Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

La luz tiene un papel fundamental sobre los seres vivos. La energía de la radiación ultravioleta y visible del sol da lugar a fenómenos que permiten la continuidad de la vida terrestre y, muy probablemente, también fue protagonista del desarrollo y evolución de la vida. La mayor parte de las reservas de energía del mundo corresponde a la energía radiante del sol capturada y acumulada mediante reacciones fotoquímicas. Para el desarrollo de la vida sobre la tierra, es fundamental, tanto en forma directa como indirecta, la influencia que tiene la luz sobre la química. El ejemplo más obvio es el proceso de fotosíntesis que realizan las plantas, quienes utilizan la luz solar para formar carbohidratos y oxígeno. Los carbohidratos pueden ser usados por las plantas mismas y por otras formas vivas que no producen fotosíntesis. Los animales se alimentan de lo producido por los vegetales mediante la fotosíntesis. Cada molécula de oxígeno que respira un animal y cada átomo de carbono presente en su cuerpo, pasó antes por un vegetal. La vida, tal como la conocemos, se mantiene gracias a la fotosíntesis, sin ella no habría plantas ni animales.

La absorción de radiación electromagnética por una molécula conduce a la excitación de un electrón desde un estado cuántico de menor energía a otro de mayor energía. Una molécula no puede permanecer en estado electrónico excitado durante mucho tiempo, porque se encuentra en una situación muy inestable respecto de su estado basal. Para perder el exceso de energía, y, consecuentemente, regresar a su estado basal puede tomar diversos caminos. Los caminos a seguir, de acuerdo al resultado final, se pueden dividir en dos grupos: *Procesos fotoquímicos* o *Procesos fotofísicos* (Figura 1.1). Si la molécula se modifica o fragmenta habrá elegido el camino de la fotoquímica; de lo contrario,

si permanece químicamente igual, encontrará alguna forma física de desexcitación y el camino elegido será fotofísico. Un proceso fotofísico involucra solamente cambios en los estados cuánticos de las moléculas y no en su naturaleza química.

