC-MS sono stati condotti su un apparecchio Agilent 1100 equipaggiato con una pompa quaternaria G1311A e un rivelatore di massa ESI modello G1946C.

*Cromatografia:* La cromatografia liquida a fase inversa è stata effettuata su una resina Lichroprep RP-18 della Merck. Le TLC analitiche sono state eseguite su fogli di alluminio prerivestiti della Merck (DC-Alufolien Kielselgel 60 F254, 0.2 mm) o su fogli RP-18 F254 di 0.2 mm di spessore. Per la rivelazione delle macchie è stata usata una lampada UV o una miscela H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/AcOH/H<sub>2</sub>O (1 : 20 : 4) seguita da riscaldamento in stufa a 110 °C per qualche minuto. Le TLC analitiche sono state effettuate su Merck Kiesegel 60 F<sub>254</sub> da 0.5 o 1 mm di spessore

*Fotoreattori e lampade:* Per l'irradiazione nello spettro UV è stato utilizzato un fotoreattore Helios Italquartz dotato di una lampada ad alta pressione di mercurio a 500 W attraverso un filtro di vetro pyrex.

Le irradiazioni nel range UVA sono state effettuate mediante l'impiego di un fotoreattore equipaggiato con 12 lampade (Osram Sylvania, F15T8/BLB) che emettono da 310 a 410 nm con output massimo a circa (1 mW/cm<sup>2</sup>) 360 nm.

*Laser Flash Photolysis:* Per l'eccitazione a 308 nm è stata utilizzata una sorgente laser ad impulsi (eccimero con miscela Xe/HCl/Ne), con durata di ogni impulso singolo ~17 ns ed energia < 100 mJ/impulso. Come rivelatore è stato utilizzata una lampada allo xeno Lo255 Oriel. Il sistema per la laser flash photolysis consisteva del laser ad impulsi, la lampada allo xeno, un monocromatore 77200 Oriel, un sistema fotomoltiplicatore Oriel (PMT) (77348 side-on PMT tube, 70680 PMT housing, 70705 PMT power supply).

L'oscilloscopio utilizzato è un TDS-640A Tektronix. Il segnale in uscita dall'oscilloscopio si trasferisce ad un personal computer.

Per l'eccitazione a 266 nm è stata utilizzata la 4<sup>th</sup> armonica ( $\lambda_{exc} = 266$  nm) di un sistema laser di tipo Quantel pulsed Nd:YAG per il quale la durata di ogni singolo impulso è di ca. 10 ns, e l'energia ca. 15 mJ/pulse. Come rivelatore è stata impiegata una lampada allo Xeno. Il sistema per la laser flash photolysis consisteva del laser ad impulsi, la lampada allo xeno, un monocromatore 77200

Oriel, un sistema fotomoltiplicatore Oriel (PMT) (77348 side-on PMT tube, 70680 PMT housing, 70705 PMT power supply).

L'oscilloscopio utilizzato è un TDS-640A Tektronix. Il segnale in uscita dall'oscilloscopio si trasferisce ad un personal computer.

*Fluorescenza:* Gli esperimenti di fluorescenza allo stato stazionario sono stati condotti con uno spettrofluorometro Photon Technology International (PTI) LPS-220B. I tempi di vita di fluorescenza sono stati misurati con uno spettrofluorimetro "time-resolved" (Time Master fluorescence lifetime spectrometer TM-2/2003). Come sorgente di eccitazione è stata utilizzata una lampada flash idrogeno/azoto. Il fitting dei decadimenti cinetici è stato effettuato con funzioni monoesponenziale utilizzando una procedura di deconvoluzione per separare la traccia dall'impulso della lampada.

*Rilevazione ossigeno singoletto:* Il rilevatore raffreddato a N<sub>2</sub> liquido (North Coast EO 817P) è costituito da diodi a Germanio con un filtro a interferenza a 1275 nm (hbw 40 nm). I segnali sono registrati con un "transient digitizer" (Gould 4072) e trasferiti ad un PC per l'analisi dei dati.

## **6.2. Atorvastatina**

### *6.2.1 Materiali*

Atorvastatin calcium è stato ottenuto da KEMPROTEC limited. Rosa bengala (Aldrich), NaN<sub>3</sub> (Carlo Erba). Le soluzioni e le sospensioni di Atorvastatina sono state preparate utilizzando acqua Milli Q. Tutti gli altri solventi impiegati sono di grado di purezza HPLC.

### *6.2.2 Esperimenti di irradiazione*

Gli esperimenti di irradiazione sono stati condotti con un simulatore solare Oriel a 150 W dotato di una lampada allo Xeno (output spettrale 200-2400 nm) su sospensioni di atorvastatin calcium (40 mg) in acqua Milli Q (500 ml), o su soluzioni 10 µM, in beaker di vetro Pyrex per 14 giorni a temperatura ambiente.

Preparazioni analoghe di atorvastatin calcium sono state esposte direttamente alla luce solare per 14 giorni (in settembre a Napoli) in beaker di Vetro Pyrex aperte. Allo scopo di ottenere alcune informazioni meccanicistiche ulteriori esperimenti sono stati condotti impiegando un fotoreattore equipaggiato con una lampada ad alta pressione di mercurio a 500 W (impiegando un filtro Pyrex).

In una procedura generica una sospensione di atorvastatin calcium (10 mg in 20 ml di acqua) è stata irradiata in presenza di un sensibilizzatore (rapporto molare atorvastatin : sensibilizzatore = 1 : 10 se non diversamente indicato) in una provetta di vetro pyrex aperto, tenuta sotto agitazione ad una distanza di 15 cm dalla lampada.

$\text{NaN}_3$  è stato usato in un rapporto molare 1 : 3 con il farmaco.

Nell'esperimento condotto in atmosfera di argon, la sospensione è stata saturata con il gas gorgogliando per 30 minuti e sigillando la provetta.

### *6.2.3 Isolamento dei fotoprodotti*

Dopo 14 giorni di irradiazione al simulatore solare la sospensione è stata portata a secco sotto vuoto e la miscela ottenuta (40 mg, solubile in acetone) è stata separata su TLC preparativa con fase stazionaria di silice eluendo con la fase organica della miscela AcOEt/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (3 : 1 : 5) per fornire 5 frazioni. La frazione 2 e la frazione 4 contengono i fotoprodotti puri **2** (11 mg) e **3** (4 mg) mentre le frazioni **1**, **3**, e **5** erano miscele di diversi prodotti.

La frazione **3** (8 mg) è stata cromatografata su TLC (gel di silice) eluendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  per ottenere il fotoprodotto **4** (4 mg) e la miscela diastereoisomerica di fotoprodotti **5** in piccole quantità.

Per riuscire ad avere quantità maggiori di questi prodotti, una sospensione di atorvastatina (40 mg) è stata esposta al sole per 14 giorni. La miscela di irradiazione è stata portata a secco sotto vuoto e cromatografata su una resina C-18 in colonna aperta eluendo con  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1), sono state ottenute 4 frazioni (A, B, C e D). La frazione D è stata identificata come miscela diastereoisomerica dei fotoprodotti **5** (8 mg). Per ottenere la separazione dei

due prodotti diastereoisomerici la miscela di irradiazione è stata sottoposta a procedura di metilazione con diazometano in eccesso in soluzione di etere (resa quantitativa). La miscela dei due prodotti metilati è stata separata per HPLC su una colonna Luna Prep C-18, 10 $\mu$ m, 250 x 10 mm, eluendo con CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1 : 1).

#### 6.2.4 Reazione con dimetildiossirano

Per l'ottenimento di una soluzione di DMD (~0.5-0.12 M) in acetone è stata seguita la procedura riportata in letteratura (Singh, M. *et al.*, 1992), 5 ml di questa soluzione sono stati aggiunti ad una soluzione di atorvastatin calcium (5 mg) in acetone (10 ml) sotto agitazione. La miscela di reazione è stata portata a secco sotto vuoto e analizzata mediante <sup>1</sup>H NMR. Lo studio NMR ha evidenziato la formazione dei fotoprodotti **3** e **4**.

#### 6.2.5 Dati spettrali

Atorvastatina (**1**): UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 206 (log  $\epsilon$  7.0);  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 2964, 1723, 1658, 1607 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z (%): 597 (12), 581 (25), 559 (85), 415 (100);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.55–6.98 (14H), 4.18 (2H, m, H-7a and H-3), 3.93 (1H, m, H-7b), 3.67 (1H, m, H-5), 3.40 (1H, m, H-14), 2.36 (1H, dd, J 10.2, 4.8 Hz, H-2a), 2.26 (1H, dd, J 10.2, 2.4 Hz, H-2), 1.70 (2H, m, H-6), 1.60 (1H, m, H-4), 1.50 (6H, d, J 7.2 Hz, H-15, H-16), 1.41 (1H, m, H-4);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 181.5, 170.0, 164.5, 140.5, 139.8, 137.5, 135.5, 131.5, 130.6, 130.1, 129.4, 128.3, 126.6, 124.0, 122.0, 119.8, 117.2, 117.0, 69.6, 45.5, 44.7, 42.5, 42.0, 28.1, 23.3.

Composto **2**: Olio incolore; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 203 (log  $\epsilon$  11.9);  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 3040, 2920, 2854, 1712, 1602, 1097 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z (%): 613 (15), 597 (20), 575 (100);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.40–7.00 (14H), 4.17 (1H, m, H-3), 3.76 (3H, m, H-5, H-7), 3.27 (1H, m, H-14), 2.40 (2H, m, H-2), 1.85 (2H, m, H-6), 1.66 (2H, m, H-4), 1.45 (6H, d, J 6.5 Hz, H-15, H-16);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 181.4 (C-9), 176.8 (C-1), 166.2 (C-13), 164.0 (C-4'''), 153.4 (C-12), 141.3 (C-1000), 139.3 (C-10), 132.4 (C-

100), 130.7, 130.2, 129.5, 126.2, 122.1, 119.3 (C-11), 116.7, 116.6, 68.7 (C-5), 68.3 (C-3), 66.6 (C-10), 45.0 (C-4), 43.9 (C-2), 39.6 (C-7), 37.7 (C-6), 28.5 (C-14), 21.4, 21.2 (C-15, C-16).

