## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



# Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución

acuosa.

Bioquímica Carolina Lorente 2003

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección del Dr. Alberto L. Capparelli y la co-dirección del Dr. Antonio Lagares. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la realización de este trabajo de Tesis, especialmente:

Al Dr. Alberto L. Capparelli y al Dr. Antonio Lagares quienes dirigieron este trabajo de Tesis, brindándome todo su conocimiento y apoyo.

A la Dra. Esther Oliveros, del Instituto Engler-Bunte de la Universidad de Karlsruhe (Alemania), por haber dirigido los experimentos de oxígeno singlete y fluorescencia realizados en dicho instituto y por haberme brindado sus conocimientos para la interpretación de los resultados.

A Andrés Thomas, por haberme alentado y ayudado en todo momento, sin cuya invalorable ayuda este trabajo no me hubiera sido posible.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y a la Fundación Antorchas por las becas otorgadas para realizar el Doctorado.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT, PICT 06-03531/98), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 4354/96) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, X-226/98 y X-336/11) por permitir financiar el presente trabajo de tesis y parcialmente mis estadías en el Instituto Engler-Bunte, Universidad de Karlsruhe, Alemania.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas por haber accedido a que realizara mis actividades en esta institución, en particular, a las autoridades del Instituto de Investigaciones Teóricas y Aplicadas (INIFTA) y del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM).

Al director del Lehrstuhl für Umweltmesstechnik del Instituto Engler-Bunte de la Universidad de Karlsruhe (Alemania), Prof. Dr. André Braun, por haberme permitido disponer del equipamiento e infraestructura de dicho instituto. Asimismo quiero agradecerle su participación en la supervisión de mi trabajo en sus laboratorios y en la discusión de los resultados.

A mis compañeros de trabajo, integrantes del primer piso del INIFTA, Andrés, Sebastián, Franco, Gustavo, Laura, Gabriela, Alberto, Mario, Laura, Chino, Janina, Daniel, Mónica, Carlos, Adela, Jorge, Ezequiel, Paula J., María Eugenia, Paula B. y Norma, por todos los momentos compartidos y por su amistad.

A mis compañeros de trabajo del IBBM, Daniela, Mariano, Florencia, Laura, Augusto, Tony por los gratos momentos de trabajo compartidos.

A mis compañeros de trabajo del Instituto Engler-Bunte, Juan, Claudia M., Claudia S., Gaby, Miguel, Manoj, Yasu, Megh Raj, Sandra, Sussanne, María, Erika, Adriano, Juta por brindarme toda su ayuda y, en especial, por hacer mi estadía muy agradable, a pesar de estar tan lejos.

A Franco Cabrerizo, Gabriela Petroselli y Laura Dántola, por su desinteresada ayuda en parte de los experimentos desarrollados para este trabajo de Tesis, en particular aquellos que se realizaron con nucleótidos.

A Danie la Hozbor y Mariano Pistorio, por su valiosa ayuda en el aprendizaje de técnicas bioquímicas, en particular aquellas que permitieron la obtención y purificación de las moléculas de ácido desoxirribonucleico.

A Andrés Thomas, Claudia Martínez, Megh Raj Pokhrel, Manoj Narayana Pillai, María Isella y Sussanne Neuhror, por haberme ayudado en la realización de los experimentos de oxígeno singlete y fluorescencia.

# Indice

# PARTE I: INTRODUCCIÓN.

1	Introducción general y objetivos.	1
	Importancia del estudio de la fotofísica de pterinas.	6
	Objetivo.	8
2	Aspectos químicos y biológicos de las pterinas.	10
	Estructura química de las pterinas.	10
	Propiedades ácido-base de las pterinas.	12
	Las pterinas en la naturaleza.	14
	Conocimiento previo de los estados excitados en la literatura.	18
3	Procesos fotosensibilizados en moléculas simples y biomoléculas.	21
	Oxígeno singlete.	23
	Oxidaciones fotosensibilizadas.	29
	Fotosensibilización de nucleótidos y ácido desoxirribonucleico.	32
	Aplicaciones médicas de la fotosensibilización de ácido	
	desoxirribonucleico.	35

# PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.

4	Reactivos y preparación de soluciones.	37
	Pterinas.	37
	Nucleótidos.	39
	Ácido Desoxirribonucleico.	41
	Técnica de obtención y purificación del plásmido.	43
5	Espectroscopía electrónica.	49
	Espectros de absorción.	49
	Espectros de emisión.	51
	Espectros de excitación.	54
	Rendimientos cuánticos de fluorescencia.	55

	Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia.	58
6	Quenching de fluorescencia.	60
	Quenching dinámico.	61
	Quenching estático.	63
	Metodología para distinguir tipos de quenching.	65
7	Oxígeno singlete.	68
	Método de detección de oxígeno singlete.	69
	Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno	
	singlete.	72
	Determinación de la constante de velocidad de quenching total de	
	oxígeno singlete.	76
8	Análisis de soluciones irradiadas en forma estacionaria.	77
	Irradiación continua.	77
	Electroforesis.	79
	Cromatografía en capa delgada.	81
	Medidas electroquímicas de oxígeno.	83

## PARTE III: RESULTADOS.

9	Fluorescencia de pterinas.	85
	Espectros de absorción.	86
	Espectros de emisión.	92
	Rendimientos cuánticos de fluorescencia.	97
	Espectros de excitación.	99
	Tiempos de vida de fluorescencia.	103
	Emisión fluorescente de pterinas en soluciones fuertemente alcalinas.	107
	Titulaciones ácido-base.	111
10	Quenching de fluorescencia por aniones	115
	Estudios de emisión total.	116
	Estudio en estado estacionario por Single Photon Counting.	121
	Estudio resuelto en el tiempo por Single Photon Counting.	136

	Cálculo de las constantes bimolecular de quenching de fluorescencia.		
11	Producción de oxigeno singlete.	147	
	Quenching de oxígeno singlete por pterinas en solución acuosa.	147	
	Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete por		
	pterinas.	152	
12	Propiedades fotosensibilizadoras de las pterinas sobre bases		
	nucleicas.	159	
	Características espectroscópicas de los nucleótidos.	159	
	Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas.		
	Estudios espectrales.	160	
	Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas.		
	Estudios cromatográficos.	166	
	Efecto de oxígeno singlete.	167	
	Irradiación de nucleótidos en presencia de pterinas. Medida		
	electroquímica de oxígeno.	169	
13	Fotosensibilización de ácido desoxirribonucleico.	174	
	Estudios preliminares.	175	
	Análisis espectrofotométrico.	176	
	Análisis electroforético.	180	
	Papel del oxígeno en el mecanismo de reacción.	185	

## PARTE IV: CONCLUSIONES.

Conclusiones.

189

## PARTE V: REFERENCIAS.

Referencias.

## 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 terra, 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  $T_1$ .



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  $T_i$  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 electrónelectrón).

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 (IC), 0 de distinta multiplicidad, interna 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:

5

$M + h_V \longrightarrow$	M*	excitación
M*>	M + hv'	emisión
M*+Q →	M + Q	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

6

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 siguientes: pterina, son los 6-formilpterina, 6-carboxipterina, biopterina, neopterina v ácido fólico. Se mencionan a continuación objetivos particulares.

*A* 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.

*A 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.

*A 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.

## ASPECTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS PTERINAS

Las pterinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos ampliamente distribuida en la naturaleza, y con variadas funciones [Hopkins, 1993, Nichol *et al.*, 1995]. Los primeros trabajos científicos sobre pterinas son de fines del siglo XIX, y en ellos se publican intentos por aislar pigmentos pterínicos amarillos y blancos de las alas de ciertas mariposas [Hopkins, 1895; Hopkins, 1889a; Hopkins 1889b]. Sin embargo, F. G. Hopkins no pudo aislarlos con suficiente pureza como para caracterizar su estructura. Recién a mediados del siglo XX se propuso que eran derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina al que se llamó pteridina (Figura 2.1) [Schöpf *et al.*, 1941].

#### Estructura química de las pterinas.

Las pterinas son compuestos heterocíclicos, con una estructura común a todas de doble anillo con 10 átomos, 4 de nitrógeno y el resto carbonos. Este tetra-azo-naftaleno, llamado pteridina, puede observarse en la siguiente figura:



Figura 2.1: Pteridina: estructura básica de las pterinas y lumazinas.

De la pteridina derivan dos grupos de moléculas que se encuentran en los seres vivos: las pterinas y las lumazinas. Las pterinas poseen como sustituyentes un grupo amino en la posición 2 y un oxígeno en la posición cuatro. La molécula resultante es la 2-amino-4-pteridinona o pterina. La lumazinas, por su parte, derivan de una molécula de pteridina con un oxígeno en la posición 2 y otro en la posición 4 (2,4-pteridindiona) (Figura 2.2).



Figura 2.2: Estructura química de pterinas y lumazinas

Todas las pterinas comparten la misma estructura, llamada habitualmente doble anillo pterínico, y difieren entre sí por los sustituyentes ligados a esta estructura común. La mayor parte de las pterinas naturales poseen sustituyentes en la posición 6 (Figura 2.3). La 6-carboxipterina, por ejemplo, tiene como sustituyente un grupo carboxilo (-COOH), la 6-formilpterina tiene un grupo formilo (-CHO), la xantopterina un grupo hidroxilo (-OH), la biopterina y la neopterina poseen cortas cadenas con alcoholes, (-CHOH-CHOH-CH3 y -CHOH-CHOH-CH2OH, respectivamente). El ácido fólico tiene un sustituyente mucho más complejo que la mayoría de las pterinas naturales formado por una molécula de ácido *p*-aminobenzoico y otra de ácido glutámico (un aminoácido natural). El sustituyente se muestra en la Figura 2.4.



Figura 2.3: Estructura química de pterinas naturales (pterinas 6sustituidas).



Figura 2.4: Estructura molecular del sustituyente de la molécula de ácido fólico.

#### Propiedades ácido-base de las pterinas.

Las pterinas se comportan como ácidos débiles en las soluciones acuosas. Como publicó Albert para varios derivados de pterina, el único equilibrio pertinente en las condiciones de pH de este trabajo (4 - 12) es aquél entre el grupo amida y el fenolato (Figura 2.5) [Albert, 1953]. Por ello, en adelante, se hará referencia a estas dos formas ácido-base denominándolas "forma ácida" y "forma alcalina", respectivamente. El pKa de este equilibrio está alrededor de 8 para todas las pterinas estudiadas (Tabla 2.1) [Thomas *et al.*, 2000; Albert, 1953; Thomas et al., 1996; Cabrerizo, 2002].

Otros grupos funcionales de la estructura pterínica (por ejemplo: el grupo 2-amino) o los nitrógenos anulares tienen un pKa menor a 2 [Albert, 1953]. Otros equilibrios ácido-base son particulares de cada pterina, dependiendo de la presencia de grupos ionizables en el sustituyente del carbono 6. Por ejemplo, la 6-carboxipterina posee un equilibrio adicional, con un pKa de aproximadamente 3 [Monópoli *et al*, 2000] debido al grupo carboxilo. Tanto el comportamiento fotoquímico como fotofísico de las diferentes formas ácido-base de cada compuesto presentan diferencias significativas [Baur *et al.*, 1979; Pfleiderer *et al.*, 1984; Thomas, 2001].



Figura 2.5: Equilibrio ácido-base del anillo pterínico en soluciones acuosas de pH entre 7 y 9.

Compuesto	pKa
pterina	7.91
6-carboxipterina	7.33
6-formilpterina	7.89
ácido fólico	8.07
neopterina	8.00
biopterina	8.06

Tabla 2.1: pKa del equilibrio amida-fenolato en las pterinas.

#### Las pterinas en la naturaleza.

En la actualidad se conocen numerosas moléculas pertenecientes a la familia de las pterinas, que se encuentran en la naturaleza. Están presentes en casi todos los seres vivos en muy pequeñas cantidades, participando de variadas reacciones bioquímicas. Se las encuentra en cantidades considerables como pigmentos amarillos y blancos en las alas de diversas mariposas. El tetrahidrofolato, un derivado reducido del ácido fólico, y la tetrahidrobiopterina son los integrantes de esta familia de compuestos que más han sido estudiados en relación con su participación en reacciones metabólicas indispensables para los mamíferos; tal es así que su deficiencia produce serias alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de graves enfermedades [Rapaport, 1988]. Otras pterinas están presentes en molibdoproteinas [Pfleiderer *et al.*, 1984]. El papel que desempeñan muchas pterinas no se conoce en detalle aún.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahidrofolato, el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida de los mamíferos [Stryer, 1995].

De todas las reacciones bioquímicas en las que participan los derivados del ácido fólico las más importantes son las involucradas en la síntesis de nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos). Cuando estas reacciones se interrumpen por algún motivo, déficit de ácido fólico, por ejemplo, los ácidos nucleicos no pueden sintetizarse y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Así las células sanguíneas y la mucosa intestinal, que requieren de duplicación celular constante, se ven seriamente afectadas. De esta manera, la alteración en la síntesis de ácido desoxirribonucleico que existe en el déficit de ácido fólico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la médula ósea, que se conoce con el nombre de anemia megaloblástica. Por otra parte, se produce una atrofia de la mucosa del tubo digestivo que puede provocar un estado de malabsorción que puede, a su vez, intensificar el déficit primario.

Además del ácido fólico, otros compuestos relacionados con la familia de las pterinas participan en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, un derivado reducido de la biopterina, y ciertos derivados pterínicos azufrados son los ejemplos mejor conocidos. La biopterina participa en la transformación de la fenilalanina a tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa [Stryer, 1995]. Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasa, las cuales catalizan reacciones en las que participa el  $O_2$  disuelto en el medio. Uno de los átomos del mismo se incorpora al compuesto que se oxida (generalmente se hidroxila), mientras que el restante aparece en forma de H<sub>2</sub>O (Figura 2.6).



Figura 2.6: Participación de la tetrahidrobiopterina en la conversión de fenilalanina a tirosina.

Se ha demostrado en algunos casos y sugerido en otros la participación de diversos derivados pterínicos en procesos fotobiológicos. En un proceso

fotobiológico la luz es captada por una molécula que actúa como antena, y como consecuencia se produce una excitación electrónica en la molécula que puede conducir a cambios químicos o físicos, y, con ellos, a cambios fisiológicos. Por ejemplo, se han detectado diversos derivados pterínicos en una gran variedad de organismos en áreas expuestas a la luz como la piel de los vertebrados, tegumentos de los artrópodos o en órganos foto-sensitivos como los ojos de vertebrados e invertebrados [Pirie y Simpson, 1946].

En particular, a la fecha, es motivo de discusión su participación en algunas etapas de la fotorrecepción ocular y en la captación de la luz azul por parte de algunas plantas [Maier y Ninnemann, 1995]. En general, estos fotorreceptores son sustancias incluidas, como grupos prostéticos, en complejas estructuras proteicas que, a su vez, pueden tener otros grupos prostéticos y cofactores, necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Se ha demostrado que ciertas flavinas, formando parte de las denominadas flavoproteínas, y compuestos carotenoides cumplen este tipo de funciones en una variedad de organismos. Si bien todavía no existe evidencia concluyente, como la hay para las flavinas y compuestos carotenoides, la participación de las pterinas en respuestas fisiológicas controladas por la luz azul ha sido propuesta en varios organismos. El ejemplo mejor conocido, tal vez sea la nitrato reductasa de Neurospora, enzima que está involucrada en este tipo de procesos fotobiológicos y que contiene en su estructura tanto complejos de molibdeno con pterinas como flavinas [Klemm y Ninneman, 1979; Ninneman, 1984; Siefermann-Harms, et al.; 1985]. Asimismo, derivados pteridínicos podrían jugar un papel importante en combinación con las flavinas en ciertas especies de Phycomyses [Berns y Vaughn, 1970; Hohl et al., 1992], particularmente, se demostró la existencia de biopterina en Phycomyses blakesleeanus [Kiewisch y Fukshansky, 1991]. Por último, fue postulada la participación de las pterinas como fotorreceptores en procesos de fototaxis presentes en Euglena gracilis [Galland, et al., 1990; Schmidt, et al., 1990; Brodhum y Häder, 1990].

La luz UV de longitudes de onda menores a 320 nm es altamente nociva para los seres vivos. Mata rápidamente a las células y, entre las supervivientes, se encuentra una elevada frecuencia de mutaciones [Stanier *et al.*, 1984]. Esto explica los daños que produce la luz UV sobre la piel del ser humano y la tendencia a generar cáncer de piel en las zonas expuestas. Estos daños sobre el ácido desoxirribonucleico pueden ser reparados por diversos mecanismos enzimáticos. Uno de estos mecanismos se conoce como fotorreactivación [Kelner, 1949] y está a cargo de la enzima ADN-fotoliasa (fotoliasa) que contiene un derivado del ácido fólico. Este derivado del ácido fólico, N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-meteniltetrahidrofolato, es el que absorbe la luz UV-A que activa a otra porción de la enzima para realizar la reparación del ácido desoxirribonucleico. En exposiciones prolongadas a la luz solar se recibe tanto luz UV-C y UV-B que dañan a las moléculas de ácido desoxirribonucleico, como luz UV-A necesaria para iniciar el mecanismo de reparación de las mismas. Es decir que el daño y la reparación ocurren simultáneamente, dando lugar a una competencia que decide el destino de la célula expuesta a la radiación.

El vitiligo, una de las patologías cutáneas más frecuentes en el ser humano, consiste en un desorden en la pigmentación que produce típicas manchas blancas sobre la piel. Los pacientes que sufren esta enfermedad, muestran una característica fluorescencia en sus manchas cutáneas cuando son sometidos a la denominada examinación con luz de Wood (351 nm). Se ha demostrado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas en las zonas afectadas por la enfermedad [Schallreuter *et al.*1994b; Schallreuter *et al.*, 1994c]. Es interesante comentar el papel que juegan varios derivados pterínicos en el vitiligo.

Se mencionó anteriormente que la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina es un cofactor importante en la síntesis de tirosina. Este aminoácido es un sustrato fundamental en la síntesis de melanina (proceso conocido como melanogénesis) que ocurre en los melanocitos de la piel. La actividad de una de las enzimas más importantes la melanogénesis, la tirosinasa, regulada en es por la tetrahidrobiopterina. Pero este cofactor es oxidado a otra pterina, 6-biopterina (Figura 2.3), que es extremadamente citotóxica para los melanocitos humanos in vitro [Schallreuter et al., 1994a]. Consecuentemente, para asegurar la viabilidad de mecanismo eficiente de estas células, un muy reducción recupera la tetrahidrobiopterina. Esta reducción es catalizada enzimáticamente con la participación del radical anión superóxido generado por absorción de luz UV.

Debido a esto los melanocitos poseen las vías metabólicas para la síntesis y reciclado de la tetrahidrobiopterina.

En pacientes con vitiligo los melanocitos presentan alteraciones en el metabolismo que conducen а un aumento en la producción de tetrahidrobiopterina, la generación de agua oxigenada y a la inhibición de la síntesis de melanina. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina se oxida a 6-biopterina por reacción tanto con el oxígeno como con el agua oxigenada. En el vitiligo el mecanismo de recuperación de la 6-biopterina no es adecuado. Consecuentemente, este compuesto se acumula en zonas de la piel con déficit de pigmentación y, por ende, sin protección contra la radiación proveniente del sol.

En definitiva, todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos que sufre la biopterina en soluciones acuosas pueden ocurrir en las zonas afectadas de la piel de los pacientes con vitiligo. Se ha demostrado, recientemente, que la fotooxidación *in vivo* de la 6-biopterina, anteriormente mencionada, produce, en un primer paso, 6-formilpterina y este compuesto, a su vez, se transforma en 6-carboxipterina [Rokos et al., 2002]. Estas transformaciones generan, además, agua oxigenada como producto de fotólisis, incrementando los efectos nocivos de este compuesto.

#### Conocimientos previos sobre la fotofísica de pterinas.

En la literatura no se encuentran muchos trabajos con información fotofísica de las pterinas. La mayoría de los trabajos sobre pterinas son de carácter biomédico. También existen numerosas publicaciones sobre la caracterización y cuantificación de diversos derivados pterínicos presentes en fluidos biológicos, con aplicaciones analíticas en el campo de la bioquímica clínica.

En la década del '70 se publicaron los espectros de emisión fluorescente y fosforescente del ácido fólico en agua [Aaron y Winefordner, 1972]. El espectro de emisión es débil, mientras que la fosforescencia, que no se detecta a temperatura ambiente, se registra a 77 K.

Uno de los primeros y más importantes trabajos sistemáticos realizados sobre fotofísica de pterinas data de 1981 [Chahidi *et al.*, 1981]. En esta publicación, realizada solamente sobre pterina, se informa que dicho compuesto presenta emisión fluorescente mucho más fuerte que el ácido fólico y que el espectro de emisión es dependiente del pH. Asimismo se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia a pH 10. Se estudió la variación de los espectros de fos forescencia a 77 K con el pH, observando que la emisión fosforescente a temperatura ambiente se encuentra por debajo del límite de detección de los métodos empleados. También se muestran en este trabajo resultados de un estudio de Fotolisis de Flash, informándose los tiempos de vida para los decaimientos de los estados triplete. Se detectó el *quenching* de los estados excitados tripletes por oxígeno, indicando la posible generación de oxígeno singlete.