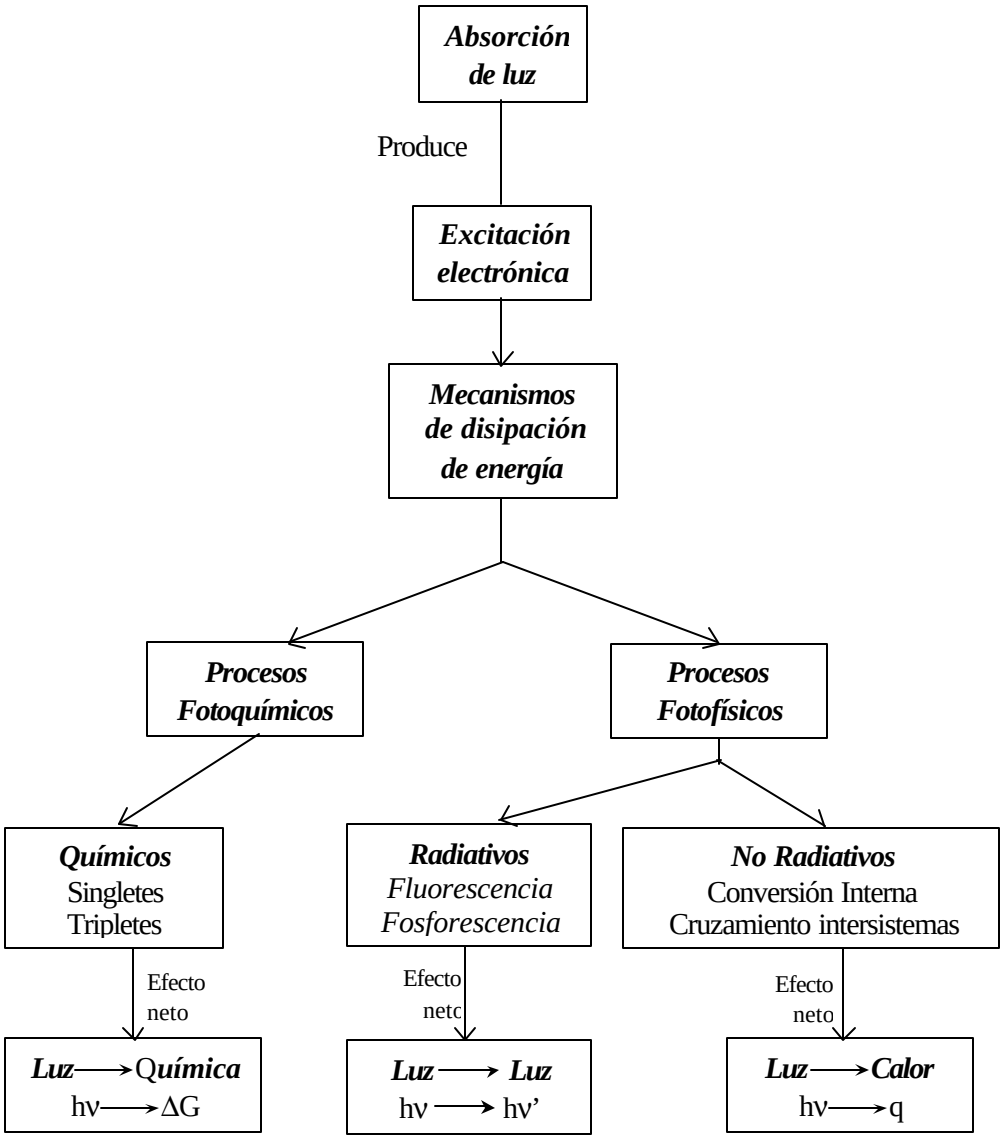


Figura 1.1: Esquema de los procesos fotoquímicos y fotofísicos.

Hay muchos caminos de desexcitación física posibles, y el más favorable dependerá de cada tipo de molécula y de la naturaleza del estado electrónico involucrado. Estas vías de desexcitación suelen ser muy rápidas y pueden clasificarse en las siguientes categorías:

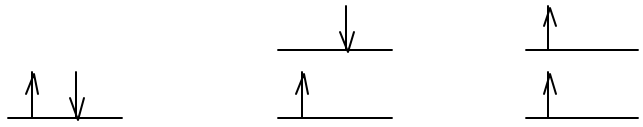
Transiciones radiativas: la molécula excitada emite radiación electromagnética para retornar al estado de menor energía. La cantidad de energía emitida es menor (de mayor longitud de onda) que la utilizada para crear el estado excitado.

Transiciones no radiativas: un estado previamente excitado se convierte en otros sin emisión de energía por transferencia intramolecular de energía, sin emisión.

Procesos de quenching: involucra la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras moléculas que se encuentran en contacto con la primera, por colisiones.

Cada uno de estos caminos de desexcitación incluye diferentes procesos. En la Figura 1.2 se presenta un diagrama de Jablonski, que representa las transiciones posibles de forma conveniente en un esquema simplificado de niveles de energía, en el cual las transiciones se representan con flechas. Los niveles vibracionales asociados a cada estado se representan con líneas horizontales.

La mayoría de las moléculas orgánicas presentan un estado electrónico basal singlete, representado por el símbolo S_0. La absorción de radiación electromagnética promueve un electrón a un orbital de mayor energía. Si no ocurre cambio de spin, el estado electrónico excitado alcanzado continua siendo un singlete, representado ahora por S_1. Si, por el contrario, ocurre un cambio de spin el estado electrónico alcanzado será un triplete, representado por T_1.



Estado singlete Fundamental (S_0) | Estado singlete excitado (S_1) | Estado triplete excitado (T_1)

En un proceso de excitación electrónica existe una preferencia sobre la conservación del spin, por ello las bandas de absorción más intensas en un espectro corresponden a transiciones del tipo $S_0 \rightarrow S_1$. Por el contrario, las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ están "prohibidas por spin", y, aunque ocurren, son transiciones muy débiles.

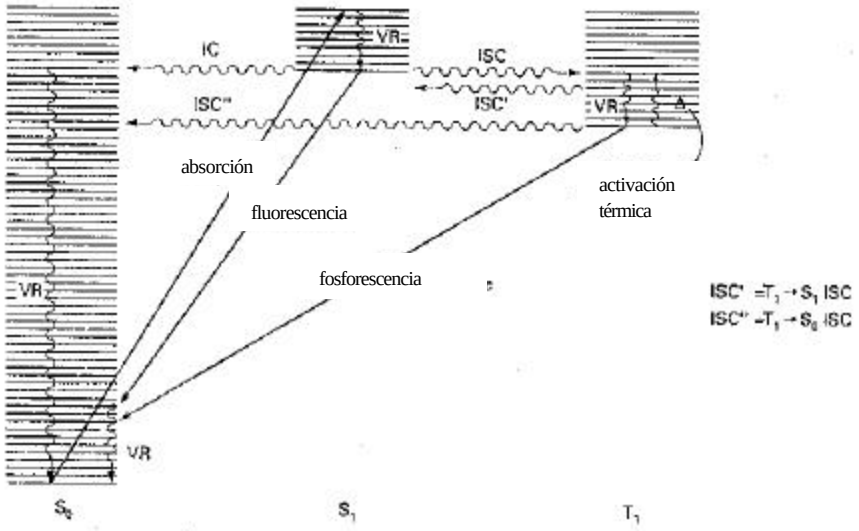


Figura 1.2: Diagrama de Jablonski. (extraído de "Esentials of Molecular Photochemistry" de Gilbert y Baggott, 1991).