Composto **3**: Polvere bianca amorfa; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 204 (log  $\epsilon$  12.5);  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 2957, 2924, 2855, 1714, 1712, 1600, 1364, 1088 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z (%): 613 (10), 597 (25), 575 (100);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.53 (2H, d, J 8.0 Hz), 7.36 (4H, m), 7.12 (8H, m), 4.02 (1H, m, H-3), 3.79 (1H, m, H-7a), 3.72 (1H, m, H-5), 3.56 (1H, m, H-7b), 2.67 (1H, m, H-14), 2.38 (2H, m, H-2), 1.48–1.68 (4H, m, H-4, H-6), 1.18 (3H, d, J 6.8 Hz, H-15), 0.92 (3H, d, J 6.8 Hz, H-16);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 178.2 (C-12), 175.8 (C-1), 168.6 (C-13), 164.0 (C-4'''), 140.4 (C-9), 135.3, 134.0, 132.0, 131.9, 130.3, 129.6, 128.8, 128.2, 126.4, 123.4, 120.0, 117.4, 117.2, 69.9 (C-11), 69.6 (C-5), 68.6 (C-3), 45.0 (C-4), 44.1 (C-2), 39.9 (C-7), 36.2 (C-6), 33.5 (C-14), 18.8 (C-15), 17.9 (C-16).

Composto **4**: Polvere bianca amorfa; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 202 (log  $\epsilon$  0.42).  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 2925, 2854, 1730, 1700, 1605, 1428, 1236, 1157, 1074 cm<sup>-1</sup>; MALDI-MS m/z (%): 579 (30), 556 (100);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.50–7.24 (6H, m), 7.16 (8H, m), 4.52 (1H, m, H-5), 4.16 (1H, m, H-3), 3.79 (1H, m, H-7a), 3.56 (1H, m, H-7b), 2.78 (1H, m, H-14), 2.59 (1H, dd, J 3.9, 17.6 Hz, H-2a), 2.42 (1H, dd, J 17.6 Hz, H-2a), 1.85 (2H, m, H-6), 1.77 (2H, m, H-4), 1.16 (3H, d, J 7.0 Hz, H-15), 0.95 (3H, d, J 7.0 Hz, H-16);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 178.2 (C-12, C-13), 172.5 (C-1), 162.5 (C-4'''), 143.7 (C-9), 138.0, 135.1, 134.5, 134.1, 132.2, 130.3, 130.1, 129.6, 128.8, 126.6, 123.8, 122.2 (C-10), 117.4, 117.2, 76.1 (C-5), 63.6 (C-3), 39.4 (C-2, C-7), 35.6 (C-6), 33.1 (C-14), 18.8 (C-15), 17.6 (C-16).

Composto **5a-bis**: Olio incolore (un diastereoisomero); UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH): 204, 238, 332;  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 3481, 3334, 3010, 2932, 1717, 1697, 1601, 1450, 1314, 1163 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z (%): 609 (44), 587 (100);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.76 (1H, d, J 9.0 Hz, H-6''), 8.60 (1H, d, J 9.0 Hz, H-3''), 8.51 (1H, dd, J 5.5, 9.5 Hz, H-6'''), 8.45 (1H, dd, J 2.0, 11.5 Hz, H-3'''), 7.69 (1H, t, J 7.0 Hz, H-5''), 7.60 (1H, t, J 7.0 Hz, H-

4''), 7.49 (2H, d, J 8.0 Hz, H-20, H-6'), 7.45 (1H, ddd, J 2.0, 9.5, 11.0 Hz, H-5'''), 7.29 (2H, t, J 8.0 Hz, H-30, H-5'), 7.09 (1H, t, J 8.0 Hz, H-4'), 4.67 (1H, m, H-7a), 4.45 (1H, m, H-7b), 4.20 (1H, m, H-3), 4.02 (1H, m, H-5), 3.42 (1H, m, H-14), 2.44 (2H, m, H-2), 2.15 (1H, m, H-6a), 2.05 (1H, m, H-6b), 1.74 (2H, m, H-4), 1.35 (3H, d, J 6.5 Hz, H-15), 0.66 (3H, d, J 6.5 Hz, H-16);  $\delta_C$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 179.2 (C-12), 173.0 (C-1), 165.5 (C-13), 162.0 (C-4'''), 137.6 (C-10), 137.0 (C-9), 134.7 (C-2''', C-1''), 129.1 (C-3', C-5'), 129.0 (C-3''), 128.0 (C-2', C-6'), 128.6 (C-5''), 127.1 (C-6''), 125.5 (C-6'''), 125.2 (C-4''), 124.9 (C-4'), 123.4 (C-3''), 120.7 (C-2', C-6'), 120.0 (C-1'), 118.2 (C-1'''), 116.1 (C-5'''), 109.5 (C-3'''), 69.3 (C-5), 69.0 (C-3), 66.4 (C-11), 42.0 (C-4), 41.4 (C-2), 40.0 (C-7), 37.2 (C-6), 35.6 (C-14), 18.2 (C-16), 17.7 (C-15).

Composto **5b-bis**: Olio incolore; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 204, 238, 332;  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>) 3481, 3334, 3010, 2932, 1717, 1697, 1601, 1450, 1314, 1163 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS m/z (%): 609 (44), 587 (100);  $\delta_H$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.68 (1H, d, J 8.0 Hz, H-6''), 8.58 (1H, d, J 8.0 Hz, H-3''), 8.49 (1H, dd, J 5.5, 9.5 Hz, H-6'''), 8.46 (1H, dd, J 2.0, 11.0 Hz, H-3'''), 7.67 (1H, t, J 7.5 Hz, H-5''), 7.59 (1H, t, J 7.5 Hz, H-4''), 7.45 (2H, d, J 8.5 Hz, H-20, H-6'), 7.45 (1H, obscured, H-5'''), 7.25 (2H, t, J 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.07 (1H, t, J 8.0 Hz, H-4'), 4.65 (1H, m, H-7a), 4.44 (1H, m, H-7b), 4.32 (1H, m, H-3), 4.18 (1H, m, H-5), 3.42 (1H, m, H-14), 2.48 (2H, m, H-2), 2.08 (2H, m, H-6), 1.68 (2H, m, H-4), 1.38 (3H, d, J 7.0 Hz, H-15), 0.63 (3H, d, J 7.0 Hz, H-16);  $\delta_C$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 177.8 (C-12), 173.6 (C-1), 166.2 (C-13), 162.3 (C-4'''), 137.6 (C-1'), 137.0 (C-9), 134.5 (C-2''', C-1''), 129.0 (C-3', C-5'), 128.8 (C-3''), 128.1 (C-2', C-6', C-5''), 126.5 (C-6'', C-6'''), 125.4 (C-4', C-4''), 124.8 (C-3''), 123.4 (C-2', C-6'), 119.3 (C-1'), 118.2 (C-1'''), 116.1 (C-5'''), 109.5 (C-3'''), 70.5 (C-5), 69.1 (C-3), 52.1 (C-11), 42.4 (C-4), 41.5 (C-2), 40.9 (C-7), 37.6 (C-6), 35.0 (C-14), 18.4 (C-16), 17.5 (C-15).

#### 6.2.6 *Esperimenti di fluorescenza*

Le misure di fluorescenza sono state effettuate su campioni sciolti in metanolo. Tutti gli spettri sono stati registrati in seguito ad eccitazione a 308 nm. Tutti le misure sono state effettuate utilizzando celle di quarzo 10 x 10 mm<sup>2</sup> di capacità di 4 ml. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperature ambiente.

Le misure di quantum yield di fluorescenza e di quenching dell'emissione di fluorescenza sono state effettuate saturando con azoto o ossigeno le soluzioni per 15 minuti prima di registrare lo spettro. L'assorbanza delle soluzioni per le misure di fluorescenza è stata mantenuta nel range 0.1-0.2. Il quantum yield di fluorescenza è stato misurato impiegando come standard naprossene  $\Phi_F=0.53$  (Boscá F. *et al.*, 2001 ) in metanolo.

#### 6.2.7 *Esperimenti di laser flash photolysis*

Tutti gli spettri dei transienti sono stati registrati utilizzando celle di quarzo 10 x 10 mm<sup>2</sup> di capacità di 4 ml, in ogni esperimento è stato fatto passare nella cella un flusso di azoto o di aria prima di acquisire lo spettro. L'assorbanza dei campioni è stata mantenuta nel range 0.30-0.40 alla lunghezza d'onda di eccitazione del laser(308 0 266 nm).

#### 6.2.8 *Rilevazione ossigeno singoletto*

Tutti gli spettri sono stati registrati utilizzando celle di quarzo 10 x 10 mm<sup>2</sup> di capacità di 4 ml. Gli esperimenti di emissione sono stati eseguiti sui campioni in soluzione sature di aria in acetonitrile a temperatura ambiente.

Come riferimento è stato utilizzato fenalenone (perinaftenone) che presenta resa quantica di produzione di ossigeno singoletto pari all'unità in acetonitrile, l'assorbanza dei campioni è stata mantenuta nel range 0.40-0.50 alla lunghezza d'onda di eccitazione del laser (308).

Come quencher è stata impiegata una soluzione di atorvastatina ( $10^{-5}M$ ), il tempo di vita dell'ossigeno singoletto è stato registrato aumentando gradualmente la concentrazione di quencher in soluzione. L'equazione di Stern-Volmer ha permesso di ricavare la  $k_q$  ponendo in grafico la variazione del

tempo di vita della specie con la diversa concentrazione di quencher in soluzione.

### **6.3. Fluvastatina**

#### *6.3.1. Materiali*

Fluvastatin sodium è stato ottenuto dalla KEMPROTEC Limited. Soluzioni e sospensioni del farmaco sono state preparate usando acqua Milli Q. Tutti gli altri solventi impiegati sono di grado HPLC. Blu di metilene e  $\text{NaN}_3$  sono stati ottenuti dalla Aldrich.