Más recientemente, se estudió la fotofísica de otros dos derivados, la 6,7-dimetilpterina y 6-tetrahidroxibutilpterina [Neverov *et al.* 1996]. En esta última publicación se muestran los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente y a 77 K y los espectros de fosforescencia a 77 K, junto con los correspondientes rendimientos cuánticos. En este estudio se detectó la generación de  ${}^{1}O_{2}$  por parte de ambos compuestos, midiendo la fosforescencia a 1270 nm del  ${}^{1}O_{2}$  presente en soluciones de los compuestos estudiados en agua pesada (D<sub>2</sub>O) y se informaron los correspondientes rendimientos cuánticos.

Ya en la década del '80 se conocía que las pterinas presentan emisión fluorescente. Esta propiedad ha sido una herramienta por demás útil para desarrollar muchos de los métodos analíticos de detección de pterinas [McCormack y Newman, 1985]. Los estudios analíticos de pterinas, incluso de coenzimas de ácido fólico, se ven facilitados por la absorción característica de estos compuestos en el rango UV-visible del espectro y la alta fluorescencia que presentan (el ácido fólico posee una baja intensidad de fluorescencia, pero puede ser oxidado cuantitativamente a 6-carboxipterina, que posee una intensidad de emisión mucho mayor, con permanganato en medio alcalino). En particular, se han usado, y se continúan usando en la actualidad, diversas técnicas cromatográficas en las cuales se detecta y cuantifica pterinas mediante su fluorescencia. En estudios recientes se ha evaluado la incorporación de pterinas a moléculas de ácido desoxirribonucleico en reemplazo de las bases en los nucleótidos. Esto no modifica la estructura del ácido desoxirribonucleico en forma apreciable, como lo demuestran medidas de temperaturas de fusión, debido a la gran similitud entre una molécula de pterina y la guanina. Estas moléculas de ácido desoxirribonucleico que contienen pterinas, presentan la fluorescencia característica de las mismas, herramienta por demás útil para proporcionar información sobre la estructura del ácido desoxirribonucleico y su respuesta a interacciones con otras moléculas, como por ejemplo proteínas. Cualquier interacción de un compuesto con una molécula de ácido desoxirribonucleico que contiene pterina, provoca un cambio en la fluorescencia de la misma con una alta sensibilidad [Hawkins *et al.*, 2001].

# PROCESOS FOTO SENSIBILIZADOS EN MOLÉCULAS SIMPLES Y BIOMOLÉCULAS

Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de luz por otra especie química denominada fotosensibilizador (o simplemente sensibilizador) [Scaiano, 1989].

La fotosensibilización y el *quenching* juegan un papel muy importante en muchos aspectos de la fotoquímica orgánica [Turro, 1991]. Ambos procesos pueden involucrar transferencias de energía del tipo:

 $M^* + A \longrightarrow M + A^*$ 

La transferencia intermolecular de energía de una especie a otra, conduce a la excitación de especies no absorbentes (a una longitud de onda dada), que pueden involucrarse en cambios químicos que no son posibles por absorción directa de la luz de dicha longitud de onda. Esta vía diferente de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa, y por lo tanto, se pueden observar otras reacciones químicas [Wayne y Wayne, 1996].

Este mecanismo es responsable de reacciones fotosensibilizadas y de procesos de *quenching* bi-molecular de emisión. En las reacciones fotosensibilizadas una molécula transparente (A) a la longitud de onda de excitación sufre reacción a consecuencia de su interacción con otra molécula (M) que sí absorbe. Los procesos de *quenching*, por su parte, se abordan más adelante, pero implican la desexcitación de la molécula que absorbe (M) por interacción

con otra molécula. Estos mecanismos de transferencia de energía y sus consecuencias pueden sintetizarse con las ecuaciones de la figura 3.1.



Figura 3.1: Procesos de transferencia de energía.

En esta reacción A resulta "sensibilizada" por radiación de una longitud de onda no absorbida por A sino por M. La energía de excitación es obtenida por M mediante la absorción de un fotón, para generar M\*, y posteriormente la energía se transfiere a A. Por las características de esta reacción la cantidad de energía en A\* debe ser menor a la absorbida por M. Así una molécula M\* puede ser relajada por una molécula A adecuada. La sensibilización es una técnica muy usada en química orgánica [Gilbert y Baggott, 1991]. En el esquema, Q es una tercer molécula que puede estar presente en el medio (*quencher*). Mediante un choque entre Q y A\*, A\* resulta desactivada por un mecanismo de *quenching*.

Los procesos de fotosensibilización son muy importantes en el campo de la química orgánica para generar estados tripletes. Esto se debe a que muchas moléculas orgánicas no pueden acceder fácilmente al estado triplete por absorción directa desde el estado basal singlete, a causa de sus bajos rendimientos cuánticos de producción de estados tripletes. Por otra parte, la química de estados tripletes y singletes es, a menudo, muy diferente y, frecuentemente, se necesitan generar estados tripletes para su estudio o para producir reacciones particulares. Sin embargo, la transferencia de energía entre moléculas resulta ser un camino eficiente para obtener moléculas en estado triplete.

Un fotosensibilizador de tripletes debe reunir algunas características. Un *fotosensibilizador ideal* posee las siguientes:

- Una velocidad de cruzamiento intersistemas mucho más alta que la desactivación del estado S<sub>1</sub> por otras vías.
- Una energía de triplete más alta que los aceptores, permitiendo una transferencia de energía exotérmica.
- Un tiempo de vida de triplete alto, para maximizar la eficiencia del proceso de transferencia de energía.
- Una importante absorción en la región del espectro donde el aceptor no absorbe considerablemente.
- 5) Una baja reactividad química para permitir reacciones fotosensibilizadas con un aceptor.

No existe dicho fotosensibilizador ideal. Sin embargo, puede encontrarse el fotosensibilizador adecuado de acuerdo a las características de la molécula que se pretende fotosensibilizar. El parámetro más importante al seleccionar un fotosensibilizador es la diferencia de energía entre el fotosensibilizador excitado y el aceptor excitado, porque solamente ocurrirá la fotosensibilización si la transferencia de energía es exotérmica [Turro, 1991].

#### **Oxígeno singlete**

El oxígeno es el elemento más abundante sobre la corteza terrestre, principalmente en su forma de molécula biatómica gaseosa, constituyendo el 21 % en volumen del aire seco. Por ello su presencia es casi inevitable en cualquier sistema de reacción [Foote *et al.*, 1995]. Es uno de los elementos más importantes desde el punto de vista biológico debido a que reacciones en las que participa el

oxígeno molecular proveen la fuerza termodinámica necesaria para el metabolismo de todos los organismos superiores. Su alto contenido energético, su gran reactividad y sus estados excitados, de relativamente baja energía, hacen al oxígeno molecular una especie muy importante desde el punto de vista fotoquímico.

Para entender la reactividad química del oxígeno es necesario conocer su estructura electrónica. El oxígeno atómico tiene número atómico ocho y, considerando los orbitales atómicos, una configuración  $1s^2 2s^2 2p^4$ . Los estados resultantes de considerar esta configuración electrónica pueden representarse esquemáticamente como se muestra en la Figura 3.2.



Figura 3.2: Configuraciones posibles de los orbitales 2*p* del átomo de oxígeno. Debajo de cada configuración está el símbolo correspondiente.

Según la regla de Hund el estado basal es aquél de mayor multiplicidad de spin. Por lo tanto, la primera configuración de la figura, que tiene multiplicidad 3, corresponde al estado basal. Así el átomo de oxígeno en su estado basal es un *triplete*. La segunda configuración, un singlete <sup>1</sup>D, corresponde al primer estado excitado del oxígeno atómico. La configuración <sup>1</sup>S es el segundo estado excitado, también singlete.

Para el oxígeno molecular pueden hacerse las mismas consideraciones. Con la teoría de orbitales moleculares se puede construir un diagrama para el estado basal del oxígeno molecular, que posee 16 electrones. La configuración resultante es  $(\sigma_{1s})^2 (\sigma_{1s}^*)^2 (\sigma_{2s}^*)^2 (\sigma_{2s}^*)^2 (\sigma_{2p}^*)^2 (\pi_{2p}^*)^4 (\pi_{2p}^*)^2$ . Esto da tres estados electrónicos correspondientes a tres arreglos posibles para los electrones.

El estado basal del O<sub>2</sub> es un triplete  $(^{3}\Sigma^{-})$ , paramagnético, debido a sus dos electrones no apareados. Los dos estados electrónicamente excitados

energéticamente más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son  ${}^{1}\Delta_{g}$  y  ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ . En la Figura 3.3 puede apreciarse el diagrama de energía para el O<sub>2</sub>. De los dos mencionados estados excitados sólo el de menor energía ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) parece jugar un papel significativo en reacciones en solución y es este estado al cual se denomina comúnmente oxígeno singlete o, simplemente,  ${}^{1}O_{2}$ . Se encuentra a 22,5 Kcal/mol sobre el estado basal. Esta especie emite luz fosforescente en la región del infrarrojo (1270 nm). El estado de mayor energía ( ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ ), por su parte, se desactiva tan rápidamente al  ${}^{1}\Delta_{g}$  que no tiene chances de participar en reacciones [Foote *et al.*, 1995]. El oxígeno singlete ( ${}^{1}O_{2}$ ) es, entonces, una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular ( $O_{2}$ ) y participa en numerosas reacciones de oxidación como especie activada.





Figura 3.3: Diagrama de energía para el O<sub>2</sub>.

El oxígeno singlete es una especie electrofílica sumamente reactiva y tiene la capacidad de atacar rápidamente a los compuestos orgánicos. Es alrededor de 1000 veces más reactivo que el estado basal del oxígeno. Esta mayor reactividad se debe simplemente a que numerosas sustancias con las que reacciona se encuentran en estado basal singlete, entonces la reacción es singlete-singlete, más probable que una reacción triplete-singlete, como debería ser con el oxígeno en su estado basal. Existe una gran variedad de reacciones entre las cuales pueden destacarse las siguientes: cicloadiciones [4 + 2] con 1,3-dienos para formar endoperóxidos, cicloadiciones [2 + 2] con compuestos que presentan dobles enlaces aislados para formar los correspondientes dioxoetanos y otro tipo de ataque a dobles enlaces aislados en los cuales se generan hidroperóxidos (Figura 3.4). En todas estas reacciones los productos primarios formados pueden sufrir reordenamientos para dar una amplia gama de productos oxidados estables. El oxígeno singlete reacciona *in vitro* con macromoléculas de fundamental importancia para los seres vivos [Nilsson *et al.*, 1972]. En los sistemas biológicos el oxígeno singlete causa daños a los tejidos y muerte celular al afectar estructuras subcelulares [Stanier *et al.*, 1984; Henderson y Dougherty, 1992; Straight y Spikes, 1985].



Figura 3.4: Fotooxidaciones mediadas por oxígeno singlete: (a) cicloadición [2 + 2], (b) cicloadición [2 + 4], (c) adición 1,3-eno.

El oxígeno singlete se desactiva emitiendo luz y transfiriendo su energía al solvente. Por ello su tiempo de vida es fuertemente dependiente de las características vibracionales del mismo. Los solventes con frecuencias vibracionales altas provocan una más eficiente relajación y el tiempo de vida del

oxígeno singlete en ellos es muy corto. El agua posee una fuerte vibración O-H próxima a 3600 cm<sup>1</sup>, por esta razón, el oxígeno singlete presenta un tiempo de vida mucho menor en medio acuoso (3 a 4 s [Foote y Clennan, 1995]) que en otros solventes. El reemplazo de agua común por agua deuterada (agua pesada) disminuye la velocidad de desactivación del estado singlete aproximadamente un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen (62 s [Martínez *et al*, 2000]).

La rápida desactivación del oxígeno singlete en agua indica que en los sistemas biológicos el tiempo de vida del oxígeno singlete es extremadamente corto, porque son sistemas acuosos. Además es probable que sea aún menor que en agua debido a *quenching* por los componentes de los sistemas biológicos. Puede esperarse que sobre las membranas (de composición mayoritariamente lipídica) el tiempo de vida del oxígeno singlete sea más largo, como se observa en solventes orgánicos.

Existen dos fuentes principales para generar oxígeno singlete: fotoquímica y química. Esta última implica una reacción química en la cual uno de los productos es el  $O_2$  electrónicamente excitado. Hay muchas reacciones químicas, siendo uno de los ejemplos mejor conocidos la reacción del NaClO con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se han encontrado reacciones *in vivo* que producen oxígeno singlete, como, por ejemplo, la oxidación del ión superóxido o sistemas enzimáticos capaces de generarlo.

La generación fotoquímica consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente sensibilizador, al O<sub>2</sub>. Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el O<sub>2</sub> queda en su estado excitado singlete.

En general, cuando el sensibilizador (<sup>1</sup>Sens) es una molécula orgánica, la absorción de luz genera un estado excitado singlete (<sup>1</sup>Sens\*), el cual, mediante cruzamiento intersistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete (<sup>2</sup>Sens\*) de mayor tiempo de vida (Ecuación 1). Es este estado triplete del

sensibilizador el que tiene la capacidad de transferir su energía hacia el  ${}^{3}O_{2}$  disuelto en el medio (Ecuación 2).

<sup>1</sup>Sens 
$$\xrightarrow{hv}$$
 <sup>1</sup>Sens<sup>\*</sup>  $\xrightarrow{k_{ISC}}$  <sup>3</sup>Sens<sup>\*</sup> (1)

$$^{3}\text{Sens}^{*} + {}^{3}\text{O}_{2} \xrightarrow{k_{\text{et}}} ^{1}\text{Sens} + {}^{1}\text{O}_{2}$$
 (2)

El oxígeno singlete, así formado, puede desactivarse por las dos vías mencionadas anteriormente: en forma *no radiativa*, por transferencia de energía al solvente, o *radiativa*, emitiendo luz (Ecuaciones 3 y 4, respectivamente). En general, la velocidad de esta última vía de desactivación es mucho menor que la forma no radiativa ( $k_d \gg k_e$ ). Si alguna sustancia (Q) en el medio es capaz de atrapar al oxígeno singlete, es decir, de actuar como desactivador (*quencher*) del oxígeno singlete, deben ser consideradas las posibilidades de *quenching* químico o físico (Ecuaciones 5 y 6, respectivamente).

$$^{1}O_{2} \xrightarrow{k_{d}} ^{3}O_{2}$$
 (3)

$$^{1}\text{O}_{2} \xrightarrow{k_{e}} {}^{3}\text{O}_{2} + h \nu'$$
 (4)

$$Q + {}^{1}O_2 \longrightarrow QO_2$$
 (5)

 $Q + {}^{1}O_2 \longrightarrow Q + {}^{3}O_2$  (6)

El *quenching* físico puede ocurrir principalmente por dos mecanismos: transferencia de energía y transferencia de carga. El primer mecanismo es exactamente el camino inverso a la producción fotosensibilizada de oxígeno singlete, y ocurre fácilmente si está presente una molécula cuya energía de excitación al triplete sea menor que la del oxígeno. Un ejemplo de este mecanismo puede observarse en presencia de carotenos, que tienen un papel muy importante protegiendo de daño foto-oxidativo a los sistemas fotosintéticos. El segundo mecanismo ocurre en presencia de moléculas ricas en electrones. El proceso parece ocurrir por una transferencia de cargas parcial:

$$Q + {}^{1}O_{2} \longrightarrow {}^{+}Q - O_{2}^{-} \longrightarrow Q + {}^{3}O_{2}$$

Muchas moléculas presentes en los seres vivos son capaces de generar oxígeno singlete fotoquímicamente, entre las que se encuentran las porfirinas y las flavinas. Además estas moléculas pueden ser excitadas mediante luz visible y luz UV del tipo UV-A o UV-B; es decir, que pueden excitarse por exposición a la luz solar. En consecuencia, pueden ocurrir *in vivo* procesos de fotosensibilización en los cuales se genere oxígeno singlete y, por consiguiente, las biomoléculas resulten oxidadas.

Tal como se describió en el Capítulo anterior, las pterinas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos y absorben luz UV-A y UV-B. Además, se ha sugerido la capacidad de algunos miembros de la familia de las pterinas para generar oxígeno singlete fotoquímicamente. [Chahidi et al, 1981; Ledbetter et al, 1995]. En el año 1996 fue informado el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en soluciones de 6,7-dimetilpterina y 6tetrahidroxibutilpterina [Neverov et al, 1996]. Sin embargo, no han sido publicados resultados sobre rendimientos cuánticos con otras pterinas, aún aquéllas que se encuentran más frecuentemente en sistemas biológicos como biopterina, neopterina o ácido fólico. Por otro lado, se ha propuesto la participación del oxígeno singlete en la degradación fotoquímica del ácido fólico [Thomas et al, 2000; Thomas et al, 2002]. Debido a ello, es interesante investigar la capacidad de estas moléculas para generar oxígeno singlete.

#### Oxidaciones fotosensibilizadas.

Se conoce que un organismo puede morir al ser expuesto a la luz en presencia de oxígeno y un sensibilizador adecuado [Stanier et al., 1984]. Los
efectos patológicos de la oxidación de constituyentes celulares pueden ser muy severos, incluyendo mutaciones y cáncer.

Las oxidaciones fotosensibilizadas que ocurren en presencia de oxígeno se esquematizan en la Figura 3.5. El sensibilizador excitado puede desactivarse mediante dos procesos competentes, según reaccione con el oxígeno o no. Estos mecanismos están clasificados por C. S. Foote como fotooxidaciones de Tipo I y de Tipo II [Foote, 1991].



Figura 3.5: Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y de Tipo II [Foote, 1991].

M\* puede ser un singlete o, más frecuentemente, un triplete. Puede reaccionar con el sustrato o el solvente (mecanismo Tipo I) o con el oxígeno molecular (mecanismo Tipo II). El mecanismo de Tipo I involucra una transferencia de electrones o un proceso de abstracción de hidrógeno, en donde se producen radicales o iones radicales por reacción del sensibilizador con el solvente o un sustrato (Figura 3.6). La transferencia puede ocurrir en las dos direcciones, pero generalmente el sensibilizador excitado, M\*, se comporta como oxidante. Los radicales aniones pueden, a su vez, generar, por reacción con el oxígeno, el anión superóxido, una especie intermediaria muy reactiva que puede por diversos mecanismos oxidar al sustrato. Los radicales generados por

abstracción de un átomo de hidrógeno pueden, por su parte, reaccionar directamente con el oxígeno para dar productos oxidados.



Figura 3.6: Reacciones que pueden ocurrir en fotooxidaciones de Tipo I. S representa una molécula del sovente o del sustrato. (a) Transferencia de electrones. (b) Abstracción de un átomo de hidrógeno.

El mecanismo de Tipo II es una producción de oxígeno molecular singlete por procesos de transferencia de energía, explicados en la sección anterior. El oxígeno molecular en estado basal triplete interacciona con el estado triplete excitado del sensibilizador pasando a un estado excitado singlete. De esta forma, M\* es desactivado por oxígeno produciendo oxígeno singlete. Luego esta especie reacciona con el sustrato oxidándolo.

Finalmente, en algunos casos, puede existir una transferencia de electrones desde el sensibilizador excitado hacia el oxígeno, generando una forma oxidada del sensibilizador y el anión superóxido. Esta especie reactiva puede, posteriormente, atacar a un sustrato, oxidándolo. Este mecanismo entra en la categoría de mecanismos de Tipo II, de acuerdo a la clasificación dada, debido a que el sensibilizador excitado reacciona directamente con el oxígeno.

### Fotosensibilización de nucleótidos y ácido desoxirribonucleico.

El ácido desoxirribonucleico, cuya estructura química se detalla en el *Capítulo 4*, puede ser dañado por luz UV. Es habitual dividir la luz UV en tres regiones diferentes según la longitud de onda: luz UV-A (con longitudes de onda entre 320 y 400 nm), UV-B (con longitudes de onda entre 290 y 320 nm) y UV-C (longitudes de onda menores a 290 nm). Cada región de luz UV produce diferentes daños a una molécula de ácido desoxirribonucleico y sus componentes (Figura 3.7).

La luz ultravioleta daña al ácido desoxirribonucleico en forma directa. En efecto, cuando el ácido desoxirribonucleico absorbe luz UV se producen reacciones fotoquímicas que conducen al daño de la biomolécula. Las bases pirimídicas son las más sensibles, generando básicamente dos tipos de lesiones: dímeros de pirimidina y fotoaductos de pirimidina. El daño por luz UV-C es un principalmente un proceso de dimerización, que conduce a la formación de dímeros ciclobutil-pirimidina, con dos moléculas de pirimidina unidas entre sus respectivos átomos C<sup>5</sup> y C<sup>6</sup>, formando un anillo de ciclobutano entre las dos bases. Pueden encontrase dímeros entre timina (T) y citosina (C): FT, CT, TC y C-C. Este proceso de dimerización ocurre con luz de 290 nm. A longitudes de onda más cortas, 240 nm, se revierte este daño por un proceso de monomerización, debido a que los dímeros absorben luz de longitud de onda menor a 260 nm. Un segundo tipo de daño por luz UV-C es otro tipo de dimerización en donde se producen aductos primidina-(6,4)-pirimidona. Este proceso, a diferencia del anterior, no es reversible. Existen diferentes mecanismos de reparación que involucran sistemas enzimáticos o químicos. Estos procesos conducen in vivo a la generación de mutaciones y a la alteración de las funciones de los cromosomas. Los componentes responsables de la absorción de luz en el ácido desoxirribonucleico son las bases nitrogenadas que tienen máximos de absorción cercanos a 260 nm (ver descripción química de nucleótidos y ácidos nucleicos en el Capítulo 4). Debido a esto la luz más dañina para el ácido desoxirribonucleico es la de tipo UV-C. La luz UV-B, por su parte, también

produce alteraciones, pero con menor eficiencia. Por último, el ácido desoxirribonucleico no absorbe la luz UV-A y, por ende, no es dañado directamente por ella.