Puede observarse en la Figura 1.2 que el estado excitado T_1 posee menor energía que el estado excitado S_1 (debido a que dos electrones desapareados en diferentes orbitales conducen a una mínima energía de repulsión electrón-electrón).

A pesar de no estar representados en el diagrama, existen estados excitados de mayor energía a los descriptos, tanto singletes como tripletes. Usualmente la excitación al primer estado excitado es el proceso más favorable, sin embargo, muchas moléculas presentan transiciones $S_0 \rightarrow S_2$.

El diagrama de Jablonski puede utilizarse para representar todas las transiciones posibles que pueden ocurrir entre niveles de diferente energía de una molécula. Usualmente se representan las transiciones que involucran absorción o emisión de energía electromagnética con flechas rectas, mientras que las transiciones no radiativas con flechas onduladas.

Las transiciones radiativas son "transiciones verticales" e involucran un cambio en la energía total de la molécula, debido a la absorción o la emisión de un fotón. Las transiciones no radiativas son "transiciones horizontales" que involucran conversiones de un estado a otro, sin cambio de energía en la molécula. Las conversiones pueden ser entre estados de igual multiplicidad, denominándose *conversión interna* (IC), o de distinta multiplicidad, denominándose *cruzamiento intersistemas* (ISC). Las transiciones horizontales entre estados, por conversión interna o cruzamiento intersistemas, dejan a la molécula con un exceso de energía vibracional. En solución esta energía es rápidamente removida por colisiones con moléculas del solvente, en un proceso denominado relajación vibracional (VR).

Los procesos de emisión radiativos son la *fluorescencia* y la *fosforescencia*. En ambos fenómenos las moléculas que han absorbido radiación emiten luz. La emisión se denomina *fluorescencia* si la emisión ocurre desde un estado electrónico de igual multiplicidad de spin que el estado basal, siendo así una transición fuertemente permitida y por lo tanto muy rápida. Por otro lado, la emisión conocida como *fosforescencia* es una transición entre estados de diferente multiplicidad de spin, es decir, una transición teóricamente prohibida. Sin embargo, la transición puede ocurrir, pero generalmente es de menor intensidad y ocurre más lentamente.

Las propiedades de la luz emitida de los estados excitados puede evaluarse experimentalmente para revelar detalles de la naturaleza y el comportamiento de estas especies reactivas.

También puede obtenerse información del estudio de los *procesos de quenching*. Cuando en el medio de reacción se encuentra otra molécula capaz de reaccionar con el estado excitado, aparece un nuevo camino de desactivación que compite con la emisión:

$$M + h\nu \longrightarrow M^* \qquad \text{excitación}$$

$$M^* \longrightarrow M + h\nu' \qquad \text{emisión}$$

$$M^* + Q \longrightarrow M + Q \qquad \text{quenching}$$

Esta nueva molécula se conoce usualmente como *quencher* o desactivador (Q). En presencia de un *quencher* una cantidad de moléculas excitadas (M*) puede interaccionar con éste, y desactivarse sin emisión de radiación. Este fenómeno involucra generalmente la transferencia de energía de la molécula excitada a otra molécula en una colisión. Consecuentemente, la intensidad de la radiación se reduce en una cantidad dependiente de la concentración del *quencher*. Adicionalmente la presencia del *quencher* aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión. Así medidas de la intensidad de la emisión y su dependencia en el tiempo proveen información de las velocidades de reacción entre la molécula excitada (M*) y el *quencher* (Q) [Gilbert y Baggott, 1991]. Los procesos de quenching serán abordaos con mayor detalle en el *Capítulo 6*.

Importancia del estudio de la fotofísica de pterinas.

Un proceso fotoquímico es intrínsecamente un fenómeno de naturaleza física, que involucra la absorción de un fotón de luz por una molécula produciendo estados electrónicamente excitados, de gran reactividad química. Por ello, para conocer detalladamente una reacción fotoquímica, es esencial dedicar algún tiempo al conocimiento de la molécula involucrada, de su estructura electrónica molecular y de su comportamiento cuando está bajo influencia de radiación electromagnética.

La fotobiología estudia las reacciones fotoquímicas que ocurren en sistemas biológicos y sus consecuencias fisiológicas. Los fenómenos fotobiológicos se inician, en general, por la absorción de luz por determinada molécula que actúa a modo de antena. Este primer acontecimiento conduce a un

cambio químico inicial que dispara una serie de reacciones bioquímicas que conducen a una respuesta fisiológica celular a la luz. Estos procesos, muchas veces, son complejos conjuntos de reacciones fotoquímicas y térmicas que están incluidos en la fisiología normal de gran cantidad de organismos vivos. Como ejemplos pueden mencionarse fenómenos tan importantes como la fotosíntesis, la captación de luz por parte de órganos fotosensibles y los mecanismos de defensa contra la radiación ultravioleta proveniente del sol. Otras veces, los procesos fotobiológicos son no deseados y aparecen involucrados en el desarrollo de patologías. Entre estos casos se encuentra la generación de distintos tipos de cánceres de piel y ciertas etapas del curso de otras enfermedades de la piel tales como las porfirias y el vitiligo.