#### *6.3.2 Esperimenti di irradiazione*

Sono stati condotti esperimenti al buio su soluzioni del farmaco ( $10^{-4}$  M) in acqua pura e a pH 7 utilizzando acqua tamponata con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Le soluzioni sono state conservate in assenza di luce per 1, 4 e 7 giorni, quindi sono state concentrate e il residuo è stato analizzato mediante TLC e  $^1\text{H}$  NMR.

Soluzioni di fluvastatina in acqua Milli Q (40 mg in 500 ml,  $10^{-4}$  M) sono state esposte alla luce del sole per un giorno in giugno a Napoli in provette di vetro pyrex aperte.

Per valutare la stabilità delle miscele a tempi più lunghi, sono state preparate altre soluzioni di fluvastatina ( $10^{-4}$  M) da esporre alla luce del sole in provette di vetro pyrex aperte a Napoli durante il mese di giugno.

Gli esperimenti di irradiazione operando con la lampada UV ad alta pressione di mercurio sono stati condotti a 1, 2 e 4 h.

Una soluzione del farmaco saturata con argon per 15 minuti è stata irradiata in una provetta di vetro pyrex sigillata alla lampada UV per 2 h.

Una soluzione del farmaco in presenza di 0.3 equivalenti di  $\text{NaN}_3$  è stata irradiata alla lampada UV in una provetta di vetro pyrex aperta per 1, 2 e 4 h.

I composti **2**, **3** e **4** sono stati irradiati in acqua pura (per ciascuno 2mg in 20ml) in provette di vetro pyrex aperte per tempi differenti.

Una soluzione di fluvastatina, dopo aver aggiunto blu di metilene ( $10^{-5}$  M) e gorgogliato ossigeno in provetta per 15 minuti, è stata irradiata con una lampada alogena a 650 W in provetta pyrex sigillata, un analogo esperimento è stato condotto su una soluzione di miscela diastereoisomerica **2**.

### 6.3.3 Separazione fotoprodotti

Soluzioni di fluvastatina in acqua Milli Q (40 mg in 500 ml,  $10^{-4}$  M) sono state esposte alla luce del sole per un giorno in giugno a Napoli in provette di vetro pyrex aperte.

Le miscele di irradiazione sono state portate a secco sotto vuoto e il residuo (40 mg) è stato separato su TLC preparative di gel di silice (1 mm) eluendo con fase mobile  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5) con qualche goccia di AcOH (due corse), è stata ottenuta una frazione A (miscela diastereoisomerica **2**, 15 mg), il fotoprodotto **3** (6mg), il fotoprodotto **4** (9 mg) e la frazione B (14 mg).

La frazione A è stata sottoposta a metilazione con eccesso di diazometano in soluzione di etere. La risultante miscela è stata separata su TLC preparative di gel di silice eluendo con una miscela di toluene/ AcOEt per ottenere gli esteri metilici diastereoisomerici **2a** (6 mg) e **2b** (7 mg) puri.

La frazione b era costituita da una miscela di prodotti polari la cui separazione nei componenti poi è stata ottenuta mediante HPLC a fase inversa su colonna Luna Prep C-18,  $10\mu\text{m}$ ,  $250 \times 10$  mm, con flusso 1.7 ml/min in gradiente. La colonna è stata equilibrata con una miscela di A ( $\text{H}_2\text{O}$  contenente 0.1% di acido acetico) - B (metanolo) 9:1 (v/v) e utilizzando il seguente programma: un primo aumento di di B al 50% in 11 minuti e un secondo aumento a 100% in altri 11 minuti. La lunghezza d'onda del detector è stata fissata a 260 nm. Sono stati ottenuti i composti puri **5a** (2 mg), **5b** (1 mg), **6a** (6 mg) e **6b** (5 mg).

### 6.3.4 Dati spettrali

Fluvastatina (**10**): Polvere bianca; Lo spettro UV è mostrato in figura 33.  $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  3676, 3588, 3300 banda larga, 2972, 1697, 1595, 1502, 1406, 1343. I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Composto **11** (miscela diastereoisomerica 1:1): Uno dei due isomeri, come estere metilico i.e. **11a-bis**: polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm; 313 (log  $\epsilon$  4.1).  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3693, 3604, 3484, 2923, 1726, 1601, 1503, 1459, 1370 cm<sup>-1</sup>; EI-MS *m/z* (%): 425 (15), 393 (18), 278 (67), 236 (100). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono riportati nelle tabelle 1 e 2. L'altro isomero come estere metilico, i.e. **11b-bis**: polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 312 (log  $\epsilon$  4.1).  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3693, 3604, 3484, 2923, 1726, 1601, 1503, 1459, 1370 cm<sup>-1</sup>; EI-MS *m/z* (%): 425 (15), 393 (18), 278 (67), 236 (100). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Composto **12**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 332 (log  $\epsilon$  4.2), 363 (log  $\epsilon$  3.9), 378 (log  $\epsilon$  3.9);  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3688, 3608, 2932, 2402, 1726, 1605, 1468, 1370 cm<sup>-1</sup>; EI-MS *m/z* (%): 409 (5), 391 (58), 373 (38), 236 (100). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Composto **13**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 332 (log  $\epsilon$  4.3), 359 (log  $\epsilon$  3.9), 379 (log  $\epsilon$  3.9);  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3693, 2932, 2861, 1722, 1624, 1615, 1526, 1463, 1365 cm<sup>-1</sup>; EI-MS *m/z* (%): 277 (97), 262 (100), 235 (90);  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.80 (1 H, dd, *J* 9.5, 5.5 Hz, H-5), 8.57 (1 H, d, *J* 7.5 Hz, H-4), 7.82 e 7.81 (2 H, d, *J* 8.0 Hz, H-9 e H-10), 7.70 (1 H, d, *J* 8.5 Hz, H-1), 7.63 (1 H, dd, *J* 8.5, 2.5 Hz, H-8), 7.49 (2 H, m, H-2 e H-6), 7.37 (1 H, t, *J* 7.0 Hz, H-3), 5.21 (1 H, m, H-11), 1.78 (6 H, d, *J* 7.5 Hz, H-12 e H-13),  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 158.9 (C-7), 138.6 (C-1a), 137.2 (C-10a), 129.5 (C-8a), 127.1 (C-5a), 126.0 (C-9), 125.3 (C-5), 124.2 (C-4), 123.7 (C-4a), 122.3 (C-2), 119.7 (C-3 e C-4b), 116.5 (C-6), 113.3 (C-1), 112.7 (C-8), 112.5 (C-8), 111.0 (C-10), 47.1 (C-11), 21.5 (C-12 e C-13).

Composto **14** (miscela di diastereoisomeri 1:1): Pirimo isomero, i.e. **5a**: polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 257 (log  $\epsilon$  3.3).  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3300 (broad), 2940, 2397, 2352, 1636, cm<sup>-1</sup>; EI-MS *m/z* (%): 443 (10), 355 (5), 277 (31), 262 (28). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono riportati in tabella 3. L'altro isomero, i.e. **5b**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm: 257 (log  $\epsilon$  3.3).  $\nu_{\max}$ (CHCl<sub>3</sub>) 3300 (banda larga), 2940,

2397, 2352, 1636,  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$  (%): 443 (10), 355 (5), 277 (31), 262 (28).  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.91 (1 H, dd,  $J$  8.8, 6.8 Hz, H-2'), 7.89 (1 H, d,  $J$  8.0 Hz, H-11), 7.74 e 7.70 (2 H, m, H-12 e H-13), 7.31 (1 H, d,  $J$  7.0 Hz, H-14), 7.26 (1 H, dd,  $J$  10.6, 2.5 Hz, H-5'), 7.14 (1 H, ddd,  $J$  10.6, 8.8, 2.5 Hz, H-3'), 4.24 (1 H, sept,  $J$  6.8 Hz, H-16), 4.03 (1 H, m, H-5), 3.87 (1 H, m, H-3), 2.96 (1 H, q,  $J$  8.8 Hz, H-6), 2.85 e 2.43 (2 H, dd,  $J$  13.7, 7.8, 15.8 Hz, H-7), 2.29 e 2.19 (2 H, m, H-2), 1.30 e 1.21 (2 H, m, H-4), 1.01 e 0.62 (6 H, m, H-17 e H-18);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 198.0 (C-9), 179.1 (C-1), 172.4 (C-8), 164.0 (C-4'), 143.4 (C-10 e C-6'), 135.4 (C-15, C-1' e C-2'), 134.8 (C-13), 133.3 (C-14), 132.4 (C-11), 132.0 (C-12), 116.2 (C-3'), 115.8 (C-5'), 73.9 (C-5), 68.1 (C-3), 49.9 (C-16), 45.3 (C-6), 44.4 (C-2 e C-7), 43.6 (C-4), 21.8 e 20.2 (C-17 e C-18).

Composto **15** (miscela di diastereoisomeri 1:1): Primo isomero, i.e. **15a**. Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 260 ( $\log \epsilon$  3.8).  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 3300 (banda larga), 2936, 2357, 1693, 1599, 1484  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$  (%): 443 (10), 381 (5), 363 (5), 311 (50), 283 (59), 268 (26), 251 (100). I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono riportati in tabella 4. L'altro isomero, i.e. **15b**. Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 260 ( $\log \epsilon$  3.8).  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 3300 (banda larga), 2936, 2357, 1693, 1599, 1484  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$  (%): 443 (10), 381 (5), 363 (5), 311 (50), 283 (59), 268 (26), 251 (100).  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.34 (1 H, t,  $J$  7.5 Hz, H-13), 7.20 (2 H, overlapped, H-14 e H-5'), 7.17 (1 d,  $J$  7.0 Hz, H-11), 7.10 (1 H, t,  $J$  7.5 Hz, H-12), 6.85 (1 dt,  $J$  7.5 e 1.5 Hz, H-3'), 6.53 (1 dd,  $J$  7.5 e 5.5 Hz, H-2'), 4.88 (1 H, d,  $J$  9.3 Hz, H-7), 4.58 (3 H, H-3, H-5 e H-16), 3.85 (1 H, d br, H-6), 2.50 e 2.42 (2 H, m, H-2), 1.94 e 1.88 (2H, m H-4), 1.49 e 1.48 (6 H, d,  $J$  6.8 Hz, H-17 e H-18);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 179.4 (C-1), 178.4 (C-8), 164.0 (C-4'), 147.8 (C-6'), 145.7 (C-15), 139.4 (C-1'), 134.4 (C-10), 130.1 (C-13), 126.6 (C-2'), 125.4 (C-11), 124.3 (C-12), 115.8 (C-3'), 113.6 (C-5'), 83.6 (C-7), 70.2 (C-3 e C-5), 65.6 (C-9), 54.6 (C-6), 41.9 (C-2 e C-4), 20.1 (C-17 e C-18).