Figura 3.7: Relación entre el tipo de daño al ácido desoxirribonucleico y la longitud de onda de la irradiación.

Es sabido que la radiación solar es un agente genotóxico [Ravanat *et al.*, 2001]. A pesar de que, como se mencionó, las reacciones fotoquímicas son más eficientes con luz UV-C, esta no es relevante durante la exposición a la luz solar, debido a que la luz UV-C que alcanza la superficie terrestre es filtrada por el ozono. Así la luz que llega a la tierra tiene longitudes de onda mayores a 290 nm. El componente de luz UV-B de la radiación solar es extremadamente dañino y mutagénico para el ácido desoxirribonucleico. La porción de luz de longitud de onda de 290 a 320 nm es el componente más energético de h radiación solar que llega a la superficie terrestre. De hecho, la luz UV-B ha demostrado ser muy

efectiva en la producción de cáncer de piel, en estudios con animales de laboratorio.

Sin embargo, la luz de mayor longitud de onda o luz UV-A (320-400 nm), que no es absorbida por estas moléculas es reconocida también por su capacidad mutagénica y carcinogénica. Existe evidencia de que este daño generado al ácido desoxirribonucleico ocurre mediante reacciones fotosensibilizadas en presencia de luz UV-A. Para ello se requiere la absorción de la luz UV-A por alguna otra molécula. Esta acción indirecta de la luz UV, mediada por moléculas distintas al ácido desoxirribonucleico, puede ser ocasionada por un proceso de fotooxidación, de Tipo I o Tipo II (Figura 3.5), o por una transferencia de energía. Cada uno de estos procesos conduce a distintos tipos de alteraciones químicas en el ácido desoxirribonucleico:

*Reacciones de fotooxidación Tipo I:* Las bases nucleicas son sustratos preferenciales para reacciones de fotooxidación tipo I. Las purinas tienen menor potencial de reducción que las pirimidinas, siendo la guanina oxidada más fácilmente que la adenina. Las pirimidinas tienen potenciales mayores y similares entre ellas [Ravanat *et al.*, 2001].

Reacciones de fotooxidación Tipo II: El oxígeno singlete está presente en reacciones de este tipo. Esta especie electrónicamente excitada reacciona muy fácilmente con moléculas ricas en electrones. De las cuatro bases del ácido desoxirribonucleico, la guanina es la elegida para reaccionar con el oxígeno singlete. Esta oxidación ocurre por la generación de un endoperóxido inestable que conduce a la formación de 4-hidroxi-8-oxo-4.8-dihidro-2'-deoxiguanosina. Esta base es un marcador excelente de estrés oxidativo de moléculas de ácido desoxirribonucleico, pero puede ser producido por agentes diferentes al oxígeno singlete, como peroxinitrito, radical OH, otros oxidantes. Además la 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro-2'-deoxiguanosina tiene un potencial de oxidación mucho menor que la 2'-deoxiguanosina, siendo entonces un excelente sustrato para reacciones de Tipo I y de Tipo II [Ravanat et al, 2001].

Los procesos de transferencia de energía pueden ocurrir si la energía del estado triplete del fotosensibilizador es mayor que la del estado triplete de la pirimidina. Esto conduce a la formación de dímeros de timina.

Es evidente que las bases nucleicas están expuestas a numerosas modificaciones. Estos daños deben ser reparados para evitar las mutaciones. Por ello las células han desarrollado mecanismos de reparación muy eficientes. Las lesiones que no son reparadas y perduran, pueden causar mutaciones de los genes o aún la muerte celular. A veces estas mutaciones, consecuencia de la oxidación del ácido desoxirribonucleico, pueden causar cáncer.

Todos estos procesos fotosensibilizados ocurren *in vivo* con la participación de diferentes cromóforos que actúan como sensibilizadores. Es evidente la importancia de descubrir cuáles sustancias pueden participar en estos procesos.

# Aplicaciones médicas de la fotosensibilización de ácido desoxirribonucleico.

La fotoexcitación de colorantes aromáticos en presencia de ácido desoxirribonucleico puede inducir alteraciones sobre su estructura. A pesar de que este fenómeno tiene consecuencia s indeseables *in vivo*, las mutaciones, puede usarse en aplicaciones positivas, como foto-esterilización de productos sanguíneos para transfusión [Minnock *et al*, 1996; Müller-Breitkreutz *et al*, 1995] o terapia-fotodinámica de tumores cancerígenos [Henderson y Dougherty,1992; Hönigsmann *et al*].

Las transfusiones sanguíneas están asociadas a riesgos de transmisión de infecciones virales, como HIV, virus de hepatitis A, B y C y herpes simple entre otros. La esterilización por calor de la sangre es muy efectiva y ha sido extensamente utilizada, pero provoca severos daños sobre los componentes celulares. Así la foto-descontaminación de la sangre es una de las técnicas más prometedoras para destruir los virus. Se adiciona un fotosensibilizador a una muestra de sangre y se ilumina con una fuente de luz apropiada. El fotosensibilizador no debe ser removido, debido a que se usa en una muy pequeña concentración, ya que durante el proceso de fotosensibilización no se consume. Por este método pueden esterilizarse sangre, plasma, concentrado de plaquetas y concentrados de células sanguíneas. Para algunos virus, como el parvovirus B19 y

el virus de la hepatitis A, muy resistentes a la esterilización por calor o agentes químicos, se ha observado que la foto-esterilización es un método particularmente apropiado.

La terapia foto-dinámica se utiliza para tratar patologías como infecciones virales o bacterianas, problemas de piel y, mucho más especialmente, para el tratamiento de cánceres muy localizados. El método se basa en lograr una alta concentración del colorante sólo en la zona afectada, y someterla a luz UV o visible que lleven a la destrucción de las células dañadas. La mayor ventaja de este método es la posibilidad de irradiar un área muy bien definida, mediante láser fibras ópticas, sin dañar el tejido circundante. Sin embargo, los 0 fotosensibilizadores actualmente en uso, porfirinas y hematoporfirinas, tienen algunos efectos secundarios. siendo ello necesario por encontrar fotosensibilizadores más adecuados.

No es el objetivo final de este trabajo de tesis encontrar aplicaciones inmediatas de la fotosensibilización de ácido desoxirribonucleico, pero sí se pretende caracterizar fotofísicamente a un conjunto de sustancias orgánicas presentes en los seres vivos, en principio no tóxicas para ellos, con potencial para actuar como fotosensibilizadores.

# Capítulo 4

# **REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

## Pterinas

Con el fin de realizar estudios comparativos de las propiedades de las pterinas, se utilizaron los siguientes compuestos: pterina, 6-carboxipterina 6-formilpterina, neopterina, biopterina y ácido fólico. Las pterinas usadas fueron sintetizadas y provistas por el Laboratorios Shircks (Suiza). En ningún caso se realizó purificación posterior.

*Preparación de soluciones de pterinas:* las soluciones se prepararon pesando cantidades adecuadas de compuesto sólido, y luego disolviéndolos en soluciones acuosas de Na(OH) diluidas. Esto favorece la disolución, debido a que en medio alcalino, tal como se explicó en el *Capítulo 2*, todas las pterinas presentan al menos un grupo ionizado (fenolato) y, por ende, su solubilidad es mayor que en soluciones ácidas o ligeramente ácidas. Posteriormente, se ajustó el pH de la solución en aproximadamente 11, mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución de Na(OH) 0,5 M y, por último, se llevó al volumen final mediante el empleo de matraces. La soluciones se conservan en heladera a pH = 11 y se verificó la estabilidad tomando los espectros de absorción antes de cada medida.

Las soluciones fueron preparadas a distintas concentraciones, según la técnica en la cual serían empleadas. Por ejemplo, en algunos casos, como ciertas medidas de fluorescencia que requieren valores pequeños de absorbancia, se emplearon valores cercanos a  $10^{-5}$  M. En otros casos se requieren concentraciones cercanas a la saturación (alrededor de  $10^{-3}$  M en medio alcalino). La mayor parte de los experimentos realizados para este trabajo de tesis se llevó a cabo

empleando valores de concentraciones comprendidas entre los dos valores mencionados ( $10^{-5} - 10^{-3}$  M).

La concentración de las soluciones empleadas en los distintos experimentos de determinó, según el caso, por alguno de los siguientes métodos: a) calculándola a partir de la cantidad de sólido pesado, el volumen de solución y el peso molecular del compuesto; b) calculándola a partir del factor de dilución y la concentración (calculada según a) de una solución más concentrada; y c) calculándola a partir de medidas de absorbancia y los correspondientes valores de los coeficientes de extinción molar (ɛ) [Thomas, 2001].

El pH de las soluciones acuosas se ajustó agregando microlitros de soluciones concentradas de HCl o NaOH. Las medidas de pH se realizaron con medidores de pH provistos de un electrodo de vidrio combinado (pH-*meter* Metrhom y pH- *meter* Schott CG 843P). La calibración de los equipos se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00; 10,00 y 12,00.

No se utilizaron soluciones reguladoras para ajustar el pH de las soluciones a consecuencia de que las propiedades fluorescentes de las pterinas se ven afectadas por un gran número de ellos. Los estudios del *quenching* de fluorescencia de las pterinas por aniones presentes en soluciones reguladoras de uso frecuente están incluidos en este trabajo de tesis y los resultados se exponen en el *Capítulo 10*.

Para facilitar el análisis de los resultados experimentales obtenidos fue conveniente realizar los mismos en condiciones tales que existiera una sola forma ácido-base del compuesto en estudio. Teniendo en cuenta lo expuesto en el *Capítulo 2* puede deducirse que ajustando el pH en un valor mayor a 10, más del 99 % de las moléculas de los derivados pterínicos estarán en su forma alcalina. Por el contrario, fijándolo en un valor menor que 6 más del 99 % estarán en su forma ácida, a excepción de la 6-formilpterina que posee un pKa de 7.3, con la cual debe fijarse un valor de pH ligeramente menor, para obtener el mismo resultado. Por otro lado el pH no debe ser menor que 4, para evitar la presencia de otras formas ácido-base (ver *Capítulo 2*). En particular, para la 6carboxipterina y

el ácido fólico el pH no debe ser menor a 5.0, para evitar la protonación de los grupos carboxilos.

# Nucleótidos.

Los nucleótidos, como tales, participan de diversas funciones en el metabolismo celular, y los polímeros de los nucleótidos, los *ácidos nucleicos*, son los depositarios moleculares de la información genética. La estructura de todas las proteínas es producto de la información contenida en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de las células [Lehninger, 1985]. Además, los nucleótidos son moléculas ricas en energía que dirigen los procesos metabólicos de las células. Actúan como señales químicas y son componentes estructurales de ciertas enzimas e intermediarios metabólicos.

Los nucleótidos están formados por una base nitrogenada, un azúcar y uno o más grupos fosfatos. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es polímero de *desoxirribonucleótidos*. El azúcar de lo desoxirribonucleótidos es la 2'-desoxirribosa (Figura 4.1). El prefijo *desoxi* significa que este azúcar carece de un átomo de oxígeno, respecto de la ribosa.



Figura 4.1: Estructura química de la desoxirribosa.

La base nitrogenada de los desoxirribonucleótidos puede ser una purina o una pirimidina. El ácido desoxirribonucleico tiene cuatro bases, bases púricas (derivadas de la purina) la *adenina* (A) y la *guanina* (G), y bases pirimídicas (derivadas de la pirimidina): la *citosina* (C) y *timina* (T). Las estructuras químicas de estos compuestos pueden apreciarse en la Figura 4.2.



Figura 4.2: Estructura química de las bases púricas y pirimídicas que forman parte de los nucleótidos del ADN.

En un desoxirribonucleótido el átomo de C-1' de la desoxirribosa se enlaza con el N-1 de las pirimidinas o con el N-9 de las purinas, formando un enlace N-glicosídico  $\beta$ . El signo prima (') se usa habitualmente para diferenciar posiciones sobre el azúcar de posiciones sobre las bases. Una base unida a la desoxirribosa es un *nucleósido*, mientras que el éster fosfórico de un nucleósido es un *nucleótido*. La posición más frecuente de la unión éster en los nucleótidos naturales es el grupo hidroxilo del C-5' del azúcar. Este compuesto se denomina *nucleósido-5'-fosfato* o *5'-nucleótido*. En la Figura 4.3 se muestran las estructuras químicas de los nucleótidos presentes en el ácido desoxirribonucleico, junto a su nomenclatura.

En los experimentos de fotosensibilización de nucleótidos por pterinas realizados para este trabajo de Tesis, se utilizaron los siguientes nucleótidos: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato provistos por Sigma en pureza del 99 %, 99 % y 98 %, respectivamente. A partir de los nucleótidos sólidos se prepararon soluciones acuosas para realizar los experimentos.



2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP)



2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP)

2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP)

Figura 4.3: Estructura química de los nucleótidos presentes en el ADN.

#### Ácido desoxirribonucleico.

La estructura del ácido desoxirribonucleico fue propuesta por Watson y Crick en 1953, sobre la base de datos de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin. El ácido desoxirribonucleico está compuesto por dos cadenas de polinucleótidos helicoidales con giro a la derecha que forman una doble hélice alrededor de un eje central. Las bases se disponen en el centro de la hélice en forma perpendicular al eje. Ambas cadenas se unen entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre pares de bases. Las bases se unen entre sí de una sola forma: la guanina se une a la citosina y la adenina a la timina, a razón de tres y dos puentes de hidrógeno respectivamente.

Para realizar estudios de fotosensibilización de moléculas de ácido desoxirribonucleico por pterinas, se eligió una molécula de ácido

desoxirribonucleico que permitiera obtener un grado de reproducibilidad adecuado, con actividad biológica fácilmente evaluable en el laboratorio. Los estudios se centraron en moléculas de ácido desoxirribonucleico relativamente pequeñas y de bajo peso molecular, que se pueden obtener en el laboratorio en grado de pureza adecuado. Estas moléculas, denominadas *plásmidos*, son moléculas de ácido desoxirribonucleico circulares, presentes en ciertas bacterias. Los plásmidos son elementos genéticos transmisibles, más pequeños que los cromosomas, que tienen los genes necesarios para su propia replicación y otros que le confieren características especiales a las bacterias que los poseen [Stanier et al, 1984].

El ácido desoxirribonucleico utilizado en este trabajo fue *plásmido pUC18*, un plásmido de 2690 pares de bases (bp) obtenidas en el *Instituto de Bioquímica y Biología Molecular* (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. La obtención de cantidades adecuadas de este plásmido con un grado de pureza aceptable requiere el empleo de una metodología relativamente compleja. Por ello se dedicará esta sección para desarrollar las técnicas utilizadas en dicha obtención.

Se eligió para trabajar una molécula de plásmido, V no ácido desoxirribonucleico cromosómico bacteriano, debido a que son, también, moléculas de ácido desoxirribonucleico de doble hebra, pequeñas, de más fácil obtención, purificación y manipulación. Por otra parte, el plásmido se puede elegir según las nuevas propiedades que le confiera a la bacteria, como, por ejemplo, la resistencia a un antibiótico, producción de toxinas, etc. Una bacteria puede no tener copia de un plásmido o tener varias copias del mismo. Además, el plásmido contiene sitios específicos sobre su secuencia de nucleótidos que pueden ser atacados por enzimas de restricción (enzimas que producen cortes sobre una secuencia específica del ácido desoxirribonucleico).

Los plásmidos pueden presentar varias formas espaciales diferentes debido a su forma circular, característica importante para el presente trabajo. Estas macromoléculas tienen un número de vueltas de hélice característicos de una hebra sobre la otra, pero al unir los extremos este número de vueltas puede ser igual, mayor o menor generando una estructura espacial diferente en cada caso. Si

el número de vueltas es igual en la molécula circular y en la lineal, el plásmido se considera que está relajado. Si el número de vueltas en la estructura circular es mayor que en la lineal se considera que está superenrollado. Una molécula de ácido desoxirribonucleico superenrollado es más compacta que una relajada de la misma longitud. A consecuencia de ello la molécula superenrollada se mueve más rápido en una electroforesis que una relajada. Así en una electroforesis de ácido desoxirribonucleico plasmídico pueden observarse varias bandas de distinta movilidad electroforética, mientras que con moléculas lineales de igual tamaño siempre se observa una sola banda [Stryer, 1995].

# Técnica de obtenció n y purificación del plásmido.

El plásmido pUC 18 puede adquirirse comercialmente de laboratorios especializados. Sin embargo, se descartó trabajar con este tipo de material porque las muestras comerciales poseen un alto contenido de proteínas y soluciones reguladoras de pH cercano a 8. El tratamiento de purificación es posible en el laboratorio. pero siempre introduce daño mecánico sobre el ácido desoxirribonucleico conduciendo a la formación de formas relajadas en una cantidad comparable al que se obtiene directamente en el laboratorio. Por otro lado el costo del ácido desoxirribonucleico comercial es muy elevado, siendo injustificado para los experimentos a realizar.

Se procedió a la obtención de plásmido tipo pUC, transformando bacterias *Escherichia coli* (es decir, incorporándoles el plásmido). Estas bacterias son de uso muy habitual en los laboratorios de microbiología. El plásmido elegido para los experimentos de este trabajo, pUC18, hace a estas bacterias resistentes a un antibiótico, la ampicilina, que se utilizó para seleccionar aquellas bacterias que poseen el plásmido de las que no lo poseen.

El plásmido elegido se recuperó de una cepa de bacterias *Escherichia coli* no viables (sin capacidad para reproducirse) que se encontraban disponibles en el laboratorio que contenían el plásmido pUC18. Debido al carácter no viables de las bacterias de partida, se debió obtener de ellas una pequeña cantidad del plásmido para transferirlo a bacterias viables. Esto es posible por el pequeño tamaño del plásmido, ya que el ácido desoxirribonucleico cromosómico, de mayor tamaño se encuentra degradado. De esta manera se pudo obtener de una mayor biomasa una importante cantidad del plásmido (del orden de los miligramos) para los experimentos fotoquímicos y fotofíscos de este trabajo en que se utilizó ácido desoxirribonucleico.

Para extraer el plásmido se recurrió a una técnica de precipitación selectiva de ácido desoxirribonucleico plasmídico, que se describe a continuación:

1) Se resuspenden las células en un solución reguladora Tris-EDTA.

2) Se agrega una solución de dodecilsulfato de sodio o SDS (detergente) e NaOH. Esta solución lisa las bacterias (rompe sus membranas celulares) y, entonces, se libera su contenido. Deben evitarse las agitaciones bruscas para que el ácido desoxirribonucleico cromosómico quede unido a las membranas y pueda ser separado por precipitación del ácido desoxirribonucleico plasmídico.

*3)* Se centrifuga. El sobrenadante contiene todas las sustancias intracelulares solubles, incluyendo el plásmido.

*4)* Para obtener el plásmido se agrega isopropanol que lo vuelve insoluble. Se centrifuga, y el precipitado se lava con etanol.

5) Se resuspende en agua esterilizada.

Este ácido desoxirribonucleico puede ser introducido en células adecuadas (proceso de transformación) y amplificarse muchas veces utilizando el mecanismo de replicación de estas células [Stanier et al, 1984]. La mayoría de las bacterias incorporan del medio moléculas de ácido desoxirribonucleico, pero con una eficiencia muy baja. En condiciones experimentales adecuadas pueden transformarse una cantidad importante de células. La transformación de bacterias requiere primero la obtención de células competentes. Estas células son bacterias a las cuales se les modifica la pared celular para posibilitar la incorporación del plásmido. Para obtener las células competentes se debe seguir una serie de pasos que se detallan a continuación:

1) Debemos obtener células bacterianas que se encuentren en su fase de crecimiento exponencial, debido a que en dicha fase las células son más sensibles a agentes físicos y químicos adversos. De esta forma, será más fácil modificar las

membranas bacterianas. Para ello a partir de un cultivo saturado de células, se realiza una dilución en un medio de cultivo fresco y se incuba a 37 °C. Se sigue el crecimiento por medidas de absorbancia a 550 nm.

2) Cuando la  $A_{550}$  se encuentra entre 0.2 y 0.4 se detiene el crecimiento introduciendo el recipiente en hielo durante un tiempo. Luego se centrifuga, manteniendo la temperatura a 0°C, para separar las bacterias del medio de cultivo.

3) En esta etapa se inicia el proceso para alterar las membranas celulares agregando, en dos pasos, primero  $Cl_2Ca$  y luego  $Cl_2Mg$ . Estas etapas se realizan manteniendo permanentemente las células a 0°C.Los iones  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  aumentan la permeabilidad de las membranas celulares.

*4)* Las células así tratadas ya pueden transformarse. Estas bacterias pueden almacenarse si se evita su posterior crecimiento, debido a que las membranas celulares se recuperan si esto sucede. Para ello se conservan en glicerol a temperaturas de  $-70^{\circ}$ C o inferiores.

Tanto la obtención de células competentes como su posterior transformación presentan dificultades de origen experimental. Esto se debe a que las células cuya pared celular está debilitada, son muy lábiles y pueden perder fácilmente su capacidad de reproducirse. También es frecuente que se recuperen de esta modificación, regenerando su pared celular, y en consecuencia no pueden ser transformadas.