Por otra parte, la fotoquímica de biomoléculas tiene muchas aplicaciones en medicina. La fototerapia, por ejemplo, involucra una serie de técnicas en las cuales se utiliza la combinación de luz y ciertos compuestos para destruir células tumorales [Henderson y Dougherty,1992; Hönigsmann *et al*]. También se han desarrollado ciertos métodos para esterilizar fluidos que aprovechan la generación fotoquímica de especies altamente tóxicas [Minnock *et al*, 1996; Müller-Breitkreutz *et al*, 1995]. Por último, existen numerosas aplicaciones de la fotoquímica de compuestos orgánicos de interés biológico en otras ramas de la ciencia tales como la química orgánica y las ciencias farmacéuticas.

El estudio de la fisicoquímica y, en particular, de la fotofísica y la fotoquímica de biomoléculas es fundamental para comprender en detalle los procesos fotobiológicos, para mejorar técnicas aplicadas ya existentes y para descubrir compuestos con potenciales aplicaciones.

En el presente trabajo se estudiarán principalmente aspectos de la fotofísica en solución acuosa de varios compuestos pertenecientes a la familia de las pterinas. Las *pterinas* son moléculas que han despertado interés en los últimos años y sus propiedades fisicoquímicas no están aún totalmente descriptas. En el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo de tesis se está trabajando para obtener información que permita caracterizar la fotoquímica y fotofísica de esta familia de compuestos.

Esta familia de compuestos orgánicos heterocíclicos se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos, desempeñando diversas funciones que se expondrán más adelante. Además las pterinas absorben luz y sufren una serie de transformaciones fotoquímicas que han sido descriptas en la literatura [Thomas, 2001; Pfleiderer *et al*, 1960]. Más aún, como se detallará en el Capítulo siguiente, se ha demostrado, en ciertos casos, y se ha postulado, en otros, que estos compuestos participan en procesos fotobiológicos que ocurren tanto en bacterias como en eucariotas. Es evidente que el conocimiento de las propiedades fotofísicas de las pterinas permitirá una mejor comprensión de las reacciones fotoquímicas y de los procesos fotobiológicos en los que participan estos compuestos.

Adicionalmente, en el marco de esta tesis se investigarán las propiedades fotosensibilizadoras de las pterinas sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ácido desoxirribonucleico no absorbe luz UV-A (320 a 400 nm) y, por lo tanto, no sufre alteraciones físicas o químicas en presencia de luz de esa longitud de onda. Sin embargo, se han observado reacciones químicas del ácido desoxirribonucleico al ser irradiado con luz de longitud de onda comprendida en ese rango en presencia de algunas moléculas que sí la absorben.

Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es aportar información sobre las propiedades fotofísicas y fotosensibilizadoras de seis derivados pterínicos en solución acuosa al ser irradiados con luz de tipo UV-A (320 – 400 nm). Los seis compuestos estudiados son los siguientes: pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, biopterina, neopterina y ácido fólico. Se mencionan a continuación objetivos particulares.

⫽ *Estudio de la emisión de fluorescencia.* Estudio de las propiedades de los estados excitados a partir de la determinación y análisis de los espectros de emisión y excitación. Determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de los tiempos de vida de fluorescencia. Análisis de la influencia del pH sobre la emisión fluorescente.

- *Estudio de procesos de quenching de fluorescencia.* Evaluación del efecto de aniones sobre la emisión de las pterinas. Determinación de constantes de quenching. Estudio del efecto del pH sobre estos fenómenos.
- *Producción de oxígeno singlete por estos compuestos.* Investigación de la capacidad de las pterinas para generar oxígeno singlete a partir de procesos de transferencia de energía. Determinación de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete. Efecto del pH.
- *Estudio de las propiedades fotosensibilizadoras sobre biomoléculas simples.* Investigación de la capacidad de la pterina para degradar nucleótidos mediante procesos fotosensibilizados. Efecto del oxígeno y el pH. Estudio de los mecanismos implicados.
- *Estudio de procesos de fotosensibilización del ácido desoxirribonucleico.* Investigación de la capacidad de la pterina para dañar moléculas de ácido desoxirribonucleico plasmídico mediante procesos fotosensibilizados. Estudio del tipo de alteraciones sufridas por el ácido desoxirribonucleico.