### 6.3.5 Esperimenti di fluorescenza

Le misure di fluorescenza sono state effettuate su campioni sciolti in metanolo. Tutti gli spettri sono stati registrati in seguito ad eccitazione a 308 nm. Tutti le

misure sono state effettuate utilizzando celle di quarzo 10 x 10 mm<sup>2</sup> di capacità di 4 ml. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperature ambiente.

Le misure di quantum yield di fluorescenza e di quenching dell'emissione di fluorescenza sono state effettuate saturando con azoto o ossigeno le soluzioni per 15 minuti prima di registrare lo spettro. L'assorbanza delle soluzioni per le misure di fluorescenza è stata mantenuta nel range 0.1-0.2. Il quantum yield di fluorescenza è stato misurato impiegando come standard naprossene  $\Phi_F=0.53$  (Boscá F. *et al.*, 2001) in metanolo.

#### *6.3.6 Esperimenti di laser flash photolysis*

Tutti gli spettri dei transienti sono stati registrati utilizzando celle di quarzo 10 x 10 mm<sup>2</sup> di capacità di 4 ml, in ogni esperimento è stato fatto passare nella cella un flusso di azoto o di aria prima di acquisire lo spettro. L'assorbanza dei campioni è stata mantenuta nel range 0.30-0.40 alla lunghezza d'onda di eccitazione del laser (308 0 266 nm).

### **6.4. Rosuvastatina**

#### *6.4.1 Materiali*

Rosuvastatin calcium è stato ottenuto da KEMPROTEC limited. Le soluzioni e le sospensioni di rosuvastatina sono state preparate utilizzando acqua Milli Q. Tutti gli altri solventi impiegati sono di grado di purezza HPLC.

#### *6.4.2 Esperimenti di irradiazione*

La rosuvastatina presenta bassa solubilità in acqua. Gli esperimenti sono stati condotti al buio su soluzioni (10<sup>-5</sup>M) e su dispersioni (80 ppm) del farmaco in acqua Milli Q e in soluzione tampone a pH 7 utilizzando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Le preparazioni sono state conservate al buio per 1, 4 e 7 giorni, quindi sono state portate a secco sotto vuoto, il residuo disciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è stato filtrato su Millex; le miscele ottenute sono state analizzate su TLC e mediante <sup>1</sup>H NMR.

Le soluzioni di rosuvastatin ( $10^{-5}$  M) in acqua sono state esposte alla luce solare per 4 giorni a Napoli nel mese di Gennaio in beute pyrex aperte.

Altri esperimenti di irradiazione sono stati effettuati con un fotoreattore dotato di una lampada al vapore di mercurio a 500 W (Helios Italquarz), attraverso un filtro pyrex, per 8 ore in provette di vetro pyrex aperte, a temperatura ambiente, sotto agitazione, ad una distanza di 15 cm dalla lampada.

#### 6.4.3 Separazione fotoprodotti

Una dispersione di rosuvastatin calcium (40 mg in 500 ml di acqua) è stata esposta alla luce del sole per 4 giorni, la miscela di irradiazione è stata portata a secco sotto vuoto e separata su TLC di gel di silice eluendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95 : 5) con acido acetico in gocce (due corse) per ottenere tre frazioni principali.

La frazione 1 (5%) era una miscela complessa di prodotti polari in cui risultavano assenti le porzioni aromatiche, la frazione 2 (45%) una miscela diastereoisomerica mentre la frazione 3 (50%) conteneva 2 prodotti apolari.

La separazione della miscela diastereoisomerica **2** è stata eseguita su colonna HPLC RP-18 (Prodigy Prep ODS,  $10\mu\text{m}$ , 250 mm x 10 mm) con  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (0.2%  $\text{HCOOH}$ ) (7 : 3) per ottenere i due diastereoisomeri puri **2a** (6 mg, 15%) e **2b** (7 mg, 17%).

Dalla frazione 3 sono stati ottenuti i due prodotti **3** (12 mg, 30%) e **4** (4 mg, 10%) mediante TLC su gel di silice usando come eluente esano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 : 2) (cinque corse).

#### 6.4.4. Dati spettrali

Rosuvastatina (**21**): Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 240,  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 3688, 3612, 3300, 2971, 1596, 1547, 1378  $\text{cm}^{-1}$ . I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono descritti in tabella 5 e 6.

Composto **22a**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 314 ( $\log \epsilon$  3.8).  $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  3686, 3602, 3056, 2928, 1724, 1612, 1558, 1383  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (come

estere metilico)  $m/z$  (%): 463 (10), 445 (5), 384 (65), 366 (37), 348 (100). I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono descritti in tabella 5 e 6.

Composto **22b**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 312 ( $\log \varepsilon$  3.8).  $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  3686, 3599, 3056, 2928, 1724, 1612, 1558, 1420, 1383  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS (come estere metilico)  $m/z$  (%): 463 (10), 445 (5), 384 (65), 366 (37), 348 (100). I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono descritti in tabella 5 e 6.

Composto **23**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 312 ( $\log \varepsilon$  4.1).  $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  3683, 3056, 2922, 1616, 1555, 1383  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$  (%): 349 (54), 270 (100), 254 (54). I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono descritti in tabella 7.

Composto **24**: Polvere bianca; UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) nm: 357 ( $\log \varepsilon$  4.0).  $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  3686, 3053, 2981, 2922, 1621, 1561, 1511, 1420, 1370, 1261  $\text{cm}^{-1}$ . EI-MS  $m/z$  (%): 347 (68), 332 (50), 268 (100), 253 (55). I dati  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono descritti in tabella 7.

## 6.5 Amlopidipina

### 6.5.1 Materiali

L'amlopidipina besilato è stata ottenuta da KEMPROTEC limited, come standard di grado analitico (90%),  $\text{KNO}_3$  e acidi umici sono stati ottenuti da Aldrich e utilizzati senza ulteriori trattamenti. L'amlopidipina **27** è stata ottenuta sciogliendo il sale in etil acetato e rimuovendo l'anione besilato con NaOH al 10%.

### 6.5.2 Esperimenti di irradiazione

In primo luogo una soluzione di amlopidipina besilato in acqua pura è stata esposta al sole per una settimana, in provetta di vetro pyrex, saturando la soluzione con ossigeno. Il residuo ottenuto dopo aver allontanato il solvente è

stato analizzato su TLC e mediante  $^1\text{H-NMR}$ . Nella miscela di irradiazione sono presenti il farmaco tal quale in tracce e un secondo prodotto in percentuale superiore al 90%, la purificazione di tale fotoprodotto è stata effettuata mediante cromatografia su TLC preparativa eluendo con una miscela di acetato di etile/etanolo/acqua (2/1/4) ed estrazione con una soluzione acquosa di NaOH al 10% e acetato di etile. La fase organica restituisce il derivato **28**, che è stato identificato dai dati osservati negli spettri NMR e di massa.

Lo stesso esperimento è stato condotto sull'amlodipina, evidenze sperimentali dimostrano che la trasformazione del prodotto è uguale a quella ottenuta irradiando amlodipina besilato.

Prove in parallelo sono state condotte su quattro soluzioni di prodotto commerciale in acqua pura, in presenza di nitrati (10 ppm), e a pH 4 e 9 aggiustando il pH rispettivamente con HCl 2M e KOH 2 M. Per ogni soluzione è stato registrato lo spettro UV ad uguali intervalli di tempo ed è stata riportata in grafico la variazione dell'assorbanza a 366 nm; l'analisi NMR e TLC, dopo il completamento della reazione, per ciascuna delle quattro soluzioni conferma la presenza del solo prodotto **2**. Un esperimento analogo è stato effettuato aggiungendo acidi umici commerciali (5 ppm) ad una soluzione di amlodipina besilato  $10^{-4}$  M. Il farmaco è completamente trasformato nel prodotto **28** dopo venti ore di irradiazione.

### 6.5.3 Determinazione del quantum yield

Gli esperimenti che coinvolgono esposizione al sole sono stati condotti a Napoli in estate (40°N-14°E) esponendo il farmaco in provette di vetro pyrex a temperatura ambiente.

L'attinometria è effettuata impiegando una soluzione di PNAP ( $2.0 \times 10^{-5}$  M) e diverse concentrazioni di piridina (D. Dulin *et al.*, 1982) scelte appositamente per aggiustare il quantum yield del PNAP ( $\Phi_{\text{ATT}} = 0.0169$  [piridina]) e modificare la cinetica del PNAP conformemente alla cinetica di degradazione del farmaco in esame (OECD, 2000).

Il decadimento della concentrazione di entrambe le specie osservate, il substrato e il PNAP, prosegue con un andamento di pseudo primo ordine, infatti riportando in grafico i risultati ottenuti durante una singola corsa fotolitica come  $\ln S_t/S_0$  vs.  $\ln[PNAP]_t/[PNAP]_0$  si ottiene una relazione lineare.

$$\ln \frac{S_t}{S_0} = \frac{k_S}{k_{ATT}} \ln \frac{[PNAP]_t}{[PNAP]_0} \quad (1)$$

Fissata la latitudine e la stagione in cui si effettua l'esperimento, le costanti cinetiche misurate,  $k_S$  e  $k_{ATT}$ , dipendono dal quantum yield della reazione ( $\Phi_S$  e  $\Phi_{ATT}$ ) e dall'assorbività molare del substrato e del PNAP.

$$k_S = \Phi_S \sum_{\lambda} (\epsilon_{\lambda} L_{\lambda})_S \quad (2)$$

-

$$k_{ATT} = \Phi_{ATT} \sum_{\lambda} (\epsilon_{\lambda} L_{\lambda})_{ATT} \quad (3)$$

Dove  $\epsilon_{\lambda}$  ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) sono i coefficienti di assorbimento molare alla lunghezza d'onda indicata e  $L_{\lambda}$  è l'irradiazione media al giorno nell'intervallo di lunghezze d'onda centrato alla lunghezza d'onda scelta  $\lambda$  ( $10^{-3} \text{ E cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ).