Con las células competentes obtenidas se procedió a su transformación, con el siguiente protocolo:

*I)* Se coloca 100 a 200  $\mu$ l de bacterias competentes con 5  $\mu$ l de la solución del plásmido, manteniendo todo siempre en hielo. Se incuba durante 30 minutos.

2) Se realiza un *shock* térmico durante 2 minutos a una temperatura entre 42 - 45 °C. Se coloca nuevamente en hielo durante 5 minutos.

*3)* Se agrega a la mezcla 1 ml de medio de cultivo. Se incuba a 37 °C durante 1 hora.

*4)* Para seleccionar las bacterias que incorporaron el plásmido se realiza un cultivo en placa con un medio que contiene antibiótico. Se siembra un volumen conocido de la mezcla para poder calcular la eficiencia de la transformación.

En los primeros intentos de transformar esas células competentes la eficiencia de transformación fue cercana a  $10^3 - 10^4$  (Eficiencia de transformación: bacterias transformadas por microgramo de plásmido). Estos valores de eficiencia de transformación no dan la seguridad de que las bacterias que crecen en el medio con ampicilina sean bacterias que hayan incorporado el plásmido, sino que puede deberse a mutaciones espontáneas del genoma bacteriano. En consecuencia, la preparación de células competentes debió reiterarse varias veces hasta obtener aquéllas con las cuales la eficiencia de transformación sea la adecuada  $(10^6-10^7, o mayores)$ .

Una vez obtenidas y seleccionadas las bacterias transformadas, la siguiente etapa es la obtención de las moléculas de plásmido. Como las bacterias transformadas en estas condiciones son resistentes a la ampicilina, solamente aquellas bacterias que incorporaron el plásmido crecerán en un medio con este antibiótico y por ello se eligen medios de cultivos que lo contengan.

Se prepara un medio de cultivo líquido (para obtener una mayor biomasa) con ampicilina, y se inocula con las bacterias transformadas. Se incuba a 37°C hasta saturación del cultivo.

Se obtuvo una gran biomasa de bacterias y de ellas el plásmido. Éste se extrajo con la técnica de extracción de ácido desoxirribonucleico plasmídico que se detalló anteriormente. Posteriormente se purificó en dos etapas:

1) tratamiento con una enzima que degrada ácido ribonucleico (ARN), ARNasa, para eliminar restos de ácido ribonucleico, que habitualmente se extrae con el ácido desoxirribonucleico;

2) purificación con fenol para eliminar aquellas proteínas que coprecipitan.

En esta etapa de purificación se presenta el inconveniente asociado a que las técnicas usadas en biología molecular están pensadas para cantidades muy pequeñas de ácido desoxirribonucleico (del orden del µg). Esto requirió de modificaciones en el protocolo de preparación y purificación estándar para plásmidos con el fin de obtener una cantidad de muestra de un orden 1000 (mil) veces mayor. Este protocolo fue desarrollado como parte de este trabajo de tesis.

La pureza del plásmido se determinó por corridas electroforéticas en geles de agarosa y por medidas de Absorbancia a 260-280 nm. La relación de absorbancias  $A^{260}$  /  $A^{280}$  debe estar entre 1.8 y 2.0 para aceptar que el ácido desoxirribonucleico obtenido tiene una pureza adecuada. Previo a la purificación esta relación no se cumple por la presencia de impurezas como proteínas. Las proteínas absorben fuertemente a 280 nm, por ello su presencia, aunque sea en muy pequeña cantidad, disminuye apreciablemente la relación de absorbancias.



Figura 4.4: Espectro de absorción de una solución de plásmido pUC18 obtenido en el laboratorio a pH= 6.5. Camino óptico 1 cm.

Las corridas electroforéticas en geles de agarosa se revelan con bromuro de etidio, compuesto radioactivo que se une selectivamente a los ácidos nucleicos, ya sean ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. Si el ácido desoxirribonucleico está impurificado con ácido ribonucleico veremos en el gel una banda muy extendida, característica, de estas moléculas. De esta forma podemos evaluar la presencia de ácido ribonucleico en nuestra solución. Es usual que coprecipite ácido ribonucleico con el ácido desoxirribonucleico, por ello se trata la muestra con ARNasa, previamente a la purificación para eliminar proteínas.

En la siguiente etapa de la purificación, se eliminan las proteínas (que siempre co-precipitan con el ácido desoxirribonucleico) agregando fenol en soluciones acuosas. En estas condiciones se forma un sistema de dos fases, donde el ácido desoxirribonucleico permanece en la fase acuosa que sobrenada. En la interfase se forma un coagulo o gel que contiene las proteínas, permitiendo su separación. La ARN-asa utilizada en la primera etapa de purificación también es una proteína, y en consecuencia se elimina en esta etapa.

Una vez purificado el plásmido se puede evaluar la pureza del mismo por medidas de absorbancia. El espectro del ácido desoxirribonucleico, como puede verse en la Figura 4.4, presenta una banda característica a longitudes de onda menores de 300 nm. Si el ácido desoxirribonucleico está bien purificado debe cumplir con la relación de absorbancias ya mencionada. Si se cumple esta relación la absorbancia a 260 nm nos permite conocer la concentración del ácido desoxirribonucleico ya que se acepta que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 miligramos por litro.

Como puede observarse en la Figura 4.4 se obtuvo soluciones de plásmido pUC 18 muy puras que cumplen muy bien con la relación de absorbancias. En los geles no se observa la presencia de ácido ribonucleico.

# ESPECTROSCOPÍA ELECTRÓNICA

Existen numerosas técnicas espectroscópicas que permiten estudiar los estados excitados de las moléculas orgánicas. En particular, los espectros de absorción y emisión de una molécula proveen información fundamental sobre la estructura, estado energético y dinámica de los estado excitados [Lakowicz, 1983]. En este Capítulo se detallan los métodos espectroscópicos empleados para el estudio de los estados excitados de las pterinas en solución acuosa. También se explica que información se obtiene con cada técnica y cómo se analiza la misma.

#### Espectros de Absorción.

Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la luz incidente. Un espectro de absorción muestra que longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas en el espectro dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados energéticos de una molécula. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto. Sin embargo, es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, formas ácido-base diferencias en sus espectros de absorción.

Para obtener un espectro de absorción se requiere de un equipo que posea una fuente de luz estable, con capacidad de variar la longitud de onda en forma continua en la región UV-visible del espectro electromagnético. Debe poseer también un detector capaz de responder linealmente con la intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra. La muestra puede encontrarse en fase gaseosa, líquida o sólida, pero usualmente se encuentra en soluciones diluidas, contenidas en celdas de vidrio o cuarzo. La celda debe ser transparente a la radiación, por ello el uso de celdas de cuarzo es esencial para longitudes de onda menores que 300 nm. Si la muestra se encuentra en solución, debe realizarse una corrección por el solvente, debido a que el mismo puede presentar absorción UV-visible.

Los espectros de absorción se obtuvieron con espectrofotómetros *Cary 3* y *Cary 5 (Varian)*. Estos equipos permiten obtener espectros entre 190 y 900 nm. Son espectrofotómetros de barrido de doble haz y simple haz, respectivamente, provistos con programas adecuados para registrar y almacenar espectros. Estos programas también promedian señales que permiten suavizar los espectros cuando la relación señal / ruido es desfavorable. Los espectros se realizaron utilizando agua como blanco. Se utilizaron celdas de cuarzo, y, según la absorbancia de la muestra, se eligieron celdas de diferentes caminos ópticos: 0.1, 0.2 cm o 1 cm.

Además de brindar información sobre los estados excitados de las pterinas, los espectros de absorción en este trabajo fueron una herramienta fundamental para fijar condiciones experimentales y para detectar y controlar cambios químicos como consecuencia de la irradiación o reacciones térmicas. Los cambios espectrales observados pueden ser indicativos de cambios químicos, y los espectros de absorción de las moléculas que aquí se estudian son muy sensibles a alteraciones en su estructura química.

Como metodología adecuada para evaluar cambios químicos, los espectros de absorción se tomaron en cada experimento de irradiación continua (método que se describe en el *Capítulo 8*) y se analizaron los *espectros diferencia* [Thomas, 2001]. Los espectros diferencia se obtienen al restar a todos los espectros de absorción absolutos obtenidos a distintos tiempos de irradiación el espectro de absorción de la solución antes de ser irradiada. Con este análisis pueden observarse los puntos isosbésticos y analizar su constancia en el tiempo. Si está ocurriendo un proceso único los puntos isosbésticos se mantienen en el tiempo.

También se utilizaron espectros de absorción normalizados y espectros diferencia normalizados. Los espectros normalizados se obtienen al dividir las absorbancias a cada longitud de onda por un número arbitrario conveniente. En este trabajo siempre se eligió el valor máximo de absorción.

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo anterior, en ciertos experimentos se emplearon medidas de absorbancia para determinar la concentración de derivados pterínicos en solución. Asimismo, los espectros de absorción se usaron para controlar la estabilidad de las soluciones almacenadas. En muchos experimentos se recurrió a las medidas de absorbancia para fijar la concentración y / o absorbancia de una solución a determinada longitud de onda. En todos estos casos se tomaron espectros de absorción antes de cada experimento.

## Espectros de emisión.

Un espectro de emisión es un registro de intensidad de la emisión como función de la longitud de onda de la luz emitida. Los espectros de emisión son muy variables y dependen de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma está disuelta [Lakowicz, 1983]. Los espectros de emisión se observan cuando una molécula excitada pierde el exceso de energía radiativamente. Puede observarse las diferencias de energías que existen entre los estados involucrados en la transición. Tanto los espectros de absorción como los de emisión dan información relacionada con los niveles de energía de las moléculas, pero hay consideraciones prácticas a tener en cuenta para elegir una u otra técnica.

Como se explicó en el *Capítulo 1*, hay dos formas de emitir la radiación: *fluorescencia* y *fosforescencia*. Ambas pueden distinguirse experimentalmente observando el tiempo de vida del estado excitado. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de interrumpir la irradiación  $(10^{-9} - 10^{-6} \text{ seg.})$ , mientras que la fosforescencia se prolonga durante un período más largo que el observado para la fluorescencia. Se observa característicamente que la radiación de fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la correspondiente a la radiación incidente. Esta pérdida de energía, fenómeno conocido como corrimiento de Stockes, se debe a disipación de energía vibracional, a redistribución de electrones en moléculas del solvente, re-orientación de las moléculas de solvente e interacciones entre la molécula absorbente y las moléculas del solvente [Lakowicz, 1983].

Como ya se mencionó en el *Capítulo 1*, ocasionalmente la molécula excitada puede, por reordenamiento electrónico, sufrir cambios que le permiten alcanzar un estado triplete. Las propiedades de una molécula en el estado triplete excitado difieren considerablemente de las propiedades de la misma en estado singlete. Por otra parte una transición triplete-singlete resulta muy poco probable, sin embargo, usualmente ocurre por un proceso denominado *"cruzamiento intersistemas"*. A pesar de que estas transiciones  $(T_1 \rightarrow S_0)$  son menos probables, ocurren y la emisión resultante es la fosforescencia. Sin embargo, el tiempo para que la población de moléculas en estado  $T_1$  se desexcite y regrese al estado basal  $S_0$  es mayor que desde un singlete excitado.

Para obtener un espectro de emisión se necesita un equipo con una fuente de luz UV-visible. La longitud de onda de excitación se selecciona haciendo pasar el haz de luz por un monocromador de excitación. La muestra, que se coloca en celdas de vidrio o cuarzo, recibe la radiación de excitación en una cara de la misma, y emite por fluorescencia. La radiación emitida se observa perpendicularmente a la radiación de excitación, en un segundo monocromador de emisión que la dispersa y cada longitud de onda transmitida es detectada por un detector.

Para obtener los espectros de emisión se utilizó un equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)*. Este equipo puede realizar tanto medidas de estado estacionario (espectros de emisión, espectros de excitación) como medidas resueltas en el tiempo (determinación de tiempos de vida de estados excitados). Para realizar ambos tipos de experimentos cuenta con dos lámparas diferentes: una pulsada y otra estacionaria. Para realizar los espectros de emisión utiliza la lámpara estacionaria de alta presión de xenon (419 Kw).

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en soluciones acuosas. Se empleó una celda de cuarzo de 1 cm longitud de camino óptico. La temperatura de las muestras  $(24.0 \pm 0.2 \text{ °C})$  se reguló con la ayuda de un dispositivo de circulación de agua conectado a un termostato. Se registraron los espectros de emisión corregidos (el equipo corrige automáticamente la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión) entre 360 y 650 nm, excitando con luz de longitud de onda correspondiente a la banda de menor energía de la pterinas (350 nm). Sin embargo, algunos experimentos se realizaron excitando las muestras con otras longitudes de onda, con el objetivo de estudiar la influencia de la longitud de onda de excitación sobre los espectros de emisión.

Todas las medidas realizadas en el equipo *Single Photon Counting* utilizado en el presente trabajo se realizaron en el *Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe*, en el marco de un convenio de colaboración entre dicho Instituto y el grupo de Cinética y Fotoquímica del *Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas*, INIFTA (SECyT-BMFB).

También se realizaron medidas de emisión el emple ando espectrofotómetro Cary 3, que cuenta con un accesorio especial para este fin. Este equipo no permite realizar espectros de emisión porque no posee un dispositivo capaz de cuantificar la luz emitida por la muestra a distintas longitudes de onda. Sin embargo, puede cuantificar la emisión total entre 200 y 700 nm. La longitud de onda de excitación, por su parte, puede seleccionarse. Esta técnica es muy útil para realizar experimentos rápidos que permiten evaluar y comparar la emisión de diferentes soluciones. Estas medidas se emplearon en experimentos preliminares que permitieron luego diseñar los estudios sistemáticos con la técnica Single Photon Counting.

En todos los experimentos realizados en el Cary 3 se utilizaron celdas para fluorescencia de 1 cm x 1 cm y de 1 cm x 0.4 cm. La luz de excitación utilizada fue de 340 nm, el ancho de rendija 0.4 cm.

### Espectros de excitación

Los espectros de excitación registran la intensidad de la emisión a una frecuencia dada como función de la longitud de onda de la luz de excitación. La excitación se realiza con luz de longitud de onda variable e intensidad fija.

El espectro de excitación se puede presentar representando el rendimiento cuántico de emisión relativo a cada longitud de onda de excitación. Generalmente, la mayoría de las moléculas fluorescentes tiene rendimientos cuánticos y espectros de emisión independientes de la longitud de onda de excitación. En consecuencia, el espectro de excitación de una molécula fluorescente se superpone a su espectro de absorción [Lakowicz, 1983].

El equipo empleado en la determinación de los espectros de excitación de las pterinas en solución acuosa fue el mismo que el utilizado para obtener los espectros de emisión. La presencia de los dos monocromadores permite el registro de los dos diferentes tipos de espectros. Como se detalló en la sección anterior el espectro de emisión de una muestra se registra manteniendo el monocromador de excitación en una longitud de onda fija. Por el contrario, para obtener el espectro de excitación debe mantenerse el monocromador de emisión a una longitud de onda fija a la cual emite la muestra, que generalmente coincide, o está muy próxima, con el máximo de emisión. El movimiento del monocromador de excitación permite seleccionar la longitud de onda de la radiación absorbida por la muestra. Así se puede medir la intensidad de emisión a una longitud de onda dada como función de la longitud de onda de excitación.

La intensidad de la luz incidente varía con la longitud de onda debido a que la lámpara no provee una misma intensidad de luz en todo su espectro de emisión. Entonces los espectros de excitación resultan distorsionados por dicho motivo. Por lo tanto, se debe realizar una corrección de la señal de intensidad de la emisión de la muestra transformándola en una señal proporcional al número de fotones incidentes. Para ello se usan referencias, a modo de contadores de fotones, como rodamina B, fluoresceína o bisulfato de quinina, según el rango de longitudes de onda necesario. El máximo de emisión y el rendimiento cuántico de emisión de estas referencias es independiente de la longitud de onda de la luz incidente, en determinados rangos del espectro, por lo que proveen una emisión, a longitud de onda constante, proporcional al flujo de fotones de la luz incidente.

Los espectros de excitación de los derivados pterínicos estudiados se tomaron empleando rodamina B en etilenglicol (3 g/l) como referencia. Este compuesto es adecuado para ser utilizado como referencia en el rango comprendido entre 220 y 600 nm [Lakowicz, 1983]. El espectro de emisión de la rodamina B. Los espectros se obtuvieron excitando con luz entre 230 y 440 nm, y se registró la emisión a 450 nm, longitud de onda cercana al máximo de emisión de las pterinas en solución acuosa.

# Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

En fotoquímica existen dos leyes fundamentales. La primera ley fue formulada por Grotthuss y Draper y dice que *sólo la luz absorbida por una molécula puede producir cambio fotoquímico en la misma*. Se enfatiza luz absorbida, es decir, que la luz que simplemente pasa por el sistema no produce cambio alguno. La evolución de la teoría cuántica llevó a Stark y Einstein a complementar esta ley, originando la segunda ley de la fotoquímica: *si una especie absorbe radiación, por cada cuanto de energía absorbido se excita una molécula*. Esto indica que un solo fotón es responsable del cambio fotoquímico en una molécula. Sobre la base de estas dos leyes fundamentales se puede definir el término rendimiento cuántico.

Los rendimientos cuánticos dan cuenta de la eficiencia de un proceso en términos de la cantidad de energía lumínica absorbida. Se puede expresar el rendimiento cuántico de un proceso fotofísico, como la fluorescencia ( $\Phi_F$ ), en términos del número de moléculas fluorescentes respecto de los fotones de luz absorbidos:

$$\Phi_{\rm F=}$$
 Nro moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y por unidad de volumen  
Nro de cuantos absorbidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida ( $I_A$ ) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente ( $I_F$ ), se puede escribir:

$$\Phi_{\rm F} = \frac{I_{\rm F}}{I_{\rm A}}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia,  $\Phi_F$ , de especies moleculares (d) puede ser determinado experimentalmente por comparación de la intensidad de fluorescencia, I<sub>F</sub>, medida como el área debajo del espectro de fluorescencia corregido (I<sub>d</sub>) y la intensidad de fluorescencia, medida de la misma forma, de una solución de una referencia de rendimiento cuántico conocido (I<sub>st</sub>). Como la cantidad de fotones absorbidos por la muestra y la referencia puede ser distinta, debe realizarse una corrección teniendo en cuenta las absorbancias de ambas sustancias a la longitud de onda de excitación (A<sub>d</sub> y A<sub>st</sub>, respectivamente) Utilizando el mismo equipo, en idénticas condiciones (longitud de onda de excitación, celda, abertura de las rendijas, temperatura, etc.), el rendimiento cuántico de fluorescencia se determina con la ecuación:

 $\Phi_{d} = [(A_{st} \cdot I_{d} \cdot n_{d}^{2})/(A_{d} \cdot I_{st} \cdot n_{st}^{2})]\Phi_{st}$ 

donde n el índice de refracción del solvente. En todos los experimentos realizados para este trabajo de tesis se utilizó el mismo solvente (agua) por lo cual el factor  $n_d^2/n_{st}^2$  puede ser eliminado. Esta ecuación es válida sólo para soluciones diluidas, con absorbancia no mayor a 0.10. De lo contrario, A debe reemplazarse por 1-10<sup>A</sup>.

Se utilizó el mismo equipo *Single Photon Counting FL900CDT* (*Edinburgh Analytical Instruments*) que se describió anteriormente, con la lámpara estacionaria. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia fueron determinados a partir de los espectros de fluorescencia corregidos obtenidos por excitación a 350 nm, usando como referencia *bisulfato de quinina* (Riedel-

deHaen) en solución acuosa de  $H_2SO_4$  0.5 M ( $\Phi_F = 0.546$ ) [Eaton, 1989; Meech y Phillips, 1993]. El espectro de fluorescencia de la referencia se muestra en la Figura 5.1. Para evitar efectos de filtro interno la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación se fijo en un valor menor a 0.10.



Figura 5.1: espectro de emisión normalizado de sulfato de quinina en solución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia a longitudes de onda diferentes ( $\Phi_{\rm f}^{\lambda}$ ) se calcularon a partir de los espectros de excitación y de los rendimientos cuánticos fluorescencia a 350 nm ( $\Phi_{\rm f}^{350}$ ), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\rm F}{}^{\lambda} = \Phi_{\rm F}{}^{350}. (I_{(\lambda)} / I_{(350)}) . [(1-10^{-A(350)}) / (1-10^{-A(\lambda)})]$$

Aquí  $I_{(\lambda)}$  y  $I_{(350)}$  son las intensidades de la emisión medidas a 450 nm excitando a 350 nm y a  $\lambda$ , respectivamente, obtenidos de los espectros de excitación;  $A_{(\lambda)}$  y  $A_{(350)}$  las absorbancias de la solución a 350 nm y  $\lambda$ , respectivamente.

# Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia.

El tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) de una sustancia representa el tiempo promedio en que una población de moléculas excitadas disminuye a 1/e de su valor inicial [Lakowicz, 1983]. Además, como se explicará más adelante, la determinación del tiempo de vida de fluorescencia proporciona valiosa información en procesos de *quenching*. Por ejemplo, permite obtener información sobre la frecuencia de colisión con las moléculas *quenchers*, la fracción de energía transferida y la extensión de reacción en el estado estacionario.