Il prodotto  $\epsilon_{\lambda} L_{\lambda}$  compare dimensionalmente come giorni<sup>-1</sup>. In letteratura sono riportati valori di  $L_{\lambda}$  e  $\Sigma(\epsilon_{\lambda} L_{\lambda})_{ATT}$  a seconda della stagione e della latitudine (Zepp R. G. *et al.*, 1977, 359-366; EPA, 1996).

Combinando le equazioni 2 e 3 si ottiene:

$$\frac{\Phi_S \sum_{\lambda} (\epsilon_{\lambda} L_{\lambda})_S}{k_S} = \frac{\Phi_{ATT} \sum_{\lambda} (\epsilon_{\lambda} L_{\lambda})_{ATT}}{k_{ATT}} \quad (4)$$

Il quantum yield della reazione per una specie chimica differente in acqua bi-distillata, in seguito ad esposizione alla luce solare, si ottiene riarrangiando opportunamente l'equazione (4):

$$\phi_S = \frac{k_S}{k_{ATT}} \frac{\phi_{ATT} \sum_{\lambda} (\varepsilon_{\lambda} L_{\lambda})_{ATT}}{\sum_{\lambda} (\varepsilon_{\lambda} L_{\lambda})_S} \quad (5)$$

Nel caso in esame i tempi di dimezzamento del farmaco, in estate, sono stati calcolati utilizzando la seguente equazione:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_S} = \frac{\ln 2}{\phi_S \sum_{\lambda} (\varepsilon_{\lambda} L_{\lambda})_S} \quad (6)$$

Il rapporto  $k_S/k_{ATT}$  per l'amlodipina besilato è stato derivato dalle relazioni lineari ottenute mettendo in grafico  $\ln S_t/S_0$  vs.  $\ln[PNAP]_t/[PNAP]_0$ . Questo rapporto è stato utilizzato per calcolare il quantum yield (tabella 8):

$$\Phi_S = 2.2 \times 10^{-4} \text{ con } t_{1/2} = 0.419 \text{ giorni}$$

Soluzioni di amlodipina in acqua in atmosfera di argon, in acetonitrile e in acetonitrile in atmosfera di argon sono state esposte direttamente alla luce del sole ed esaminate come descritto precedentemente per la determinazione dei quantum yield fino ad un grado di conversione del 15-20% per il farmaco. I risultati sono riportati in tabella 8.

#### 6.5.4 Dati spettrali

Amlodipina (**27**): UV (H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  nm: 366 (log  $\varepsilon$  3.78), 239 (log  $\varepsilon$  4.17). IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3410, 3018, 2952, 1689, 1609, 1483 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  ppm: 7.85 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H) e 7.40 (m, 3H) besilato; 7.27 (dd,  $J$  = 7.6, 1.7, 1H, H-3'); 7.18 (dd,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H-6'); 7.06 (dt,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H-5'); 7.00 (dt,  $J$  = 7.6, 1.7 Hz, 1H, H-4'); 5.40 (s, 1H, H-4); 4.68 e 4.56 (2 d,  $J$  = 14.6 Hz, 2H, H-7);

4.01 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 3.65 (m, 2H, H-8); 3.56 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.08 (br s, 2H, H-9); 2.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.17 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 144.0; 134.2 (x 2); 128.8; 128.5 (x 2) besilato; 168.3 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 167.5 ( $\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ); 147.9 (C-6); 147.6 (C-2); 142.3 (C-1'); 134.8 (C-2'); 131.0 (C-3'); 130.6 (C-6') ; 128.8 (C-4') ; 127.7 (C-5'); 70.0 (C-7); 68.6 (C-8); 61.7 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 52.6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ); 41.6 (C-9); 38.8 (C-4); 20.5 ( $\text{CH}_3$ ); 16.2 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).

Composto **28**: UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm: 242 (log  $\epsilon$  4.24), 270 (log  $\epsilon$  4.05). IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  2952, 1728  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS: 406 ( $\text{M}^{+\bullet}$ ); 362 ( $\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ )<sup>+</sup>; 347 ( $\text{M}-\text{CO}_2\text{CH}_3$ )<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (499.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.40 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-3'); 7.28 (m, 2H, H-4' and H-5'); 7.18 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-6'); 4.80 and 4.82 (2d,  $J = 11.7$  Hz, 2H, H-7); 4.0 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 3.58 (m, 2H, H-8); 3.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 2.92 (m, 2H, H-9); 2.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 167.2 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 166.6 ( $\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ); 156.2 (C-6); 156.1 (C-2); 145.0 (C-4); 134.8 (C-1'); 132.5 (C-2'); 130.2 (C-6'); 129.8 (C-3'); 129.1 (C-5'); 128.3 (C-5); 126.3 (C-3); 126.1 (C-4'); 72.9 (C-7); 72.0 (C-8); 61.4 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 52.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ); 41.0 (C-9); 23.2 ( $\text{CH}_3$ ); 13.4 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).

## 6.6 Tadalafil

### 6.6.1 Chemicals

Tadalafil è stato ottenuto da Kemprotec limited. BHA (3-*t*-butil-4-anisolo), DMB (dimetilbenzene), DABCO diazabicyclo[2.2.2]ottano e *d-tert*-butilperossido sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriori trattamenti. Le soluzioni di tadalafil sono state preparate utilizzando acqua Milli Q. Tutti gli altri solventi impiegati sono di grado di purezza HPLC.

### 6.6.2 Esperimenti di irradiazione

Gli esperimenti di irradiazione sono stati condotti con un fotoreattore equipaggiato con 4 lampade (Osram Sylvania, F15T8/BLB) che emettono da 310 a 410 nm con output massimo a circa (1  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) 360 nm, utilizzando provette

di quarzo aperte da 25 ml. Per gli esperimenti di irradiazione nel range UVA è stato utilizzato lo stesso fotoreattore equipaggiato con lampade a 366 nm. Le soluzioni di tadalafil per gli esperimenti di irradiazione sono state preparate sciogliendo 5 mg del farmaco in 20 ml di solvente e irradiando per 1 h, i solventi impiegati per gli esperimenti di irradiazione hanno compreso: CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN in rapporto 1:1.

Negli esperimenti condotti in atmosfera di argon o ossigeno, la sospensione è stata saturata con il gas gorgogliando per 30 minuti e sigillando la provetta.

Gli esperimenti con BHA sono stati condotti utilizzando un rapporto quencher : tadalafil=10:1 in CH<sub>3</sub>CN irradiando per 30 minuti nel range UVB in atmosfera di argon.

Gli esperimenti con d-tert-butilperossido sono stati condotti utilizzando un rapporto radical scavenger : tadalafil=10:1 in CH<sub>3</sub>CN e irradiando per quattro ore nel range UVA in atmosfera di argon.

Gli esperimenti con DMB e DABCO sono stati condotti utilizzando un rapporto quencher : tadalafil=1:1 in CH<sub>3</sub>CN e irradiando per 1 ora nel range UVB in atmosfera di argon.

Gli esperimenti di irradiazione a pH 3 e 11 sono stati effettuati sciogliendo 5 ml di tadalafil in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 1:1 aggiustando il pH rispettivamente con soluzioni 0.1M di HCl e KOH, le soluzioni sono state irradiate per 1 ora nel range UVB utilizzando un controllo alla medesima concentrazione a pH neutro.

La cinetica di trasformazione del farmaco è stata seguita irradiando irradiando nel range UVB una soluzione del farmaco a concentrazione nota nelle medesime condizioni utilizzate per gli esperimenti di irradiazione in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN. Aliquote della soluzione al tempo 0, dopo 10, 20, 30 40 e 50 minuti sono state prelevate e iniettate tal quali all'HPLC su una colonna Synergie Polar RP-18 ((4 µm, 250 × 4.60 mm) con flusso 0.7 ml/min in gradiente. La colonna è stata equilibrata con una miscela di A (H<sub>2</sub>O) - B (CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>OH 1:1 (v/v)) al 30% di B, il programma utilizzato è il seguente: dopo 8 minuti di corsa cromatografia una rampa di 7 minuti porta la miscela in colonna a 70 % di B. La lunghezza d'onda del detector è stata fissata a 254 nm.

### 6.6.3 Isolamento dei fotoprodotti

La soluzione ottenuta dopo un'ora di irradiazione al fotoreattore con 4 lampade UVA è stata separata per cromatografia HPLC preparativa utilizzando una colonna Kromasil C-18 (10 $\mu$ m, 250 x 10 mm) con flusso 2 ml/min utilizzando eluente in gradiente con lo stesso programma utilizzato in analitico per seguire la cinetica di trasformazione del farmaco. Di 30 mg di farmaco (**31**) sono stati ottenuti 4 mg di **32**, 6 mg di **33a** e 8 mg di **33b**, sono stati inoltre recuperati 10 mg di tadalafil (**31**) tal quale.

### 6.6.4 Dati spettrali

Tadalafil (**1**): UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm: 222, 285; ESI-MS  $m/z$  (%):  $m/z$  390 [M + H]<sup>+</sup> (100), 413 [M + Na]<sup>+</sup> (10). MALDI-MS  $m/z$  (%):  $m/z$  390 [M + H]<sup>+</sup> (100), 413 [M + Na]<sup>+</sup> (17). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono descritti in tabella 10.

Composto **32**: UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm: 222, 285 ; ESI-MS  $m/z$  (%):  $m/z$  390 [M + H]<sup>+</sup> (100), 413 [M + Na]<sup>+</sup> (23), 428 [M + K]<sup>+</sup> (40). MALDI-MS  $m/z$  (%):  $m/z$  390 [M + H]<sup>+</sup> (100), 413 [M + Na]<sup>+</sup> (55). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono descritti in tabella 9.