Para realizar las medidas de este parámetro se necesitan equipos electrónicos y detectores de muy alta velocidad, porque sus valores son del orden de los nanosegundos. La técnica consiste en excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de longitud de onda apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz provoca la población del estado singlete excitado. Si consideramos solamente un proceso radiativo la velocidad con que decrece el número de moléculas en el estado excitado puede describirse con la siguiente ecuación:

$$\frac{\mathrm{d}(\mathrm{N}^*)}{\mathrm{dt}} = -k_\mathrm{F} \mathrm{N}^*$$

donde  $k_F$  es el coeficiente de velocidad de emisión espontánea y N\* el número de moléculas en el estado excitado. Al resolver esta ecuación, se obtiene:

$$N_{t}^{*} = N_{o}^{*} e^{(-k_{F} t)}$$

donde N\*<sub>t</sub> y N\*<sub>o</sub> son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo t y 0, respectivamente. Por ello se espera que la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, tenga un decaimiento exponencial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el tiempo de vida de fluorescencia se define como el tiempo requerido que para la intensidad de fluorescencia alcance 1/e de su valor inicial. Es decir:

$$\tau_{\rm F} = \frac{1}{k_{\rm F}}$$

Para las medidas de tiempos de vida de fluorescencia se utilizó el equipo *Single Photon Counting*, descripto anteriormente en este mismo Capítulo. Para los estudios resueltos en el tiempo este equipo utiliza una lámpara pulsada de nitrógeno (pureza > 99.9995), a 1.2 bar, y alimentada con una tensión de 6.3 kV y una frecuencia de repetición de 40 kHz. En estas condiciones emite, por cada pulso, una intensidad del orden de  $10^{10}$  fotones. El rango del equipo es 500 ps – 500 µs, pero para las medidas del presente trabajo se utilizó una resolución de 0 - 100 ns. Los decaimientos se monitorearon a 450 nm y la luz de excitación fue 350 nm. Los tiempos de vida se obtuvieron del decaimiento monoexponencial observado luego de la deconvolución de la señal de la lámpara, mediante el uso de software provisto por Edinburgh Analytical Instruments.

# **QUENCHING DE FLUORESCENCIA**

El fenómeno de *quenching* de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. El *quenching* puede ser resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y *quenching* por colisiones [Lakowicz, 1983]. El *quenching* de fluorescencia provee evidencia de interacciones moleculares.

El fenómeno puede dividirse en dos grupos: "quenching colisional o dinámico", cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y quencher), y "quenching estático", cuando es el resultado de formación de complejos. A veces no resulta fácil distinguir entre uno y otro, pero es posible con un estudio adecuado de los tiempos de vida de fluorescencia.

Ambos tipos de desactivación requieren de contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula *quencher*. Este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes. En solución, el proceso difusional limita la velocidad con que ambas moléculas, especie excitada y *quencher*, se encuentran, pero hace prolongado el encuentro pudiendo ocurrir cientos de choques antes de separarse.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como *quenchers* de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos de *quenching* colisional está dado por el oxígeno molecular. Por ello muy frecuentemente es necesario eliminar el oxígeno disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de fluorescencia o rendimientos cuánticos de fluorescencia. Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida,

bromato, yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas *quenchers*, se debe identificar aquéllas de interés para cada molécula fluorescente en particular.

# Quenching dinámico.

Etopos

Esquemáticamente, el *quenching* dinámico puede representarse como una transferencia de energía entre una especie excitada (M\*) y una especie *quencher* (Q):

 $M^* + Q \longrightarrow M + Q^*$ 

El quenching dinámico se describe por la ecuación de Stern-Volmer:

$$I_{\rm F}^{0}/I_{\rm F} = 1 + K_{\rm SV}[Q] = 1 + k_{\rm q} \tau^{0}[Q]$$

donde  $\mathbf{I}_{F}^{0}$  e  $\mathbf{I}_{F}$  son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del *quencher* respectivamente,  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer, [Q] es la concentración del *quencher*,  $k_{q}$  es la constante bimolecular de quenching y  $\tau^{0}$  es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

Esta ecuación puede deducirse planteando estado estacionario de la fluorescencia de una molécula excitada en presencia de un *quencher*. La molécula *quencher* puede ser cualquiera, pero debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la concentración del estado excitado, y, por consiguiente, de la emisión fluorescente, se deba a una única interacción entre la molécula emisora y ella. Para realizar el análisis de este estado estacionario debemos considerar las siguientes ecuaciones:

Etapas.		velociuau.
Absorción de luz:	$M + h \nu \to M^*$	I <sub>A</sub>
Fluorescencia:	$M^* \rightarrow M + hv'$	$k_{\rm F}^{0}$ [M*]
Decaimientos distintos de quenching:	$M^* \rightarrow M$	$\Sigma k_{\rm i}  [{ m M}^*]$
Quenching:	$M^* + Q \rightarrow M + Q$	<i>k</i> <sub>q</sub> [M*] [Q]

Valaaidad

donde  $k_{\rm F}^{0}$  es la constante de fluorescencia intrínseca.

Si se asumen condiciones de estado estacionario  $(-d[M^*]/dt = 0)$ , entonces:

$$[M^*] = \frac{I_A}{\sum k_i + k_q [Q]}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia está dado por:

$$\Phi_{\rm F} = \frac{k_{\rm F}^{0}}{\sum k_{\rm i} + k_{\rm q} [\rm Q]} = \frac{k_{\rm F}^{0}}{k_{\rm F} + k_{\rm q} [\rm Q]}$$

donde  $k_{\rm F}$  definida en el Capítulo anterior como el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de M\* ( $\Sigma k_i$ ), excepto  $k_q$ . Debe observarse que el rendimiento cuántico disminuye en una cantidad proporcional a la concentración del *quencher*. Se obtiene el valor máximo de rendimiento cuántico ( $\Phi_{\rm F}^0$ ) en ausencia de *quencher*. La relación  $\Phi_{\rm F}^0 / \Phi_{\rm F}$  está dada por:

$$\frac{\Phi_{\rm F}^{0}}{\Phi_{\rm F}} = \frac{k_{\rm F}^{0}}{k_{\rm F}} \frac{k_{\rm F} + k_{\rm q} [\rm Q]}{k_{\rm F}^{0}} = 1 + \frac{k_{\rm q} [\rm Q]}{k_{\rm F}}$$

Esta ecuación indica que la relación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia es linealmente dependiente de la concentración del *quencher*, siendo la ordenada al origen igual a 1. Esta relación se denomina *relación de Stern-Volmer*.

La determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia requiere del conocimiento de la luz absorbida. Sin embargo, si se realizan medidas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración del *quencher*, bajo idénticas condiciones de geometría de irradiación, concentración de molécula fluorescente, intensidad de excitación, longitud de onda y sensibilidad de detector, entonces la luz absorbida es idéntica para cada medida. Bajo dichas circunstancias, la relación de rendimientos cuánticos es igual a la relación de intensidades de emisión fluorescente:

$$\frac{\mathrm{I_F}^0}{\mathrm{I_F}} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F}$$

Así una gráfica de  $I_F^{0}/I_F$  versus [Q] (gráfica de Stern-Volmer) debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje  $I_F^{0}/I_F$ . La pendiente de dicha gráfica se denomina constante de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>), y es igual a  $k_q / k_F = \tau_F^{0} k_q$ . En esta última expresión  $\tau_F^{0}$  es el parámetro  $\tau_F$  definido en el Capítulo anterior. Sin embargo, en los experimentos de *quenching* se le suele agregar el superíndice <sup>0</sup> para diferenciarlo de los tiempos de vida en presencia de *quencher*.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite obtener valiosa información. Por ejemplo, el determinar el coeficiente de Stern-Volmer da un método indirecto para obtener el tiempo de vida de fluorescencia si se conoce o puede calcularse  $k_{q}$ , o por el contrario, se puede determinar  $k_{q}$  si se conocen los tiempos de vida de fluorescencia. Por otro lado, una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, si la gráfica de Stern-Volmer no es lineal puede suponerse la presencia de dos poblaciones distintas de fluoroforos.

Es importante remarcar que una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de *quenching* estudiado sea de tipo dinámico. Como se explicará a continuación, un proceso de *quenching* de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer. Debido a ello, debe recurrirse a otras medidas, que serán expuestas más adelante, para distinguir entre ambos tipos de *quenching*.

# Quenching estático.

El *quenching* estático se produce, generalmente, como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre la molécula emisora y la molécula *quencher*.

$$M^* + Q \iff M - Q$$

La dependencia de la intensidad de fluorescencia  $(I_F)$  con la concentración de *quencher* puede deducirse considerando la constante de asociación  $(K_S)$ :

$$K_{S} = \frac{[M-Q]}{[M] \cdot [Q]}$$

Si el complejo M-Q no emite, la relación de intensidades  $I_F^0/I_F$  será igual a la relación de concentraciones  $[M]_0$  / [M], donde  $[M]_0$  es la concentración total del fluoróforo.

$$[M]_0 = [M] + [M-Q]$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene:

$$K_{S} = \frac{[M]_{0} - [M]}{[M] \cdot [Q]} = \frac{[M]_{0}}{[M] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

$$\Rightarrow \qquad -\frac{[M]_0}{[M]} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_S [Q]$$

Puede apreciarse que, tal como se dijo, un proceso de *quenching* estático también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal. Sin embargo, en este caso,  $K_{SV}$  es igual a  $K_S$ .

#### Metodología para diferenciar tipos de quenching.

Existen varios métodos tendientes a distinguir entre un proceso de *quenching* dinámico y uno estático. Entre ellos se encuentran el estudio de la dependencia del *quenching* con la temperatura y la viscosidad de medio. Sin embargo, el método más conveniente para este propósito es el análisis de la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración del *quencher*.

Puede deducirse rápidamente que, si el *quenching* es dinámico el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de *quencher*  $(\tau_F^0 / \tau_F)$  es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F^0 / \Phi_F$ ). Por consiguiente, puede escribirse la siguiente ecuación para describir la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración de *quencher*:

$$\frac{\tau_{\rm F}^0}{\tau_{\rm F}} = 1 + k_{\rm q} \tau_{\rm F}^0 [\rm Q]$$

Si por el contrario, existe un *quenching* estático una fracción del compuesto emisor se encuentra "secuestrado" formando parte del complejo no emisor. Por lo tanto, la fluorescencia observada proviene del fluoróforo "libre". Esta fracción no ha sido alterada, por lo que el tiempo de vida de fluorescencia que se mide es igual al tiempo de vida en ausencia del *quencher* ( $\tau_F^0$ ). En definitiva, el cociente de tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_F^0 / \tau_F$ ) no demostrará dependencia con la concentración del *quencher*:

$$\frac{\tau_{F}^{0}}{\tau_{F}} = 1$$

Puede apreciarse, entonces, que midiendo el tiempo de vida  $\tau_F$  a distintas concentraciones del *quencher* y luego realizando las graficas de  $\tau_F^0 / \tau_F$  versus [Q] puede diferenciarse claramente entre un proceso de *quenching* de tipo dinámico y
otro estático. En el primer caso se obtendrán curvas lineales con pendientes idénticas a las constantes  $K_{SV}$  encontradas en las gráficas de Stern-Volmer obtenidas de las medidas de intensidad de fluorescencia. En el segundo caso, se obtendrá una línea horizontal. Ambos comportamientos están representados en la Figura 6.1. Este método fue el empleado en el presente trabajo de tesis para analizar los procesos de *quenching* estudiados.



Figura 6.1: Representación de Stern-Volmer a partir de tiempos de vida de fluorescencia para quenching dinámico (-) y quenching estático (-).

En el presente trabajo de tesis se realizaron experimentos de *quenching* por aniones. Muchos trabajos que se encuentran en literatura sobre pterinas se refieren a medidas de emisión de fluorescencia en presencia de solución reguladora. Por ello se decidió realizar un estudio sobre la influencia de los aniones que contienen las soluciones reguladoras, con el fin de conocer su efecto sobre las propiedades fluorescentes de las pterinas en soluciones acuosas. Los resultados de este estudio se presentan en el *Capítulo 10*.

Los estudios de quenching de fluorescencia se realizaron con el equipo Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments), detallado en el capítulo anterior. Preliminarmente se realizaron experimentos midiendo la emisión, en el espectrofotómentro Cary 3 de Varian. En este estudio previo se buscó la presencia de procesos de *quenching* realizando un gran número de experimentos cambiando el derivado pterínico, el *quencher* (anión) y su concentración y el pH. Luego se realizó un estudio sistemático midiendo los espectros de emisión y los tiempos de vida de fluorescencia en soluciones de pterinas a diferentes concentraciones de aniones.

Las soluciones se prepararon a partir de soluciones madres a las que se les ajustó el pH al valor final y agua al mismo pH. Se mezcló 2 ml de la solución madre de pterina con 2 ml de una solución del anión a diferente concentración del mismo pH. Esta última solución fue preparada a partir de la solución madre del anión y agua. En todos los casos se registraron los espectros de absorción.

### **OXÍGENO SINGLETE**

Como se detalló en el *Capítulo 3*, el oxígeno singlete es un estado electrónicamente excitado del oxígeno y es un agente fuertemente oxidante. La generación fotoquímica de esta especie consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente sensibilizador, al oxígeno [Foote, 1991]. Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el oxígeno queda en su estado excitado singlete. Como parte de este trabajo se investigó la capacidad de las pterinas excitadas para generar oxígeno singlete.

Aunque anteriormente ya se explicó la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete, se plantea nuevamente en el presente Capítulo a fines de describir el método experimental utilizado para las determinación de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ).

El posible sensibilizador (<sup>1</sup>Sens) es, en este caso, una molécula de pterina. Éste absorbe luz UV-A y se genera un estado excitado singlete (<sup>1</sup>Sens\*), el cual, mediante un cruzamiento intersistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete (<sup>2</sup>Sens\*) de mayor tiempo de vida (Ecuación 1). Este estado triplete del sensibilizador es el que tiene la capacidad de transferir su energía hacia el oxígeno molecular (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) disuelto en el medio (Ecuación 2).

$$\frac{hv}{Sens} \xrightarrow{hv} {}^{1}Sens^{*} \xrightarrow{k_{ISC}} {}^{3}Sens^{*}$$
(1)

$$^{3}\text{Sens}^{*} + ^{3}\text{O}_{2} \xrightarrow{k_{\text{et}}} ^{1}\text{Sens} + ^{1}\text{O}_{2}$$
 (2)

La desactivación del oxígeno singlete puede ocurrir en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz) (Ecuaciones 3 y 4). En presencia de otra sustancia capaz de actuar como *quencher* (Q), deben considerarse el *quenching* químico o físico (Ecuaciones 5 y 6). Cabe aclarar que el rendimiento cuántico de fosforescencia es casi siempre despreciable respecto al rendimiento cuántico de desactivación por el solvente.

$${}^{1}O_{2} \xrightarrow{k_{d}} {}^{3}O_{2}$$
 (3)

$${}^{1}O_{2} \xrightarrow{k_{e}} {}^{3}O_{2} + h.v'$$
 (4)

$$Q + {}^{1}O_{2} \xrightarrow{k_{r}} QO_{2}$$
 (5)

$$Q + {}^{1}O_2 \xrightarrow{k_q} Q + {}^{3}O_2$$
 (6)

#### Método de detección de oxígeno singlete.

El fundamento de la técnica empleada consiste en la medida de la luminiscencia del oxígeno singlete a 1270 nm, producido durante la irradiación continua de una solución de la sustancia que se quiere investigar [Krasnovsky, 1979; Kahn, 1980].

Como se describió anteriormente, el reemplazo del agua común por agua deuterada, o agua pesada (D<sub>2</sub>O), disminuye la velocidad de desactivación del estado singlete aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. El resultado es un tiempo de vida mucho mayor en D<sub>2</sub>O que en H<sub>2</sub>O (de 3 a 4 s en H<sub>2</sub>O a 62 s en D<sub>2</sub>O [Foote y Clennan, 1995; Martínez *et al*, 2000]). Los estudios se realizan en soluciones preparadas en agua deuterada, D<sub>2</sub>O (Euriso-top, CAE, Saclay, France de 99.9 % de pureza isotópica), como solvente, en el cual se obtienen señales mayores que usando agua común, aumentando así la sensibilidad del método significativamente [Hurst y Schuster, 1983; Schmidt, 1989; Rodgers, 1983].

El pD (-log [D<sup>+</sup>]) fue medido con un pH-*meter* Schott CG 843P en combinación con un electrodo Blue Line 0.14 pH (Schott). Los valores de pD se calcularon aplicando la siguiente corrección a cada medida:

donde pH es el valor leído en el pH-*meter* [Salomaa *et al*, 1964]. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes (microlitros), con micropipeta, de soluciones concentradas de hidróxido de sodio deuterado, NaOD (CEA) y de ácido clorhídrico deuterado, DCl (Aldrich, 99.5%). Las soluciones a estudiar se prepararon de modo tal que la absorbancia a la longitud de onda de excitación fue siempre mayor a 0.6.

El equipo cuenta con una lámpara de excitación Xe/Hg Osram de 1kW. El haz de luz pasa a través de un filtro de agua y un monocromador ISA Jobin-Yvon B204, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. La mencionada celda, de 1x1 cm, es de cuarzo y puede contener aproximadamente 3,5 ml de solución.

La luz emitida es colectada por un espejo. El haz pasa primero a través de un chopper calibrado a 11 Hz; luego pasa por un filtro tipo cut-off de 1000 nm y por un filtro de interferencia de 1271 nm, para incidir, finalmente, en un fotodiodo de Germanio ubicado en ángulo recto respecto al haz incidente. Este dispositivo de detección trabaja a -78 °C, por consiguiente, consta de un sistema de refrigeración que emplea una mezcla de CO<sub>2</sub> sólido y alcohol isopropílico para alcanzar dicha temperatura. El detector de Germanio está conectado a dos amplificadores (lock-in) los cuales envían, cada uno, una señal a un registrador Y-t y a un osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz.

La longitud de onda de excitación se elige teniendo en cuenta los máximos de absorción de los sensibilizadores a estudiar y el espectro de emisión de la lámpara de excitación. Para las pterinas se utilizó, en todos los casos, luz de longitud de onda de 367 nm. La potencia de la luz incidente ( $F_o$ , mW) se midió por medio de una termopila (Laser instrumentation, model 154).

Todas las medidas realizadas en el equipo de detección de oxígeno singlete utilizado en el presente trabajo se realizaron en el *Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe*, en el marco de un convenio de colaboración entre dicho Instituto y nuestros laboratorios (SECyT-BMFB).

Cada medida se realizó registrando, primero, una línea de base sin irradiación, luego se iluminó la muestra y, por último, se realizó nuevamente una línea de base sin irradiación. Sistemáticamente se registraron señales durante nueve minutos totales repartidos en tres minutos para cada una de las tres etapas de la medida: se controla la línea de base tres minutos, se irradia durante tres minutos y se vuelve a controlar la línea de base tres minutos más. Además se tomaron los espectros de absorción antes y después de la irradiación en un espectrofotómetro Cary 5 (Varian). Este control se realizó para determinar si durante la iluminación de la muestra se producía transformación química de la misma. Cada señal es amplificada y registrada. Se obtienen dos registros de cada señal, debido a que, como se mencionó anteriormente, el equipo cuenta con dos amplificadores (Figura 7.1, corresponde a dos registros, rojo y azul, de la misma señal).



Figura 7.1: Registros de una señal de oxígeno singlete.

Dado un conjunto de condiciones experimentales (longitud de onda de excitación, absorbancia de la solución a analizar a dicha longitud de onda, solvente, etc.) la diferencia entre el voltaje proveniente del detector, en presencia y ausencia de luz, es proporcional a la concentración de estado estacionario de oxígeno singlete presente en la solución durante la irradiació n. La obtención de este parámetro, que en adelante se llamará señal (*Se*) se muestra esquemáticamente en la Figura 7.1.

La magnitud de esta diferencia se compara con la correspondiente a una referencia para determinar el *rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete* ( $\Phi_{\Delta}$ ) de una sustancia a un determinado pD.

#### Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.

El *rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete* ( $\Phi_{\Delta}$ ) puede definirse como la fracción de moléculas de oxígeno singlete producidas por cada cuanto de luz absorbido por el sensibilizador.

Bajo condiciones de irradiación continua y teniendo en cuenta las ecuaciones 1 a 6 planteadas anteriormente puede escribirse la siguiente expresión para la concentración de estado estacionario de oxígeno singlete:

$$[^{1}O_{2}] = \frac{\Phi_{\Delta} I_{A}}{k_{d} + (k_{q} + k_{r}) [Sens]}$$
(7)

donde  $\Phi_{\Delta}$ .I<sub>A</sub> (I<sub>A</sub> es la luz absorbida por el sensibilizador) es la velocidad de generación de oxígeno singlete (Ecuaciones 1 y 2) y  $k_e$  fue despreciada por ser mucho menor que  $k_d$ . Por otra parte, en esta expresión se considera una posible desactivación del oxígeno singlete por interacción con el propio sensibilizador. Por lo tanto, Q de las Ecuaciones 4 y 5 se reemplazó por Sens.

Como ya se dijo, la señal obtenida para cada sustancia es proporcional a la cantidad de oxígeno singlete que se genera. Esta señal está relacionada con las

características del equipo, el sensibilizador y el medio acorde a la siguiente ecuación:

$$Se = C k_{e} (1/n^{2}) [^{1}O_{2}] = C k_{e} (1/n^{2}) P_{o} (1-10^{A}) \Phi_{\Delta}^{S} \frac{1}{k_{d} + (k_{q} + k_{r}) [Sens]}$$

donde *C* es un factor de proporcionalidad que incluye la geometría y factores electrónicos del sistema de detección;  $P_o$  es la tasa de fotones incidentes; A la absorbancia del sensibilizador a la longitud de onda de excitación (así el producto  $P_o$  (1-10<sup>A</sup>) representa la tasa de fotones absorbidos por el sensibilizador, es decir I<sub>A</sub>);  $\Phi_{\Delta}^{S}$  es el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por el sensibilizador;  $k_e$  es la constante de desactivación radiativa del oxígeno singlete; (1/ $k_d$ ) el tiempo de vida del oxígeno singlete y *n* el índice de refracción del medio.