Composto **33a**: UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm: 221, 281; ESI-MS  $m/z$  (%): 390 [M - OH]<sup>+</sup> (25), 413 [M - OH + Na]<sup>+</sup> (95), 430 [M + Na]<sup>+</sup> (100), 446 [M + K]<sup>+</sup> (45),  $m/z$  837 [M<sub>2</sub> + Na]<sup>+</sup> (45). MALDI-MS  $m/z$  (%):  $m/z$  390 [M - OH]<sup>+</sup> (100),  $m/z$  430 [M + Na]<sup>+</sup> (28),  $m/z$  446 [M + K]<sup>+</sup> (53). I dati <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR sono descritti in tabella 11.

Composto **33b**: UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm: 221, 281; ESI-MS  $m/z$  (%): 390 [M - OH]<sup>+</sup> (25), 413 [M - OH + Na]<sup>+</sup> (95), 430 [M + Na]<sup>+</sup> (100), 446 [M + K]<sup>+</sup> (45),  $m/z$  837

$[M_2 + Na]^+$  (15). MALDI-MS  $m/z$  (%): 390  $[M - OH]^+$  (100), 413  $[M - OH + Na]^+$  (57), 430  $[M + Na]^+$  (60), 446  $[M + K]^+$  (97). I dati  $^1H$  e  $^{13}C$  NMR sono descritti in tabella 12.

## 7. Bibliografia

- Abdel-Shafi, A. A., Worrall, D. R., Wilkinson, F., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2001**, *142*, 133-143
- Adam, W., Ahrweiler, M., Peters, K., Schmiedeskamp, B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2733-2739
- Adam, W.; Hadjiarapoglou, L.; Wang, X. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* 1295-1298
- Albini, A., Fagnoni, M. in: Horspool, W., Lenci, F. (Eds), *Organic Photochemistry and Photobiology*, CRC Press, Boca Raton (FL), 2004 (Chapter 4)
- Arrowsmith, J. E., Campbell S. F., Cross P. E. m Stubbs J. K. B., Burges, R. A., Gardiner, D. G., Blackburn, K. J., *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1696-1702
- Astarita, A., DellaGreca, M., Iesce, M. R., Montanaro, S., Previtiera, L., Temussi, F., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2007**, *187*, 263-268
- Baylon, C.; Hanna, I. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6475-6478
- Bloodworth, A. J., Eggelte H. J, in: Frimer, A. A. (Ed), *Singlet Oxygen, II*, CRC Press, Boca Raton (FL), 1985, pp 93-203
- Calleja, M. C., Persoone, G., Geladi, P., *Alternative to Laboratori Animals*, **1993**, *21*, 330-349
- Cermola, F., Della Greca, M., Iesce, M. R., Montanaro, S., Previtiera, L., Temussi, F., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7390-7395
- Cosa, G., Scaiano J. C., *Photochememistry and Photobiology*, **2004**, *80*, 159-174
- CSTEE, *Environmental Risk Assessment of Medicinal for Human Use*, Brussels 2001
- Daughton, C. G., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2001**, *12* (10), 1067-1076
- Daughton, C. G., Jones-Lepp, T., (Eds), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, Symposium Series 791; American Chemical Society: Washington, D. C., 2001, 416 pp

- Della Greca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, A., Previtera, L., Rubino, M., Temussi, F., *Chemosphere*, **2004**, 54, 629-637
- D. Dulin, T. Mill, *Environ. Sci. Technol.* **1982**, 16, 815-820
- Elvers, K., Wright, S. J. L., *Lett. In Appl. Microbiol.*, **1995**, 20, 82-84
- Encinas, S., Bosca, F., Miranda, M.A., *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, 11, 946-952
- EPA (United States Environmental Protection Agency), *Fate, transport and transformation test guidelines. Direct photolysis rate in water by sunlight*, OPPTS 835.2210, Washington, DC, 1996.
- Fasani, E., Fagnoni, M., Dondi, D., Albini, A., *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 2037-2045
- Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 659
- Gilbert, A. *Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed.; Horspool, W., Lenci, R., Eds.; CRC: Boca Raton, FL, 2004; Chapter 33, pp 1-11
- Gollnick, K. *Adv. Photochem.* **1968**, 6, pp. 1-90
- Griffin, G. W., Kirschenheuter, G. P., Vaz, C., Umrigar, P. P., Lankin, D. C., Christensen, S., *Tetrahedron* **1985**, 41, 2069-2080
- Heberer, T., *Toxicol. Lett.*, **2002**, 131 (1-2), 5-17
- Heberer, T. Stan H. J., *Vom Wasser*, **1996**, 86, 19-31
- Hermann, M., Christensen, H., Reubsaet, J. L. E., *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 382, 1242-1249
- Hilborn, J. W., MacKnight, E., Pincock, J. A., Wedge, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 3337-3346
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. Kratz, K.-L., *The Science of the Total Environment*, **1999**, 225, 109-118
- Horgan, S. W., Morgan, D. D., Orchin, M., *J. Org. Chem.* , **1973**, 38, 3801-3803
- Iesce M. R.; Cermola, F.; Temussi, F. *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 109-139
- Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., Previtera, L., *Chemosphere*, **2006**, 63, 785-793

- Jacobsen, W., Kuhn, B., Soldner, A., Kirchner, G., Sewing, K., Kollman, P. A., Benet, L., Christians, U., *Drug and metabolism Disposition* 2000, 28, 1369-1378
- Katritzky, A., R.; Xie, L.; Serdyuk, L. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7564-
- Kümmerer, K., 2001, *Pharmaceuticals in the Environment*, 1 str Edn Springer, Berlin Heidelberg New York
- Lam, M. W., Maburt, S. A., *Aquat. Sci.* **2005**, 67, 177-188
- Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Parkonnen, J., Pettersson, M., Berg, A., Olsson, P., Förlin, L., *Aquatic Toxicology*, **1999**, 45, 91-97
- Lewis, F. D., Zuo, X., Gevorgyan, V. Rubin, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13664-13665
- Lewis, F. D., Zuo, X., *Photochem. Photobiol. Sci.* , **2003**, 2, 1059-1066
- Lhiaubet-Vallet, V., Cuquerella, M. C., Castell, J. V., Bosca, F., Miranda M. A., *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 7409-7414
- Lhiaubet-Vallet, V., Sarabia, Z., Hernandez, D., Castell, J.V., Miranda, M.A., *Toxicology in Vitro*, **2003**, 17, 651-656
- Lilius, H., Hastbacka, T., Isomaa, B., *Envir. Toxicol. Chem.*, **1995**, 14, 2085-2088
- Lin, Y. Y.; Li, G. B.; Zhang, Y. H.; Leung, H. K. *Photochem. Photobiol*, **1997**, 65, 82-84
- Mallory, F. B. , Mallory, C. W. in: Dauben, W. G. (Ed.), *Organic Reactions*, 30, Krieger Publishing Company, Malabar (FL), 1998, p 16-18
- Metcalfe, C., X.-S. Miao, B. Koenig and J. Struger., *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, 22, 2881-2889.
- Mizuno, K., Otsuji, Y., *Top. Curr. Chem.*, **1994**, 169, 312-316
- Nakagava, Matsuki, K., Hasegawa K., Hino T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1998**, 742-743
- OECD, Environment Directorate. *The 2000 OECD List of High Production Volume Chemicals*, Paris 2001
- Olsen, R. J., Pruett, S. R., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 5457-5460
- Pincock, J. A., *Acc. Chem. Res.*, **1997**, 30, 43-49

- K. Pari, C. S. Sundari, S. Chandani, D. Balasubramanian, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 2455-2462
- Ragno, G., Garofalo, A., Vetusch, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 27, 19-24
- Richardson, M. L., Bowron, J. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1985**, 37, 1-12
- Roberts, J. C., Pincock, J. A., *J. Org. Chem.*, **2005**, 71, 1480-1492
- Rodier, J-M., Myers, A. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10791-10795
- Rosenthal I. In *Singlet O<sub>2</sub>, Volume I Physical-Chemical aspects*; Frimer A. A. Ed; CRC press, chapter 2, pp 13-38
- Sanyal, A., Roy, D., Chowdhury, B., Banerjee, A. B., *Letters in Applied Microbiology*, **1993**, 17, 109-111
- Schimdt, R., Tanielian, C., *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104, 3177-3180
- Scaiano, J. C. In *Reactive Intermediate Chemistry*, Robert A. Moss, Matthew S. Platz, Maitland Jones Jr. Eds; Wiley, 2004, chapter 18, pp 847-871
- Shibuya, J. Nabeshima, M., Nagano, H., Maeda, K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, **1988**, 1607-1612
- Shore, L., Gurevitz, M., Shemesh, M., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1993**, 51, 361-366
- Shore, L., Kapulnik, Y., nBen-Dov, B., Fridam, Y., Wininger, S., Shemesh, M., *Physiol. Plant.*, **1992**, 84, 217-222
- Singh, M., Murray, R. W. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4263-4270
- M. Sumida, K. Hitoshi, K. Shouda, H. Fukami, T. Tanaka, K. Wakabayashi, P. Boeger, *Nippon Noyaku Gakkaishi*, **1996**, 21, 317-321)
- Ternes T.A, *Water. Resour.* **1998**, 32, 3245-3260
- Ternes T.a., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H-J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulet-Seibert, N., *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 3855-3863
- Ternes, T. A. in *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issue*, Daughton C. G. and Jones-Lepp T. L. Eds; ACS Symposium Series 791 American Chemical Society, Washington, D. C. 2001

- Turro, N. J. (Ed) *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Book, Sausalito, California, 1991 (Chapter 12)
- Xiaojun, Z.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8867-8868
- Waggott, A., *Chem. Water Reuse* **1981**, 2, 55-99
- Wasserman, H. H.; Freccette, R.; Rotello, V. M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7571-7574
- A.L. Zanocco, L. Diaz, M. Lopez, L.J. Nunez-Vergara, J.A. Squella, *J. Pharm. Sci.*, **1992**, 81, 924-929
- Zepp, R. G., Holgne, J., Bader, H., *Environ. Sci. Technol.* **1987**, 21, 443-450
- Zepp, R. G., Schlotzahauer, P. F., Sink, R. M., *Environ. Sci. Technol.* **1985**, 19, 74-81
- R. G. Zepp, D. M. Cline, *Environ. Sci. Technol.* **1977**, 11, 359-366
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R.; *Lancet* 355, **2000**, 1720-1789

## *Abstract*

### *Investigations on the abiotic transformations of xenobiotics (pharmaceuticals) in the environment.*

In recent years contribution by pharmaceuticals and personal care products to aquatic pollution has become a well known issue. Drugs and drug metabolites, found in low concentrations in wastewaters, ground and surface waters, may be regarded as a new class of organic micro-pollutants. In order to assess the real impact of these substances on the aquatic ecosystem it is very important to investigate their environmental fate. Drugs can undergo abiotic transformations leading to different substances that sometimes can be more persistent and more toxic than their parental compounds.

In this context the objective of the PhD work was to investigate on hydrolysis and photochemical transformations in water solution of several drugs: atorvastatin, fluvastatin and rosuvastatin belonging to the class of synthetic statins, amlodipine, a calcium channel blocker and tadalafil, a phosphodiesterase type 5 (PDE5) enzyme inhibitor.

Photochemical behaviour in water was estimated under mimic environmental conditions using sunlight or solar simulator as light source. Analysis was run out at different times to evaluate the degree of environmental persistence.

The main degradation products were isolated and fully characterized employing NMR techniques (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) and mass spectrometry experiments (ESI-MS, MALDI-MS, EI-MS). Mechanistic studies were also performed to understand the formation pathways. It is important to acknowledge that, for the drugs atorvastatin and fluvastatin, extended photochemical/photophysical studies were performed under the supervision of Prof. Miguel Angel Miranda and Dr. Virginie Lhiaubet-Vallet in the framework of a six months visit to the laboratory of Prof. Miranda, at Instituto de Tecnologia Quimica; Universidad Politecnica de Valencia (Spain) in the period June-December, 2006.

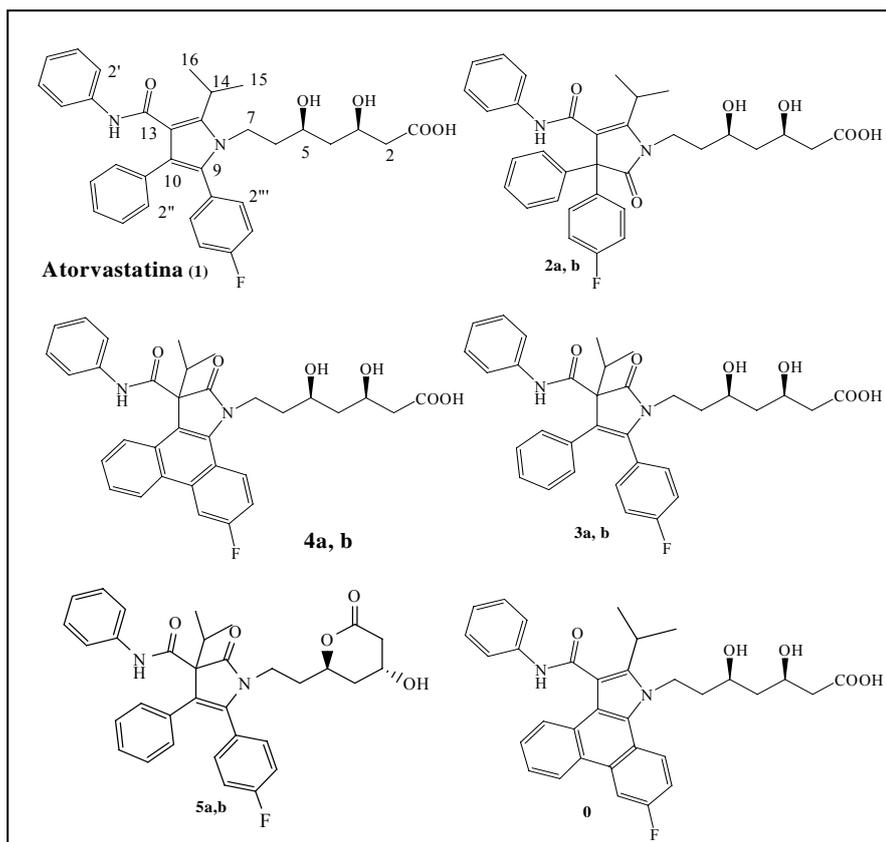
These drugs were studied in water solution and in organic solvents, using time resolved techniques to identify transient species involved in the formation of the photoproducts and to formulate hypotheses on the mechanistic pathways involved.

Statin drugs are used to lower cholesterol level in blood and are widely prescribed to prevent cardiovascular diseases: among them, atorvastatin is probably the most prescribed drug in the world. Occurrence of this drug in Canada surface waters has been reported.

Statins are stable in the dark in pure water.

-The photochemical behaviour of atorvastatin in water was studied under different conditions. NMR analysis showed that an aqueous dispersion of atorvastatin is completely transformed in several photoproducts when exposed to natural sunlight for fourteen days.

The main photoproducts were separated employing several stationary and mobile phases and are shown in figure 1.



All the structures **2-5** present oxygenation of the pyrrole system. When the irradiation of atorvastatin was carried out in the absence of oxygen the reaction didn't proceed and the drug was recovered unreacted. Experiments employing  $\text{NaN}_3$  and methylene blue, a singlet oxygen inhibitor and a singlet oxygen sensitizer, respectively, showed the deep influence of this species on the reaction rate.

Laser flash photolysis experiments performed in several solvents showed that photochemical transformation of atorvastatin starts with a non-fluorescent singlet excited state that cyclizes, under aerobic condition, to afford a tetracyclic aromatic molecule extremely reactive with oxygen. According to the formulated hypothesis this molecule can act as self-sensitizer generating singlet oxygen in solution and reacting itself with this species to produce derivative **4**.

The existence of a tetracyclic intermediate, photoproduct **0**, that reacts rapidly with oxygen was demonstrated carrying out the irradiation of the drug in de-aerated solution in the presence of iodine, that is along with oxygen, a well-known oxidant giving rise to phenanthrene formation from dihydrophenanthrene intermediate; the irradiation mixture was directly injected in the HPLC-MS showing the presence of a peak with molecular weight  $M_{\text{drug}}-2$  respect to atorvastatin.

Laser flash photolysis experiments on photoproduct **4** demonstrated that this product is able to give intersystem crossing to afford a triplet state which, in turn, is quenched by oxygen. On these basis it was hypothesized that also this

product can act as singlet oxygen sensitizer just like photoproduct **0**. Photoproduct **4** showed a fluorescence quantum yield of 0.35 and the singlet state undergoes quenching by oxygen.

Photoproducts **2** and **3** are generated by reaction of singlet oxygen with the drug while photoproduct **5** show oxygenation of the pyrrole ring like photoproduct **3** and lactonization of the side chain.

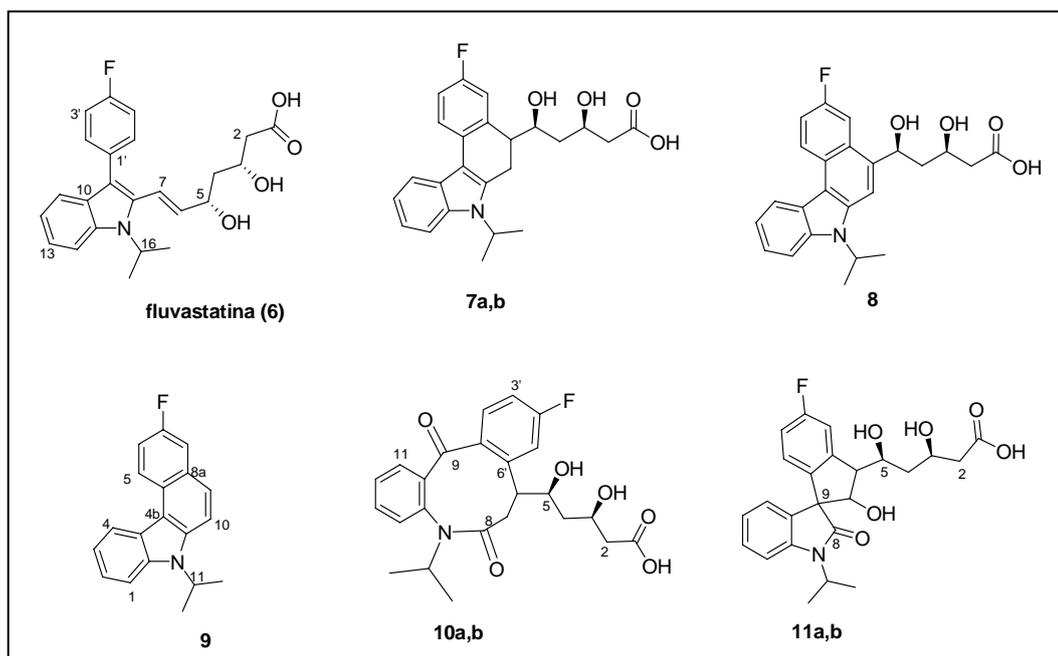
-Fluvastatin (**6**, figure 2) was found very reactive when exposed to natural sunlight; UV analysis showed fast alteration of the drug that was totally transformed in a mixture of photoproducts after only one day of solar exposition.

All photoproducts (structures shown in figure 2) were separated by chromatographic techniques and characterized by NMR and mass analyses.

In order to obtain mechanistic information several steady state experiments were conducted.

It was demonstrated that derivatives **8**, **9**, and **10** are formed by photochemical reaction of derivative **7**, while compound **7** itself and compound **11** are generated directly by irradiation of the drug.

Derivative **7** is formed by photoinduced electrocyclic reaction of the *o*-vinylbiphenyl-like structure of fluvastatin, where a phenyl ring is replaced by an indole. Photoproducts **8** and **9** are produced by aromatization of the tetracyclic structure and loss of the side chain. Photooxygenation of compound **7** and of the drug are responsible for the generation of derivatives **10** and **11**, respectively.