Se utilizaron como referencias sustancias con rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete conocidos ( $\Phi_{\Delta}^{R}$ ). Se prepararon soluciones de las referencias en agua deuterada (D<sub>2</sub>O), con una absorbancia y un pD iguales a los de la solución de la sustancia cuyo rendimiento cuántico ( $\Phi_{\Delta}^{S}$ ) se quiere determinar. De acuerdo al pD se utilizaron dos referencias diferentes: para el medio alcalino se eligió rosa de bengala, y para medio ácido fenalenona. La longitud de onda de excitación fue 367 nm para todas las pterinas y la fenalenona ( $\Phi_{\Delta}^{R} = 0.975$ , en D<sub>2</sub>O) [Oliveros *et al*, 1991]. Para el rosa de bengala se irradió a 547 nm ( $\Phi_{\Delta}^{R} = 0.76$  en D<sub>2</sub>O) [Murasecco-Suardi *et al*, 1987; Neckers, 1989]. Los valores de absorbancia se fijaron entre 0.6 y 1.6. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorescencia de 1 cm por 1 cm.

Si las señales luminosas son monitoreadas usando soluciones ó pticamente comparables de la muestra y la referencia, la relación entre las señales de la emisión fosforescente del oxígeno singlete de la muestra ( $Se^{S}$ ) y la referencia ( $Se^{R}$ ) es proporcional a la relación entre los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete. Entonces el cociente entre la magnitud de ambas señales estará dado por la Ecuación (8):

$$\frac{Se^{\rm S}}{Se^{\rm R}} = \frac{\Phi_{\Delta}^{\rm S}}{\Phi_{\Delta}^{\rm R}} \frac{k_{\rm d}}{k_{\rm d} + k_{\rm T}^{\rm S} \,[{\rm Sens}]} - \frac{P_{\theta}^{\rm S} \,(1 - 10^{-4\rm S})}{P_{\theta}^{\rm R} \,(1 - 10^{-4\rm R})}$$
(8)

donde el superíndice <sup>S</sup> se refiere al sensibilizador en estudio y el superíndice <sup>R</sup> se refiere a la referencia;  $k_T^S$  es la constante bimolecular de quenching total de oxígeno singlete por el sensibilizador ( $k_T^S = k_q^S + k_r^S$ ). La desactivación del oxígeno singlete por la referencia no fue considerada porque para las dos referencias utilizadas este fenómeno es despreciable. Los términos  $k_e$ , n y C se mantie nen constantes en ambas medidas y por lo tanto se anulan al formular el cociente.

Debido a la diferencia entre la intensidad de la luz incidente ( $P_o$ ) a las longitudes de onda de excitación de la muestra y la referencia ( $^{\rm S}$  y  $^{\rm R}$ ), a causa del espectro de emisión de la lámpara, es necesario introducir el factor de corrección  $P_o^{\rm S}$  /  $P_o^{\rm R}$ . Este factor pueden escribirse como  $F_0^{\rm S}$  .  $^{\rm S}$  /  $P_0^{\rm R}$  .  $^{\rm R}$ . La potencia de la luz incidente,  $F_0$ , se mide con una termopila Laser Instrumentation modelo 154. El otro factor que está presente en la ecuación (8),  $[(1 - 10^{-4})]$ , se origina en la diferente cantidad de fotones absorbidos por la muestra y por la referencia. Sin embargo, como se trabajó en condiciones tales que la absorbancia de ambas soluciones fue igual para cada experimento, este factor puede eliminarse.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y despejando  $\Phi_{\Delta}^{S}$  de la Ecuación (8), se obtiene

$$\Phi_{\Delta}{}^{S} = \Phi_{\Delta}{}^{R} \bullet \quad \frac{Se^{S}}{Se^{R}} \quad \frac{F_{0}{}^{R} \cdot {}^{R}}{F_{0}{}^{X} \cdot {}^{X}} \quad \frac{(k_{d} + k_{T}{}^{S} [Sens])}{k_{d}}$$
(9)

En aquellos casos en los cuales la referencia y la muestra se excitan a la misma longitud de onda, la Ecuación (9) se reduce a:

$$\Phi_{\Delta}{}^{S} = \Phi_{\Delta}{}^{R} \bullet \quad \frac{Se^{S}}{Se^{R}} \cdot \frac{(k_{d} + k_{T}{}^{S} \text{ [Sens]})}{k_{d}}$$
(10)

En el presente trabajo de tesis, como ya se mencionó, se utilizaron dos referencias según el pD. En las medidas realizadas en medio ácido se empleó fenalenona como referencia y, en este caso, la muestra y la referencia se excitaron a 367 nm. Para los cálculos se empleó la Ecuación (10). En medio alcalino, en cambio, se utilizó rosa de bengala como referencia, y, en este caso, la referencia se excitó a 547 nm (debido a que a 367 nm su coeficiente de extinción molar es muy bajo) y la muestra a 367 nm. Por esta razón, no puede eliminarse el factor que corrige la diferencia de intensidad a diferentes longitudes de onda, entonces se utilizó la Ecuación (9).

Esta claro, que para calcular los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete ( $\Phi_{\Delta}^{S}$ ) es necesario conocer la constante bimolecular de quenching total de oxígeno singlete ( $k_{T}^{S}$ ). De lo contrario, se determina un rendimiento cuántico aparente ( $\Phi_{\Delta}^{ap}$ ) dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^{R} \cdot \frac{Se^{S}}{Se^{R}} \frac{F_{0}^{R} \cdot R}{F_{0}^{X} \cdot X}$$
(11)

donde:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^{S} \bullet \frac{k_{d}}{(k_{d} + k_{T}^{S} \text{ [Sens]})}$$

# Determinación de la constante de velocidad de quenching total de oxígeno singlete.

Las constantes de velocidad de *quenching* total de oxígeno singlete ( $k_T$ ) se determinaron por análisis de Stern-Volmer del *quenching* de oxígeno singlete [Tournaire *et al*, 1993]. Se utilizó el mismo equipo y las mismas condiciones que para las medidas de producción de oxígeno singlete. El oxígeno singlete fue generado por fotosensibilización, utilizando rosa de bengala (RB) como

sensibilizador. Se irradió con luz de excitación de 547 nm, donde las pterinas no absorben. Se mantuvo constante la concentración de rosa de bengala y se varió la concentración de pterinas. La concentración de rosa de bengala fue tal que el *quenching* de oxígeno singlete por ella misma es despreciable comparado con la desactivación por el solvente.

Se realizó un análisis de Stern-Volmer, en una gráfica de la relación entre las señales en ausencia  $(S_e^{0})$  y en presencia  $(S_e)$  de *quencher* versus la concentración del mismo, de acuerdo a la ecuación:

$$S_{\rm e}^{0} / (S_{\rm e}) = \Phi_{\rm e}^{0} / \Phi_{\rm e} = 1 + k_{\rm T} \tau_{\Delta} [Q]$$
(12)

En el presente trabajo los *quenchers* utilizados fueron pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, neopterina, biopterina y ácido fólico.

## ANÁLISIS DE SOLUCIONES IRRADIADAS EN FORMA ESTACIONARIA

#### Irradiación continua

La irradiación continua consiste en iluminar una muestra con luz de una lámpara de intensidad constante. El tiempo de irradiación es variable y puede durar desde unos pocos segundos a horas. Si existe reacción fotoquímica durante una irradiación continua dicho proceso se denomina *fotólisis*. Para el estudio cinético de una fotólisis continua puede extraerse muestras a distintos tiempos de irradiación.

En la Figura 8.1 se muestra un esquema del dispositivo experimental para las irradiaciones continuas. La irradiación continua de luz UV se realizó empleando una lámpara Rayonet Photochemical Reactor Lamp, RPR 3500 Å de Southern N. E. Ultraviolet Co. Esta lámpara emite luz de 350 nm, con un ancho de banda de 20 nm.

Las soluciones a ser irradiadas se colocaron en celdas de 0.2 y 1 cm de camino óptico. En las celdas de 1 cm las muestras se agitaron magnéticamente para mantener su homogeneidad, evitando la acumulación de fotoproductos en la cara más cercana a la fuente de irradiación. El tiempo de irradiación se mide con cronómetro. El dispositivo se mantuvo con idéntica geometría en todos los experimentos con fines comparativos.

Se empleó una lámpara de 350 nm porque a esa longitud de onda las pterinas estudiadas absorben luz adecuadamente, mientras que las moléculas sobre las cuales se quiere estudiar los procesos de fotosensibilización no absorben luz en esa región del espectro, como es el caso de los nucleótidos y el ácido desoxirribonucleico. En estas condiciones cualquier alteración de estas moléculas no puede ser atribuida a la acción directa de la irradiación, sino por el contrario a una reacción de fotosensibilización.



Figura 8.1: Esquema del dispositivo empleado para realizar las fotólisis continuas.

Como metodología general para los experimentos de irradiación continua se preparó una solución madre que corresponde al tiempo cero (t=0) de irradiación. Luego se coloca en una celda de cuarzo de volumen adecuado y con agitación (excepto en celdas de 0.2 cm, en las cuales no puede utilizarse agitación magnética) y se irradia durante tiempos variables.

Luego se somete la muestra a métodos de análisis. En algunos casos dichos métodos requieren de la extracción de la solución irradiada de la celda, mientras que en otros no. En este último caso, como por ejemplo si sólo se registran espectros de absorción, se interrumpe la iluminación (registrando muy bien el tiempo) se registra el espectro y se continúa con la misma. En caso contrario, se obtiene muestras a distintos tiempos de iluminación sobre alícuotas diferentes de la solución madre: se coloca una alícuota, se ilumina un tiempo y se retira en su totalidad para ser analizada. La cubeta se enjuaga exhaustivamente

cada vez que se cambia la solución. Las condiciones de volumen de la alícuota, geometría de irradiación, agitación deben mantenerse constantes. Se requiere la extracción de la muestra siempre que se realizó una cromatografía o una electroforesis.

Los experimentos se realizaron algunas veces en ausencia de oxígeno. Para evaluar su participación en las reacciones. Para ello se utilizó una celda de cuarzo con robinete. Las muestras se burbujearon con nitrógeno de máxima pureza por medio de un tubo de teflón.

Siempre se realizó un espectro UV-visible a la solución madre sin irradiar. Con ello se obtiene el espectro al tiempo cero (t=0) y por comparación con espectros conocidos se controla el pH y la concentración.

#### Electroforesis

Para analizar las alteraciones producidas a la molécula de ácido desoxirribonucleico luego de una irradiación continua y, como se mencionó anteriormente, para evaluar la pureza del ácido desoxirribonucleico durante su obtención, se aplicaron técnicas electroforéticas. Estas técnicas son herramientas básicas para la caracterización de macromóleculas, y se basan en que ellas son capaces de moverse cuando son colocadas en un campo eléctrico. En efecto, la electroforesis se define como la migración de partículas en una solución bajo la influencia de un campo eléctrico. Comprende un conjunto de métodos muy importantes para el fraccionamiento de los componentes de una mezcla [Skoog y West, 1990].

Para realizar la electroforesis se colocan las macromóleculas en un soporte sólido a un pH adecuado para que estas tengan carga. Luego se aplica un campo eléctrico, entonces la fuerza electromotriz moverá las macromoléculas hacia el ánodo o hacia el cátodo según posean carga negativa o positiva respectivamente. El soporte sólido está fijo y no se desplaza en el campo eléctrico. Para compensar el movimiento de las macromoléculas hacia un electrodo, los iones de la solución reguladora se desplazan hacia el otro.

79

El soporte sólido en una electroforesis se elige de acuerdo con las moléculas que se requieran separar. En biología molecular para separar moléculas de ácido desoxirribonucleico se emplean geles, generalmente de dos tipos: geles de poliacrilamida para separar fragmentos de hasta unos mil pares de bases, y geles de agarosa, más porosos, para resolver mezclas de fragmentos mayores.

Debido al tamaño de estas moléculas se decidió usar geles de agarosa. En los geles de agarosa se pueden detectar diferencias estructurales de una misma molécula de ácido desoxirribonucleico y diferencias de tamaño dentro de ciertos límites.

En dichos geles los plásmidos de ácido desoxirribonucleico se comportan de diferentes maneras según su estructura. Como se mencionó en el *Capítulo 4*, el plásmido es una molécula de ácido desoxirribonucleico circular que puede enrollarse de diferentes maneras o encontrarse relajado. Cada una de estas estructuras tiene diferente movilidad electrofóretica.

Para realizar una electroforesis se utiliza una unidad de alimentación, una cubeta de electroforesis, electrodos sumergidos en una solución reguladora aislados físicamente (pero no electrónicamente) del gel o soporte sólido. Pueden utilizarse o no colorantes para facilitar el revelado de la electroforesis. En este trabajo de tesis se utilizó bromuro de etidio para el revelado. El bromuro de etidio se fija al ácido desoxirribonucleico, produce una fluorescencia característica con luz UV.

El voltaje aplicado, la concentración de la solución reguladora, la concentración de agarosa del gel pueden modificarse para mejorar la calidad de la resolució n de la muestra.

Los geles se prepararon en solución reguladora TBE (Tris-Bórico-EDTA) con una concentración 0.8% de agarosa, con bromuro de etidio. Se utilizó un voltaje de 100 a 120 volts.

Una vez realizada la corrida electroforética el gel se observa con luz UV. Se observan bandas fluorescentes en los sitios donde se encuentra el ácido desoxirribonucleico debida a su unión a bromuro de etidio.

Los geles se colocan en un equipo fotográfico Fotodyne que consta de un transiluminador con luz UV y una cámara fotográfica Polaroid. Al encender el

transiluminador se observa una intensa fluorescencia en los sitios del gel donde se halla el ácido desoxirribonucleico.

Esto se registra fotográficamente. Las fotos se copian con un scanner, y la imagen digital obtenida se utiliza para poder estudiar la intensidad de luz de cada banda que en ella aparece. Para ello se utiliza el programa Sigmagel de Jandel Corporation.

#### Cromatografía en capa delgada

La cromatografía abarca un grupo de métodos de separación, aislamiento e identificación. Existen numerosas variantes, pero todas las cromatografías constan de una fase móvil y otra estacionaria. Los componentes de una mezcla se transportan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil. Los componentes de la muestra se encuentran disueltos en la fase móvil. Las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración de los componentes de la mezcla [Skoog y West, 1990].

La cromatografía de partición en capa delgada es usada habitualmente para separar mezclas de compuestos polares. La utilización de este método como adecuado para separar estructuras pterínicas ya ha sido publicado en literatura [Scott, 1980; McCormack y Newman, 1985]. En base a ello en el presente trabajo se utilizó cromatografía de partición en capa delgada para separar pterinas de nucleótidos. Los nucleótidos tienen estructuras orgánicas aromáticas similares a las pterinas, por ello en primer término se ensayaron estas cromatografías reportadas para pterinas. Se encontró que su utilización para separar soluciones con mezclas de pterinas y nucleótidos es adecuada.

El método consiste en utilizar celulosa como fase estacionaria y soluciones acuosas o mezclas de solventes polares como fase móvil. La celulosa admite volúmenes importantes en la siembra y permite usar agua como solvente de corrida. El objetivo de estas cromatografías fue separar las pterinas de los nucleótidos para observar posibles cambios en los nucleótidos luego de ser sometidos a irradiación continua en presencia de aquéllas.

Se utilizaron placas de celulosa de 250 µm con marcador fluorescente de Sigma-Aldrich.

Como solvente se utilizaron soluciones acuosas de  $CINH_4$  en concentración de 0.3 % como fase móvil. Las velocidades relativas de migración y la resolución de las bandas de los compuestos dependen de la concentración de la sal, por ello se realizaron muchos ensayos antes de elegir la concentración de  $CINH_4$  adecuada.

La ubicación de las especies sobre las placas puede determinarse de varias formas. En este trabajo se aprovecharon las propiedades fluorescentes que presentan de las pterinas al ser irradiadas con luz UV-A: al exponer la placa a luz de 350 nm la pterina presenta fluorescencia en forma característica, no así los nucleótidos ni el indicador fluorescente que posee la placa. Bajo luz de 350 nm, las manchas correspondientes a pterina se observan de color azul sobre un fondo oscuro. De esta forma, se puede entonces distinguir a la pterina inequívocamente. Se localizó por separado a los nucleótidos, a exponer la placa a luz de 254 nm. El indicador fluorescente emite al ser irradiado con luz de dicha longitud de onda, y los lugares de la placa ocupados por alguna sustancia se ven opacos. Así las manchas se muestran oscuras sobre un fondo fluorescente. Como la pterina ya ha sido ubicada por luz UV-A, las manchas restantes corresponden a los nucleótidos o sus productos. Además, la pterina también presenta fluorescencia al exponerse a luz de 254 nm. Por ello las manchas de pterinas no se ven opacas, sino por el contrario como manchas fluorescentes celestes muy tenues que se distinguen del fondo, que también presenta fluorescencia, pero de color amarillo.

En estos ensayos se observaron cambios químicos y cambios de concentración. Los cambios químicos se observan como cambios en la velocidad de migración de cada componente. Los cambios en la concentración se reflejan en la intensidad de cada mancha.

Las corridas se realizaron sembrando en una misma placa la solución madre de pterina y nucleótidos (sin irradiar) y la misma solución irradiada. Se sembró idéntica cantidad de gotas

#### Medidas electroquímicas de oxígeno.

La concentración del  $O_2$  disuelto en las soluciones irradiadas de pterinas y nucleótidos fue determinada electroquímicamente. Se utilizó un electrodo sensible a  $O_2$  (Orion, modelo 37-08-99). Para realizar estas medidas se recurrió al uso de una celda de vidrio pirex provista de cierre hidráulico. Dentro de ella se colocó el electrodo y la solución a irradiar. Este dispositivo permite irradiar la solución y determinar si durante la irradiación ocurre una variación en la concentración del oxígeno disuelto. El electrodo posee en su extremo un buzo magnético, otro se colocó en el fondo de la celda. Un agitador magnético se ubicó por debajo de la celda, de modo tal que las soluciones fueron agitadas durante los experimentos. Por otra parte, la celda se llena completamente con la solución a analizar y el electrodo se ajusta de manera tal que no se permite el intercambio de gases durante el experimento. Además, la membrana del electrodo está protegida de la luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico.

Una vez que se prepara todo el dispositivo, se realiza la medida de la concentración de  $O_2$  en la solución antes de ser irradiada. Es necesario puntualizar que, en todos los experimentos llevados a cabo con esta técnica, se emplearon soluciones iniciales saturadas en aire. Finalmente se inicia el experimento de fotólisis estacionaria y, sin apagar la lámpara, se efectúan las medidas a distintos tiempos de irradiación.

Se realizó un experimento control para descartar que la disminución en la concentración de  $O_2$  observada pudiera deberse al descenso en la solubilidad del mismo como consecuencia del calentamiento producido por la lámpara. Si bien el aumento de la temperatura de la solución es de sólo unos pocos grados centígrados (aproximadamente 3  $^{0}$ C), este efecto debía ser tenido en cuenta por la fuerte dependencia con la temperatura que muestra la solubilidad del  $O_2$  en H<sub>2</sub>O.

El resultado de este control (Figura 8.2) muestra que se produce un ligero descenso de la concentración de  $O_2$  en los primeros minutos de irradiación para luego alcanzar un valor que se mantiene con ligeras oscilaciones. Estos cambios, como se verá cuando se presenten los resultados, pueden despreciarse frente a los cambios observados en las fotólisis que transcurren con consumo de  $O_2$ .

Las medidas electroquímicas de O<sub>2</sub> disuelto en el medio durante las fotólisis sirvieron para determinar si dicho gas participaba o no en las reacciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser comparados cuantitativamente con aquéllos obtenidos en otros experimentos, pues las condiciones experimentales diferían mucho a causa del dispositivo especial empleado para estas medidas.



Figura 8.2. Medida de la concentración de  $O_2$  en  $H_2O$  bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis y con la misma lámpara.

#### **FLUORESCENCIA DE PTERINAS**

De acuerdo a lo expuesto en el *Capítulo 2*, se conoce desde hace tiempo que las pterinas son sistemas fotoluminiscentes, es decir, que emiten luz al ser excitados con radiación electromagnética. Presentan en forma característica fluorescencia, dependiente del pH, con un máximo de emisión alrededor de los 450 nm y esta propiedad es utilizada con fines analíticos. Las pterinas no presentan emisión fosforescente detectable a temperatura ambiente, la cual puede, sin embargo, registrarse a muy bajas temperaturas (77 K) [Chahidi *et al.*, 1981].

Como ya se mencionó en el *Capítulo 2*, las pterinas tienen diferentes formas ácido-base. Debido a las diferencias en la estructura química de las diferentes pterinas cada una tiene propiedades ácido-base propias, pero todas ellas comparten un equilibrio ácido-base común, que involucra los mismos grupos funcionales, con un pKa cercano a 8. Dicho equilibrio se muestra en la Figura 9.1, pudiendo observarse que el grupo amida se transforma en fenolato al aumentar el pH. Las estructuras 1 y 2 de la Figura 9.1 se nombrarán como *"forma ácida"* y *"forma alcalina"*, respectivamente. En todas estas moléculas están presentes otros equilibrios ácido-base, que carecen de importancia en el rango de pH utilizado (4 - 13).

Estas formas ácido-base presentan características fotoquímicas diferentes, siendo imprescindible conocer qué forma está presente en las condiciones experimentales. Debido a esto, la mayor parte de los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis se llevó a cabo en condiciones de pH donde se encuentre una única forma ácido-base, de forma tal que los datos obtenidos correspondan a una sola especie y no a una mezcla de diferentes formas.



Figura 9.1: Equilibrio ácido-base de las pterinas. (1) forma ácida, (2) forma alcalina.

#### Espectros de absorción.

Cada estructura ácido-base tiene características espectroscópicas diferentes. Entonces es importante, en primer lugar, analizar en forma detallada los espectros de absorción de los compuestos en estudio. Los espectros de absorción de las dos formas ácido-base fueron obtenidos de dos alícuotas de una misma solución a dos valores diferentes de pH (5.5 y 10.5).

*Pterina*: En la Figura 9.2 se muestran los espectros de absorción de la forma ácida y de la forma alcalina. Puede observarse que la forma alcalina presenta la banda de absorción, entre 300 - 400 nm, desplazada hacia el visible, y la banda ubicada en la región entre 230 - 290 nm, desplazada hacia el ultravioleta. La forma alcalina presenta mayores coeficientes de absorción en ambas bandas que la correspondiente forma ácida.

**6-carboxipterina:** En la Figura 9.3 se muestran los espectros de la forma ácida y básica de la 6-carboxipterina. Las diferencias entre los espectros de ambas formas ácido-base son similares a las observadas en la pterina.

Al acidificar soluciones de 6 carboxipterina hasta un pH alrededor de 4 se observan cambios espectrales que indican la presencia de otro equilibrio ácido-base.

Este equilibrio puede ser atribuido al carboxilo de la posición 6, y tiene un pKa de 3.05 [Monópoli *et al.*, 2000]. Por este motivo se evitó realizar experimentos con soluciones de 6-carboxipterina a valores de pH menores a 4.5 previniendo de esta manera la presencia de una nueva forma ácido-base.



Figura 9.2: Espectros de absorción para una solución 1 x 10<sup>-4</sup> M de pterina. Camino óptico de 1 cm.

*6-formilpterina*: En la Figura 9.4 pueden observarse los espectros correspondientes a las formas ácida y alcalina. Puede apreciarse que los espectros de este compuesto muestran significativas deferencias con los correspondientes espectros de pterina y 6carboxipterina. No se encontró en literatura una explicación para este fenómeno.



Figura 9.3: Espectros de absorción para una solución 1 x 10-4 M de6-carboxipterina. Camino óptico de 1 cm.



Figura 9.4: Espectros de absorción para una solución 9 x 10<sup>-5</sup> M de 6-formilpterina. Camino óptico de 1 cm.

Ácido fólico: Como se mencionó anteriormente, este compuesto es una pterina conjugada, en la cual pueden reconocerse tres porciones: una porción pterínica, otra de ácido glutámico (un aminoácido) y otra de ácido *p*-aminobenzoico (*Capítulo 2*, Figura 2.4). Los espectros de las formas ácida y alcalina del ácido fólico se muestran en la Figura 9.5. La forma ácida del ácido fólico presenta carga neta -2 y la forma alcalina -3. Puede apreciarse que el espectro de la forma alcalina presenta tres bandas de absorción. Esta característica particular puede explicarse teniendo en cuenta al grupo bencénico sustituyente que presenta esta pterina. En efecto, la banda con el máximo en 255 nm es asignada al anillo pterínico, mientras que la banda con máximo en 285 puede ser asignada al residuo de ácido p-aminobenzoico. En la forma ácida pareciera desaparecer una banda. En realidad, si se asume que la banda de 255 nm sufre un corrimiento similar al observado para otras pterinas al pasar de la forma ácida a la alcalina y que, por el contrario, la banda de 285 nm no se altera, ambas bandas deberían superponerse. El escaso aumento de los coeficientes de absorción de las bandas superpuestas respecto a los correspondientes a ambas bandas presentes en la forma alcalina, puede explicarse considerando que, tal como se observa para otras pterinas, la banda de 255 nm debe sufrir una pérdida de intensidad al pasar a la forma ácida [Thiéry-Cailly, 1968].

La porción pterínica del ácido fólico presenta el mismo grupo ionizable que las pterinas anteriormente descriptas. Pero la porción de ácido glutámico posee dos grupos ionizables más (cuyos pKa en el ácido glutámico libre son 2.19 y 4.25 [Lehninger, 1985]), que le confieren altísima solubilidad a pH ligeramente ácidas, neutras o alcalinas. Sin embargo, si se acidifica una solución de ácido fólico a un pH menor que 5.5 la solubilidad disminuye drásticamente, debido a la protonación de los carboxilos. Para todos los experimentos descriptos en este Capítulo se eligió un rango de pH tal que estos grupos estén siempre ionizados [Thomas *et al.*, 1996].

*Biopterina y Neopterina*: Estos dos compuestos, muy parecidos estructuralmente, presentan espectros de absorción similares. Además las diferencias espectrales entre las correspondientes formas ácida y alcalina son del mismo tipo a las observadas para pterina (Figuras 9.6 y 9.7).



Figura 9.5: Espectros de absorción para una solución 1 x 10<sup>4</sup> M de ácido fólico. Camino óptico de 1 cm.

El análisis de los espectros de absorción de las seis pterinas permite realizar algunas generalizaciones: todas presentan dos bandas principales de absorción, una banda en el rango de longitudes de onda 220 a 290 nm con coeficientes de extinción molar altos entre 1 x  $10^4$  y 2 x  $10^4$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, y la otra, con un máximo cercano a los 350 nm, con menor coeficiente de extinción molar entre 5 x  $10^3$  y 1 x  $10^4$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Estos espectros indican al menos dos estados electrónicos excitados. También podemos observar un corrimiento de la banda de mayor energía a menores longitudes de onda al pasar de la forma ácida a la alcalina, y el efecto contrario, corrimiento hacia

longitudes de onda mayores, de la banda de menor energía. Por último, las formas alcalinas tienen coeficientes de extinción mayores que las formas ácidas para ambas bandas.



Figura 9.6: Espectros de absorción para una solución 1.7 x 10<sup>-5</sup> M de biopterina. Camino óptico de 1 cm.



Figura 9.7: Espectros de absorción para una solución 1.7 x 10<sup>-5</sup> M de neopterina. Camino óptico de 1 cm.

#### Espectros de emisión.

Las diferencias espectrales entre las formas ácido-base de las pterinas descriptas anteriormente hacen suponer que la fluorescencia de estos compuestos es dependiente del pH. Debido a ello se tomaron los espectros de emisión de soluciones con formas ácidas y alcalinas de pterina, 6-carboxipterina, 6formilpterina, ácido fólico, neopterina y biopterina, excitando a 350 nm y a diferentes valores de pH.

En la Figura 9.8 se muestran los espectros de emisión corregidos normalizados de los seis compuestos mencionados, en sus dos formas ácido-base (forma ácida a pH =5.5 y forma alcalina a pH = 10.5). En todos los casos puede observarse una banda con un máximo cercano a 450 nm, que explica la característica emisión de luz azul que se aprecia al irradiar soluciones acuosas de pterinas con luz UV-A. Puede observarse un claro corrimiento batocrómico de las bandas de emisión de las formas alcalinas respecto de las correspondientes a las formas ácidas. En la Tabla 9.1 se listan los valores de longitud de onda para cada máximo. También se observaron diferencias en las intensidades de emisión de las dos formas ácido-base estudiadas para cada compuesto, pero este punto será discutido más adelante, cuando se presenten los rendimientos cuánticos de fluorescencia. No obstante, debe mencionarse que el elevado ruido que se aprecia en los espectros de emisión del ácido fólico tiene su origen en una intensidad extremadamente baja en comparación con los demás compuestos estudiados.

Como se observó anteriormente en este Capítulo los espectros de absorción de las pterinas presentan más de una banda de absorción, dos bandas al menos. Esto indica que el estado basal de las pterinas pasa a más de un estado excitado, por absorción de luz. Estos estados excitados pueden ser fluorescentes o no. Para investigar este punto se obtuvieron los espectros de emisión excitando a distintas longitudes de onda.



Figura 9.8: Espectros de emisión normalizados de soluciones de pterinas en su forma ácida ( ) y alcalina ( ). Longitud de onda de excitación: 350 nm.

compuesto	forma ácida (pH = 5.5)	forma alcalina (pH = 10.5)	
pterina	439	456	
6-carboxipterina	439	451	
6-formilpterina	446	454	
ácido fólico	445	455	
neopterina	440	454	
biopterina	441	455	

 Tabla 9.1: Máximos de los espectros de emisión en nm (error 3 nm).

En la Figura 9.9 se muestran los espectros de emisión normalizados obtenidos excitando la forma ácida de los seis compuestos a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción. Análogamente, en la Figura 9.10 se presenta la misma información referida a las formas alcalinas.

Se puede observar en todos los casos que los espectros de emisión normalizados coinciden independientemente de la longitud de onda de excitación. Estos resultados sugieren que existe un solo estado excitado emisor para cada pterina, independientemente de la luz de excitación. Es decir, todos los estados excitados decaen a un único estado excitado (el estado excitado de menor energía) y la emisión fluorescente ocurre desde allí.



Figura 9.9: Espectros de emisión de soluciones ácidas (pH = 5.5) de pterinas por excitación con luz de diferentes longitudes de onda.



Figura 9.10: Espectros de emisión de soluciones alcalinas (pH = 10.5) de pterinas por excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

#### Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) por excitación a 350 nm, en el rango de pH comprendido entre 4.9–5.5, para las formas ácidas, y en el rango de pH comprendido entre 10.0–10.5, para las alcalinas. Se analizaron soluciones burbujeadas con argón, equilibradas con aire y saturadas con oxígeno. Se midieron los rendimientos cuánticos de pterina, 6-carboxipterina, 6formilpterina, ácido fólico, neopterina y biopterina, de acuerdo con la técnica detallada en el *Capítulo 5*. Los resultados se muestran en la Tabla 9.2.

compuesto	forma ácido-base	F (aire) ±0.01	F (argón) ±0.01	F (O₂) ±0.01
pterina	ácida	0.32	0.33	0.31
	alcalina	0.27	0.27	0.27
6-carboxipterina	ácida	0.26	0.28	0.27
	alcalina	0.18	0.18	0.20
6-formilpterina	ácida	0.12	0.12	0.12
	alcalina	0.07	0.07	0.07
ácido fólico	ácid a	<0.005	< 0.005	< 0.005
	alcalina	<0.005	< 0.005	< 0.005
neopterina	ácida	0.38		
	alcalina	0.31		
biopterina	ácida	0.36		
	alcalina	0.29		

Tabla 9.2: Rendimientos cuánticos de fluorescencia  $(_{\rm F})$  de cada forma ácidobase en diferentes atmósferas.

Para todos los compuestos analizados se obtuvieron valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia relativamente altos, excepto para el ácido fólico que presenta, tanto en su forma ácida como para su forma alcalina, valores de rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menores. Este comportamiento particular del ácido fólico puede ser explicado mediante distintas hipótesis. Podría, por ejemplo, existir un eficiente mecanismo adicional de desactivación no radiativo del estado singlete excitado. Un cruzamiento intersistemas más eficiente que el existente en las otras pterinas podría ser también considerado. Por último, el ácido fólico presenta vías de degradación fotoquímica que compiten con la desactivación por fluorescencia. Sin embargo, los rendimientos cuánticos de fotólisis son muy bajos como para justificar semejante descenso en los valores de rendimientos cuánticos de fotólisis que se encuentran en literatura son 0.025 [Thomas *et al.*, 2000] para la forma ácida y 0.0051 para la forma alcalina [Thomas *et al.*, 2002].

Por otro lado, los rendimientos cuánticos del resto de las pterinas muestran significativas diferencias entre sí, habiéndose obtenido valores que van desde 0.07 hasta 0.38. Es importante mencionar también que, en todos los casos, excepto para el ácido fólico, los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las formas ácidas son mayores que los correspondientes a las formas alcalinas. Del análisis de los valores presentados en la Tabla 9.2, puede concluirse que la emisión fluorescente de las pterinas es apreciablemente afectada tanto por el pH del medio como por el sustituyente presente en la posición 6 de su estructura molecular.

Asimismo, se determinaron valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia para pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina y ácido fólico en soluciones burbujeadas con argón (libres de oxígeno) y en soluciones saturadas con oxígeno. En todos los casos se observa que no existen diferencias significativas entre los tres grupos de valores. Los resultados se muestran en la Tabla 9.2. Este análisis indica que los estados singletes excitados de las pterinas no son desactivados significativamente por el oxígeno.

#### Espectros de excitación.

Se obtuvieron los espectros de excitación corregidos de las formas ácidas y alcalinas de pterina, biopterina y neopterina, aplicando el protocolo descripto en el *Capítulo 5.* Estos experimentos se realizaron en condiciones de pH similares a las mencionadas en la Sección anterior y la emisión de las muestras se detectó a 450 nm. En todos los casos se emplearon soluciones aireadas.

En las Figuras 9.11, 9.12 y 9.13 pueden observarse los espectros de excitación corregidos normalizados junto a los espectros de absorción normalizados. Con fines comparativos todos los espectros, de excitación y absorción, se normalizaron a la longitud de onda del máximo de la banda de menor energía. En todos los casos puede observarse que los espectros de excitación y absorción coinciden en los máximos de las distintas bandas; sin embargo, no se superponen entre sí. Esto se debe, fundamentalmente a que la relación de intensidades entre la banda de mayor energía (entre 230 y 290 nm) y la banda de menor energía (entre 310 y 400 nm) en los espectros de excitación es menor que la relación equivalente en los espectros de absorción.

Tal como se detalló anteriormente, del análisis de los espectros de absorción y emisión puede desprenderse que en las pterinas existen, al menos, dos estados excitados singletes, de los cuales sólo el de menor energía  $(S_1)$  emite y el de mayor energía  $(S_2)$ , no emisor, decae a  $S_1$ . De la comparación de los espectros de excitación y absorción mostrados en esta sección puede deducirse que sólo una porción de las moléculas excitadas a  $S_2$  decae a  $S_1$ . Esto implica que el estado excitado  $S_2$  posee otras vías de desactivación que compiten eficientemente con la conversión interna a  $S_1$ . Esto se ve reflejado cuando se calculan los rendimientos cuánticos de fluorescencia a distintas longitudes de onda a partir de los espectros de excitación. En efecto, en la tabla 9.3 se muestran estos valores, apreciándose que para los tres compuestos analizados los rendimientos cuánticos de fluorescencia cuando se excita a longitud es de onda correspondientes a la banda de mayor energía son menores que a 350 nm (valores listados en la tabla 9.2).


Figura 9.11: Espectros normalizados de excitación ( ) y absorción ( ) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de pte rina.



Figura 9.12: Espectros normalizados de excitación ( ) y absorción ( ) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de biopterina.



Figura 9.13: Espectros normalizados de excitación ( ) y absorción ( ) de (a) forma ácida (pH=5.5) y (b) forma alcalina (pH=10.7) de neopterina.

compuesto	forma ácido-base	(nm)	F	350 F
pterina	ácida	270	0.20	0.32

	alcalina	251	0.11	0.27
hiantarina	ácida	273	0.25	0.36
Diopterina	alcalina	254	0.21	0.29
neopterina	ácida	274	0.26	0.38
	alcalina	254	0.15	0.31

Tabla 9.3: Rendimiento cuántico de fluorescencia en el máximo de la banda de absorción de menor energía  $(F_F)$  (calculado del espectro de excitación). Con fines comparativos, en la última columna se listan los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos a 350 nm  $(F_F)$  (Tabla 9.2).

### Tiempos de vida de fluorescencia.

Mediante la técnica de *Single Photon Counting* se analizó la evolución de la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo, para las formas ácidas y básicas de los compuestos estudiados, con el fin de determinar los tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ). Las trazas experimentales fueron analizadas con el programa del equipo mediante ajustes no lineales luego de realizar la deconvolución de la señal de la lámpara. En todos los experimentos se probaron ajustes exponenciales de primer orden, de segundo orden y biexponenciales. Se observó que todos los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la Figura 9.14, a modo de ejemplo, se muestra una traza típica registrada para biopterina. Los tiempos de vida de fluorescencia para las formas ácidas se obtuvieron promediando al menos tres valores en el rango de pH comprendido entre 3.0 y 6.2. De la misma manera, se obtuvieron los tiempos de vida de fluorescencia para las formas básicas promediando al menos dos valores en el rango de pH comprendido entre 9.0 y 11.0. Estos resultados se muestra en la Tabla 9.4.



Figura 9.14: Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.
(a) Traza experimental obtenida para una solución de biopterina a pH 6.2
( ). Experimento realizado excitando a 350 nm y registrando a 450 nm. La línea roja representa el ajuste no lineal. (b) Residuos. (c) Decaimiento ( ) y ajuste ( ) en escala logarítmica.

	<sub>F</sub> (ns)		
Compuesto	forma ácida	forma básica	
pterina	7.6	5.0	
6-carboxipterina	5.8	4.1	
6-formilpterina	7.9	2.2	
ácido fólico	7.0	3.5	
biopterina	9.1	7.6	
neopterina	8.9	7.4	

Tabla 9.4: Tiempos de vida de fluorescencia (F) de las formas ácida y alcalina (error 0.4 ns).

Puede observarse que los tiempos de vida de fluorescencia para las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas. También es apreciable que se encuentran afectados por el tipo de sustituyente en la posición 6.

Los tiempos de vida de fluorescencia obtenidos corresponden a tiempos de vida de los estados excitados (S<sub>1</sub>):

$$\tau_{\rm F} = 1 / k_{\rm F}$$

donde  $k_{\rm F}$  corresponde a la suma de todas las constantes de velocidad de los distintos procesos que contribuyen al decaimiento del estado excitado. Por ejemplo, si consideramos que la fluorescencia del estado excitado S<sub>1</sub> compite con conversión interna a S<sub>0</sub> ( $k_{\rm IC}$ ) y cruzamiento intersistemas ( $k_{\rm ISC}$ ), la velocidad de decaimiento de la

$$-d[S_{1}] / dt = k_{F}^{0}[S_{1}] + k_{IC}[S_{1}] + k_{ISC}[S_{1}] = k_{F}[S_{1}]$$

concentración S<sub>1</sub> vendrá dada por:

donde  $k_{\rm F}^{0}$  es la constante de velocidad de fluorescencia intrínseca o natural. La constante  $k_{\rm F}$ , obtenida experimentalmente, es:  $k_{\rm F} = \sum k_{\rm i}$ .

Puede deducirse la siguiente expresión para el rendimiento cuántico de fluorescencia:

$$\Phi_{\rm F} = \frac{k_{\rm F}^{0}}{\sum k_{\rm i}} = \tau_{\rm F} k_{\rm F}^{0}$$

Esta expresión permite calcular  $k_{\rm F}^{0}$  a partir de  $\Phi_{\rm F}$  y  $\tau_{\rm F}$ . Los valores de  $k_{\rm F}^{0}$  obtenidos de esta manera se listan en la Tabla 9.5.

	$k_{\rm F}^{0} ({\rm ns}^{-1})$		
Compuesto	Forma ácida	Forma alcalina	
pterina	0.042	0.043	
6-carboxipterina	0.045	0.055	
6-formilpterina	0.015	0.033	
biopterina	0.039	0.038	
neopterina	0.043	0.042	

Tabla 9.5: Constantes de velocidad intrínseca  $(k_{\rm F}^{0}, {\rm ns}^{-1})$ 

Observando el conjunto de datos de la Tabla 9.5, puede apreciarse que, excepto para el caso de la 6-formilpterina, todos los valores de constantes de velocidad intrínseca  $(k_{\rm F}^0)$  son similares. Esto sugiere que la velocidad de desactivación del estado excitado S<sub>1</sub> por fluorescencia es similar para todas las pterinas estudiadas y es independiente de la forma ácido-base. Por consiguiente, las diferencias observadas en los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) y tiempos de vida ( $\tau_F$ ) experimentales deben ser consecuencia de diferencias en las constantes de velocidad de otros procesos de desactivación (conversión interna, cruzamiento intersistemas), más que a diferencias en las constantes de velocidad del decaimiento por fluorescencia ( $k_F^0$ ).

### Emisión fluorescente de pterinas en soluciones fuertemente alcalinas.

En ciertos experimentos, se observó que los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las pterinas disminuyen en soluciones fuertemente alcalinas (pH > 11). Es importante recordar que a estos valores de pH no existen equilibrios ácido-base que puedan justificar variaciones en la emisión fluorescente. Por ello se decidió realizar un estudio sistemático de este fenómeno sobre tres compuestos de la familia: pterina, 6- carboxipterina y 6-formilpterina. Se llevaron a cabo medidas estacionarias y resueltas en el tiempo. En ambos casos se realizaron series de experimentos empleando soluciones con concentración de pterina constante y valores de pH creciente.