Steady state and time resolved fluorescence experiments showed that fluvastatin emits with a quantum yield of 0.12 in methanolic solution, its singlet energy was estimated to be 341 KJ/mol and a singlet lifetime of 2.4 ns was measured.

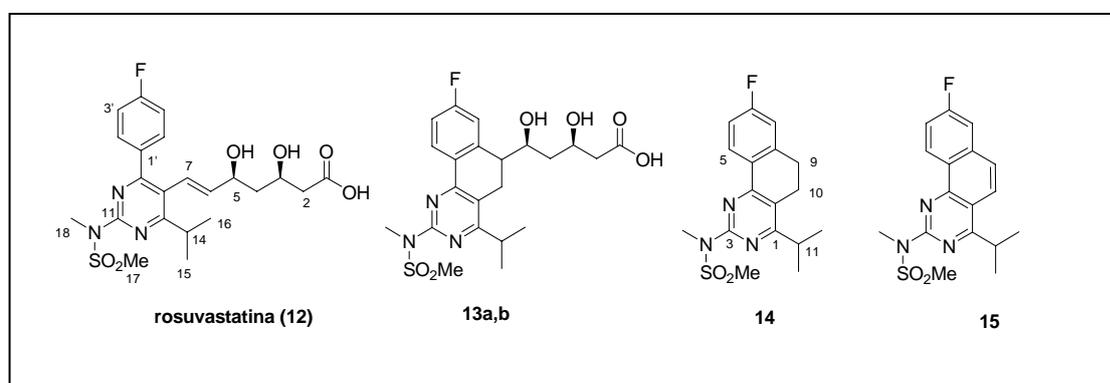
Laser flash photolysis experiments were performed in water; spectra analysis of fluvastatin was complicated by the presence of more than three species with superimposed maxima. It was possible to identify one species with an absorption maximum at 540 nm that clearly underwent quenching by oxygen. It was attributed to the triplet state of the drug.

Laser flash photolysis studies indicated that fluvastatin is able to undergo intersystem crossing to generate a triplet state and it is likely that this is one of the ways of singlet oxygen production. Interaction between singlet oxygen and the parent drug can induce the formation of spiro-compound **11**, while compound **10** can be formed by singlet oxygen reaction with the cyclic intermediate **7**.

Moreover, oxidation of compound **7** gives rise to the tetracyclic compounds **8** and, by loss of the side chain, to **9**. Both of them can, in turn, be efficient singlet oxygen sensitizers. Laser flash photolysis spectra for compound **8** were registered in methanol and in acetonitrile; in this case the spectra showed only a species with a maximum at 540 nm that was quenched by oxygen, and was attributed to triplet state of the molecule.

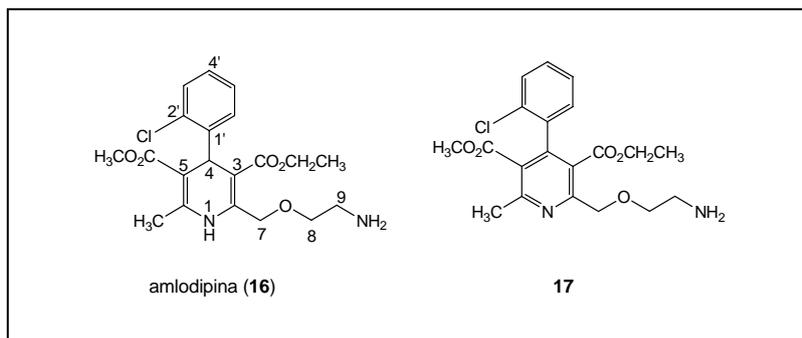
The very complexity of the model doesn't allow us to distinguish all the transients involved in the photochemical transformation but, at any rate, contribution of singlet oxygen can be hypothesized. Moreover, various excited species present in the irradiated solution are able to sensitize singlet oxygen production.

-Rosuvastatin (**12**, Fig. 3) showed a complete transformation in a mixture of photoproducts when exposed to natural sunlight, in water, for four days.



Three main photoproducts were isolated and characterized by spectroscopic means (NMR and EI-MS experiments); the structures are shown in figure 3. Rosuvastatin, when irradiated in water solution, undergoes a photoinduced electrocyclic reaction to yield photoproduct **13**, which in aerobic conditions proceeds to photoproducts **14** and **15** by loss of the side chain and aromatization by similar mechanistic pathways as for derivatives **7**, **8** and **9** from fluvastatin.

-The fourth pharmaceutical studied was amlodipine, an antihypertensive drug. The drug in water leads to derivative **17** as the only photoproduct isolated; structures are shown in figure 4.

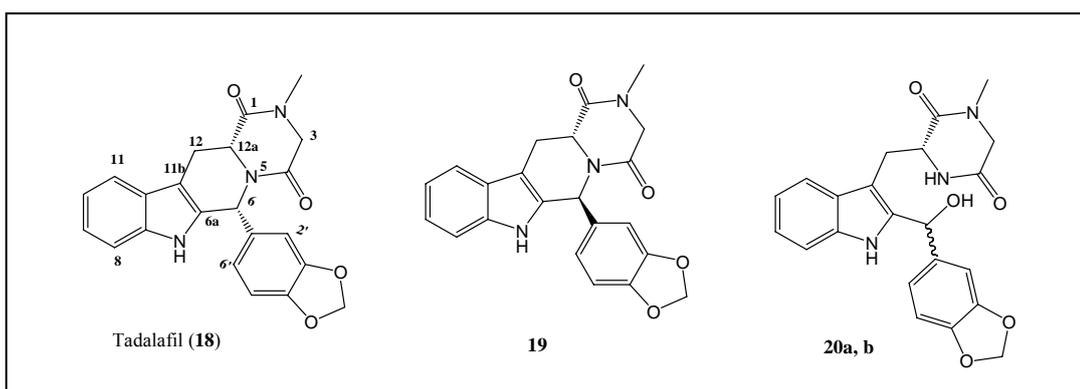


Aromatization of the dihydropyridine moiety is the only photoreaction observed under all conditions used. Oxygen had no significant effect on the oxidation rate and compound **17** was also found in argon-flushed solutions. Conversion of amlodipine was slower in acetonitrile than in water indicating that the solvent can play a role in the aromatization reaction. According to recent literature data on similar molecules a possible mechanism involving a photoinduced electron-transfer was suggested to justify the formation of derivative **17**.

-Tadalafil (**18**) is a drug of recent commercialization, and like its precursor sildenafil it is prescribed in the treatment of erectile dysfunctions. Tadalafil is insoluble in water and the photochemical stability of the drug was tested in water/acetonitrile (1: 1) irradiating with UVB lamps. Preliminarily, it was proven that the drug is stable in the dark.

After one hour of irradiation NMR analysis showed a mixture of the parent compound and three photoproducts in comparable amounts.

The photoproducts were separated by chromatographic techniques and structures (figure 4) were elucidated by spectroscopic means (NMR, ESI-MS, MALDI-MS experiments).



Steady state experiments indicated that the photochemical conversion of tadalafil is not affected by oxygen dissolved in solution. Moreover, experiments conducted in the presence of radical inhibitors gave the same photoproducts suggesting that radical species are not involved in the reaction.

When the irradiation was carried out in acetonitrile, derivative **19**, which is due to epimerization of the drug in C-6, was the only photoproduct observed. The

presence of water as co-solvent was necessary to obtain photoproducts **20**. For this reaction a mechanism of photosolvolysis was proposed. According to this hypothesis singlet excited state of tadalafil undergoes breaking of C(6)-N(5) bond; the primary product of the fragmentation could either be radical pair, ion pair or both. In polar solvents ion pair is preferred, and indeed there is no evidence of products derived by a homolytic rupture.

*In summary*, all the investigated drugs undergo easily photochemical transformations that lead to different derivatives.

For statin drugs the photoinduced electrocyclic reactions involving cis-stilbene-like system for atorvastatin and *o*-vinylbiphenyl-like systems for fluvastatin and rosuvastatin are relevant in the mechanistic pathways. These transformations are followed by sigmatropic hydrogen shift and oxidative reaction to aromatic derivatives.

Aromatization is the easy only reaction of amlodipine.

For both atorvastatin and fluvastatin production of singlet oxygen by either the drug or intermediate also occurs and, hence, photooxygenated products are formed by reaction of singlet oxygen with pyrrole or indole systems which are good substrates for the reactive species.

Bond breakages involving benzylic carbons occur easily as observed for tadalafil or rosuvastatin derivatives.

Especially for statin drugs photochemical transformations lead to polycyclic aromatic compounds with potential biologic activity; for rosuvastatin and fluvastatin derivatives such as benzoquinazoline and benzocarbazole showed an enhanced photostability in solution with respect to the parent drug. These observations clearly highlight that an environmental risk assessment about pharmaceuticals, including analytical, toxicological and eco-toxicological analyses, must be addressed not only to the parental drugs but also to the products derived from abiotic transformations in aquatic environment.

### *Elenco pubblicazioni*

Flavio Cermola, Marina DellaGreca, Maria Rosaria Iesce, Sara Montanaro, Lucio Previtiera and Fabio Temussi. "Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water." *Tetrahedon*, **2006**, 62, 7390-7395

Anna Astarita, Marina DellaGreca, Maria Rosaria Iesce, Sara Montanaro, Lucio Previtiera, Fabio Temussi. "Polycyclic compounds by sunlight exposure of the drug rosuvastatin in water." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, (2007) **187**, 263-268.

Flavio Cermola, Marina DellaGreca, Maria Rosaria Iesce, Sara Montanaro, Lucio Previtiera, Fabio Temussi, Marcello Brigante, "Irradiation of fluvastatin in water. Structure elucidation of photoproducts", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189 (2007) 264-271

Marina Della Greca, Maria Rosaria Iesce, Marina Isidori, Sara Montanaro, Lucio Previtiera, and Maria Rubino, "Phototransformation of amlodipine in aqueous solution. Toxicity of the drugs and its photoproduct on aquatic organisms.", *International Journal of Photoenergy*. (accepted on 20 September 2007)