Se observó que los espectros de emisión de los tres compuestos analizados disminuyen progresivamente en intensidad al aumentar el pH por encima de 11. Sin embargo, los máximos de emisión de estos espectros no varían con el pH. A modo de ejemp lo, en la Figura 9.15, se muestra este fenómeno para la 6carboxipterina. Por otro lado, se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) para los mencionados compuestos en función del pH. Para ello se realizaron experimentos similares a los descriptos en el Capítulo anterior (se excitó a 350 nm y se registró la emisión a 450 nm en función del tiempo). Se observó en todos los casos que los tiempos de vida de fluorescencia disminuyen progresivamente con valore de pH superiores a 11. En la Figura 9.16 se puede apreciar los resultados obtenidos en estos experimentos para 6-carboxipterina.



Figura 9.15: Espectros de emisión de soluciones fuertemente alcalinas de 6-carboxipterina.



Figura 9.16: Variación de la intensidad fluorescente en función del tiempo. Trazas obtenidas para soluciones de 6-carboxipterina a diferentes pH. Se excitó con luz de 350 nm y se registró a 450 nm.

Se analizó la dependencia de la intensidad de fluorescencia (determinada como el área bajo el espectro de emisión) Se encontró un comportamiento lineal de Stern-Volmer para la variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de hidroxilos. En la Figura 9.17, se muestran las correspondientes gráficas de Stern-Volmer obtenidas para los tres compuestos estudiados. Análogamente, se encontró el mismo tipo de relación para la dependencia de los tiempos de vida con la concentración de hidroxilos. Las gráficas de Stern-Volmer pueden observarse en la Figura 9.17. En estos experimentos los valores de I<sub>0</sub> y  $\tau_0$  se obtuvieron promediando valores correspondientes a pH entre 10.0 y 10.8.

En la tabla 9.6 pueden observarse los valores de las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) obtenidos de las gráficas presentadas en la Figura 9.17. Puede apreciarse que, para una determinada sustancia analizada, los dos valores de constantes de Stern-Volmer obtenidos en los experimentos de estado estacionario y tiempo de vida de fluorescencia, son similares. Estos resultados permiten inferir que el fenómeno de disminución de la intensidad de la emisión fluorescente de las pterinas al aumentar el pH es un proceso de *quenching* de fluorescencia dinámico por iones hidroxilo.

Con las constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) obtenidas y con los valores de  $\tau_F$ , se calcularon las constantes de velocidad bimoleculares del *quenching* de fluorescencia ( $k_q$ ) por hidroxilos Se utilizó para estos cálculos un promedio de los valores de  $K_{SV}$  obtenidos de las gráficas de Io/I vs. OH <sup>-</sup> y de  $\tau_o / \tau$  vs. OH <sup>-</sup>. Estos resultados se muestran en la Tabla 9.6.



Figura 9.17: Gráficas de Stern-Volmer: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia  $(I_F)$  como función de la concentración de hidroxilos. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia  $(F_F)$  como función de la concentración de hidroxilos. Ambas series de experimentos se realizaron excitando a 350 nm.

Compuesto	K <sub>SV</sub> ( 1 M <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$K_{SV} (1 M^{-1})^{b}$	$k_{\rm q}$ ( 0.1 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
pterina	20	16	3.6 x 10 <sup>9</sup>
6-carboxipterina	7.7	8.1	1.9 x 10 <sup>9</sup>
6-formilpterina	26	23	1.1 x 10 <sup>10</sup>

Tabla 9.6: Resultados de análisis de Stern-Volmer.  ${}^{a}K_{sv}$  obtenidos de la intensidad de fluorescencia.  ${}^{b}K_{sv}$  obtenidos de las medidas de tiempos de vida de fluorescencia.

### Titulaciones ácido base

Para pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina se realizaron titulaciones ácidobase siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Se preparó una solución inicial con pH = 12 y concentración tal que la absorbancia a 350 nm ( $A^{350}$ ) fuera menor a 0.12. Se varió el pH agregando alícuotas de solución de HCl o NaOH de volumen despreciable. Por lo tanto, se trabajo a concentración de sustancia estudiada y fuerza iónica constante. Se obtuvieron espectros de emisión, excitando a 350 nm, de soluciones con distintos valores de pH. La intensidad de la emisión (I) de estos espectros se obtuvo integrando entre 360 y 600 nm.

En estas condiciones experimentales la absorbancia a 350 nm de las soluciones varía con el pH, debido a que las distintas formas ácido-base de cada pterina presentan diferentes coeficientes de extinción molar a dicha longitud de onda. Por consiguiente, para poder analizar la dependencia de la intensidad de la emisión de fluorescencia como una función del pH es necesario realizar una corrección por absorbancia. De este modo, para cada valor de intensidad obtenido se realizó la siguiente corrección:

$$I^{corr} = \frac{I}{1 - 10^{(-A350 (pH=x))}}$$

donde I<sup>corr</sup> es la intensidad de fluorescencia corregida por absorbancia, I es la integral del espectro de emisión de fluorescencia a determinado pH y A<sup>350</sup> es la absorbancia a 350 nm. La absorbancia a 350 nm se obtuvo de bs correspondientes espectros de absorción.

La Figura 9.18 muestra la variación de las integrales de la intensidades de fluorescencia corregidas por absorbancia como una función del pH en el rango entre 4 y 10.5. La conducta observada en esta figura se debe al equilibrio previamente mencionado entre las formas ácida y básica de las pterinas. Se realizaron ajustes no lineales de estas curvas con la siguiente ecuación:

$$I^{corr} = I^{corr}_{a} + (I^{corr}_{b} - I^{corr}_{a}) \cdot [Ka / (Ka + [H^+])(1)]$$

donde  $I_{a}^{corr}$  e  $I_{b}^{corr}$  son las integrales de la intensidad de fluorescencia de la forma ácida y de la forma alcalina respectivamente, Ka es la constante de disociación.

Los resultados de estos ajustes se muestran en la Figura 9.18. Puede apreciarse que en los tres casos analizados el comportamiento experimental puede ser ajustado con la ecuación propuesta. Puede, por consiguiente, interpretarse dicho comportamiento reconociéndose tres regiones de pH. Existe un rango de pH en el cual sólo existe la forma ácida del compuesto, en el cual no hay variaciones en el espectro de emisión y, por ende, en su integral. Análogamente existe un rango de pH en el cual sólo está presente la forma básica. Por último, existe un rango de pH, ubicado entre los dos anteriormente mencionados, en el cual coexisten las dos formas ácido-base y, consecuentemente, la intensidad de la emisión fluorescente toma valores intermedios.

Los valores de Ka obtenidos mediante estos ajustes no lineales y los valores de literatura obtenidos de titulaciones espectrofotométricas se listan en la Tabla 9.7 [Monópoli *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2000]. No hay diferencia

significativa entre los dos grupos de resultados experimentales para pterina y 6carboxipterina. Este hecho sugiere dos posibles explicaciones. Por un lado, que las constantes de disociación del equilibrio entre las dos formas ácido-base de los estados singletes excitados son iguales que las constantes de disociación correspondientes al mismo equilibrio en estado basal. Por el otro, que la desactivación de los estados excitados singletes de las formas ácidas es mucho más rápida que la desprotonación.



Figura 9.18: Variación de la intensidad de fluorescencia corregida por la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación (350 nm) como función del pH. En línea continua se observa la intensidad de fluorescencia calculada ajustando los datos experimentales con la ecuación (1).

Compuesto Ka <sup>1</sup>		pKa <sup>1</sup>	Ka <sup>2</sup>	pKa²
Pterina	1.23x10 <sup>-8 +</sup> /- 6x10 <sup>-10</sup>	7.9	1.0x10 <sup>-8 +</sup> /- 2x10 <sup>-9</sup>	8.0
6-carboxypterina	1.3x10 <sup>-8</sup> +/- 1x10 <sup>-9</sup>	7.9	1.8x10 <sup>-8 +</sup> /- 4x10 <sup>-9</sup>	7.7
6-formylpterina	4.7x10 <sup>-8</sup> +/- 2x10 <sup>-9</sup>	7.3	1.7x10 <sup>7 +</sup> /- 6x10 <sup>-8</sup>	6.8

Tabla 9.7: Valores de pKa para el equilibrio mostrado en la Figura 9.13 <sup>1</sup>Valores publicados previamente en la literatura por titulaciones espectrofotométricas. <sup>2</sup>valores obtenidos para este trabajo de la intensidad de fluorescencia experimental. Los errores se estimaron con <sub>n-1</sub>.

Sin embargo, en el caso de la 6-formilpterina las diferencias en los valores de las constantes de disociación son significativas, teniendo en cuenta sendos errores experimentales. Estos resultados sugieren la existencia de un equilibrio ácido-base en el estado excitado de formilpterina más ácido que en el estado basal.

# **QUENCHING DE FLUORESCENCIA POR ANIONES**

Como se mencionó en el Capítulo 6 algunas sustancias pueden producir una disminución de la emisión fluorescente, siguiendo una comportamiento de Stern-Volmer. En muchos estudios fotofísicos es frecuente el uso de soluciones reguladoras para controlar el pH de trabajo. Sin embargo, en algunos casos, los aniones presentes en dichas soluciones pueden disminuir la fluorescencia de moléculas emisoras en solución acuosa. En distintos experimentos, encarados durante la realización del presente trabajo de tesis, se detectó que la fluorescencia de las pterinas disminuía si en la solución se hallaban presentes aniones fosfato en concentraciones del orden de 100 mM; es decir, estos experimentos sugerían un fenómeno de quenching de fluorescencia. Este hecho es relevante teniendo en cuenta las aplicaciones analíticas que posee la fluorescencia de las pterinas [McCormack v Newman, 1985]. En efecto, tal como se mencionó anteriormente, esta propiedad es empleada en la determinación cuantitativa de pterinas. En particular, estas determinaciones son muy frecuentes en estudios de química biológica y bioquímica clínica. Uno de los métodos más usados con este fin, es el de HPLC con detector de fluorescencia. En esta técnica, las sustancias presentes en la muestra a analizar son separadas en una columna cromatográfica y luego pasan por un detector que mide la fluorescencia. Generalmente, se usan como eluentes (fase móvil) soluciones reguladoras con altos contenidos de aniones, por ejemplo fosfato. Está claro que, si la emisión fluorescente de las pterinas se ve afectada por la presencia de fosfato u otros aniones en la solución, esto puede, a su vez, afectar la sensibilidad de la determinación analítica de las pterinas por el método descripto, o por cualquier otro método que suponga una relación lineal entre la luz emitida y la concentración de un

determinado derivado pterínico. También es importante desde el punto fotofísico y fotoquímico, ya que algunos estudios publicados en estos temas sobre pterinas y otras moléculas orgánicas, han sido realizados en soluciones reguladoras de aniones fosfato.

Debido a estas consideraciones, resultó interesante encarar un estudio sistemático acerca de la influencia que distintos aniones tie nen sobre la fluorescencia de las pterinas. Evidentemente, son de particular interés aquellos aniones que pueden ser usados en distintos tipos de experimentos con pterinas; por ejemplo, aquellos presentes frecuentemente en eluentes de técnicas cromatográficas, aquellos usados para fijar la fuerza iónica o el pH, etc. En este capítulo se muestran los resultados de dicho estudio, realizado sobre cinco compuestos pterínicos: pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, biopterina y neopterina. El ácido fólico no pudo ser estudiado, debido a su extremadamente débil emisión. En una primer etapa se realizaron estudios de emisión total con el espectrofotómetro Cary 3, y en función de esos resultados preliminares, se llevó a cabo un estudio sistemático con la técnica de *Single Photon Counting*, en el cual se hicieron tanto medidas estacionarias como resueltas en el tiempo.

### Estudios de emisión total de fluorescencia.

Como estudios preliminares se realizaron medidas de emisión total de fluorescencia de pterinas en ausencia y presencia de aniones para determinar cuáles aniones producen *quenching* de fluorescencia en estos compuestos. Por otra parte, con este primer estudio, se evaluó si el fenómeno observado es un comportamiento general de toda la familia de las pterinas, o si sólo algunas de ellas lo sufren. Para obtener respuestas generales y fijar condiciones experimentales se plantearon experimentos sencillos, que permitieran un primer análisis del fenómeno, midiendo emisión total fluorescente en un espectrofotómetro Cary 3 de Varian (descripto en el *Capítulo 5*). Se excitaron las pterinas con luz UV-A de 340 nm y se registró toda la emisión fluorescente entre 200 y 700 nm. Se tomaron espectros de absorción antes y después

de las mediciones de fluorescencia para controlar cambios fotoquímicos no deseados durante la irradiación. No se observó, en ningún caso, cambio alguno en los espectros de absorción, lo que implica que no ocurrieron cambios fotoquímicos apreciables en estos experimentos.

Se prepararon soluciones de pterinas de concentración 5 x  $10^{-5}$  M en ausencia de aniones y soluciones de igual concentración de pterina y concentraciones relativamente altas de los aniones investigados (20 a 100 mM). Se comparó la emisión total de las correspondientes soluciones con y sin aniones. En los casos en los que se observó disminución de la fluorescencia en presencia de determinado anión, se realizaron medidas a distintas concentraciones de dicho anión. Las pterinas utilizadas en estos experimentos fueron: *pterina*, *6-carboxipterina* y *6-formilpterina*. Los aniones ensayados fueron: *acetato* (20 mM), *sulfato* (50 mM) *cloruro* (50mM), *nitrato* (50 mM) y *fosfato* (50mM). Además, para cada compuesto se realizaron series de experimentos en dos condiciones de pH: una en el rango comprendido entre 6.0 y 6.5 (con predominio de la forma ácida de las pterinas) y otra a pH cercanos a 10.0 (con predominio de la forma alcalina).

Se observó que los aniones fosfato y acetato provocan una importante reducción de la emisión fluorescente de las pterinas en su forma ácida, mientras que los aniones cloruros, sulfatos y nitratos no producen una disminución apreciable de la misma. Por otro lado, a pH cercano a 10 ninguno de los aniones evaluados producen *quenching* de fluorescencia apreciable. Estos primeros resultados se presentan en la Tabla 10.1 donde se informa si se observó o no *quenching* para cada pterina, en su forma ácida, con el correspondiente anión.

Como control se realizaron experimentos a valores de pH mayores que 11, en los cuales se observó una fuerte disminución de la emisión fluorescente en ausencia de aniones, lo cual es coincidente con los resultados hallados con la técnica de *Single Photon Counting* mostrados anteriormente (*Capítulo 9*).

En la Figura 10.1 se muestra el efecto de la concentració n de fosfato en la variación de la emisión fluorescente de soluciones, ácidas y alcalinas, de pterina, 6-

carboxipterina y 6 formilpterina. Puede observarse que el *quenching* en soluciones alcalinas es leve o despreciable, pero que es importante en las ácidas. En la Figura 10.2 puede observarse que en todos los casos analizados la dependencia de la emisión de las formas ácidas con la concentración de fosfato corresponde a un comportamiento de Stern-Volmer. Sin embargo, no se calcularon las correspondientes constantes de Stern-Volmer (K<sub>SV</sub>) por considerarse que el método empleado para cuantificar la emisión presenta un error muy grande.

compuesto	fosfato	acetato	sulfato	cloruro	nitrato
pterina	SÍ	sí	no	no	no
6-carboxipterina	SÍ	sí	no	no	no
6-formilpterina	SÍ	sí	no	no	no

 Tabla 10.1: Presencia de quenching de fluorescencia de pterinas con diferente aniones a pH entre 6.0 y 6.5.



Figura 10.1: Emisión de fluorescencia de soluciones 5 x 10<sup>-5</sup> M de pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina a pH 6.3 ( <sup>●</sup>) y pH 10.0 (<sup>■</sup>) en presencia de aniones fosfato.



Figura 10.2: Representación de Stern-Volmer para la emisión de fluorescencia de soluciones ácidas de pterinas (5 x 10<sup>-5</sup> M) en presencia de aniones fosfato.

Análogamente, la Figura 10.3 muestra cómo los aniones acetato producen una disminución de la emisión de fluorescencia de las tres pterinas estudiadas. Se aprecia la misma particularidad que se observó para los aniones fosfato: el *quenching* de fluorescencia es importante en medio ácido, pero no se produce en medio alcalino.

También puede apreciarse en la Figura 10.4 que en todos los casos analizados la dependencia de la emisión de las formas ácidas con la concentración de acetato corresponde a un comportamiento de Stern-Volmer.



Figura 10.3: Emisión de fluorescencia de soluciones 5 x 10<sup>-5</sup> M de pterina, 6-carboxipterina y 6-formilpterina a pH 6.3 (<sup>●</sup>) y pH 10.0 (■) en presencia de aniones acetato.



Figura 10.4: Representación de Stern-Volmer para la emisión de fluorescencia de soluciones ácidas de pterinas (5 x 10<sup>-5</sup> M) en presencia de aniones acetato. Estudio en estado estacionario por *Single Photon Counting*.

Se estudió la variación de los espectros de emisión de las cinco pterinas mencionadas en la introducción, con la concentración de aniones fosfato y acetato. En todos los casos se realizaron los experimentos en, al menos, dos condiciones de pH. Adicionalmente se realizaron experimentos en presencia de iones cloruros. Si bien experimentos previos mostraron que este anión no produce *quenching* de fluorescencia, es importante corroborar el resultado para descartar la existencia de algún efecto de la fuerza iónica sobre la emisión fluorescente. Por consiguiente, se realizaron experimentos de control con concentraciones de cloruros mayores que las empleadas en los experimentos previos.

## Aniones fosfato

Para cada par de pterina y anión se tomaron los espectros de emisión a distintas concentraciones del anión, manteniendo constante la concentración de la pterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M). Puede deservarse claramente una disminución en la emisión fluorescente al aumentar la concentración del anión en soluciones ácidas, pero una leve (en al caso de pterina) o nula (para 6-carboxipterina) disminución en soluciones alcalinas (este efecto no se observó en los experimentos de emisión total con el espectrofotómetro Cary 3). A modo de ejemplo, en las Figuras 10.5 y 10.6 se muestran los resultados de estos experimentos para pterina y 6-carboxipterina, tanto en medio ácido como en medio alcalino.

En las Figuras 10.7 a 10.16 se muestran las gráficas de intensidad de fluorescencia (integral del espectro de emisión) en función de la concentración de aniones fosfato y las correspondientes gráficas de Stern-Volmer para pterina, 6carboxipterina, 6-formilpterina, biopterina y neopterina, tanto para sus formas ácidas, como para las alcalinas. En todos los casos se observó un comportamiento similar. Pueden apreciarse relaciones de Stern-Volmer en todos los experimentos realizados para las formas ácidas de las pterinas investigadas. Las correspondientes constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) se listan en la Tabla 10.2.



Figura 10.5: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de pterina ( $2.5 \times 10^{-5}$  M) en presencia de aniones fosfato.



Figura 10.6: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de 6-carboxipterina ( $2.5 \times 10^5$  M) en presencia de aniones fosfato.



Figura 10.7: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.8: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.9: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6carboxipterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.10: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.11: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x  $10^5$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.12: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina ( $2.5 \times 10^5 \text{ M}$ ) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.13: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.14: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.15: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.16: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Compuesto	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) forma ácida	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) forma alcalina
pterina	11.7	0.9
6-carboxipterina	6.1	
6-formilpterina	6.4	
biopterina	13.7	0.8
neopterina	12.7	0.7

Tabla 10.2: Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones fosfato, calculadas a partir de medidas estacionarias de emisión.

## Aniones acetato

Un conjunto de experimentos similar al que se acaba de presentar se llevó a cabo con aniones acetato. Se tomaron los espectros de emisión de mezclas de las distintas pterinas con aniones acetato a pH 6.2 y 10.0. Análogamente, en soluciones ácidas se observó un fuerte *quenching* de la emisión fluorescente. En soluciones alcalinas este efecto es despreciable. En la Figura 10.17 se observan los espectros de emisión de una solución de pterina ( $2.5 \times 10^{-5}$ ) M, en sus formas ácida y alcalina, a diferentes concentraciones de aniones acetato. El mismo fenómeno se observa en todas las pterinas estudiadas. Las gráficas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de anión y los correspondientes análisis de Stern-Volmer se muestran en las Figuras 10.18 a 10.27.

En la tabla 10.3 se listan los valores de las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) obtenidas en estos experimentos. Puede apreciarse, en primer lugar, que todos los valores en medio ácido son del orden de los obtenidos en los experimentos con fosfato, pero ligeramente mayores. Otra observación que puede realizarse es que el orden de los valores obtenidos para los diferentes compuestos es el mismo para los dos aniones,

siendo la constante de Stern-Volmer de pterina la mayor, y la de 6-carboxipterina la menor. Por último, debe marcarse que para las formas alcalinas no pudo detectarse efecto de quenching en ninguna de las pterinas analizadas, aún habiéndose realizado medidas en soluciones con concentraciones de acetato cercanas a 1 M.



Figura 10.17: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones ácidas y alcalinas de pterina ( $2.5 \times 10^{-5}$  M) en presencia de aniones acetato.



Figura 10.18 (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.19: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.20: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.21: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.22: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.23: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.24: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.25: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.26: (a) Variación de la intensidad de fluoresœncia de una solución de neopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 6.2 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.


Figura 10.27: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) de pH 10.0 en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Compuesto	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) forma ácida	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) forma alcalina
pterina	17.5	
6-carboxipterina	9.4	
6-formilpterina	11.0	
biopterina	14.6	
neopterina	14.3	

Tabla 10.3: Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones acetato, calculadas a partir de medidas estacionarias de emisión.

Aniones cloruros

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en la intensidad de fluorescencia de las pterinas se llevaron a cabo estudios similares a los descriptos para aniones acetato y fosfato, sobre soluciones conteniendo cada una de las cinco pterinas  $(2.5 \times 10^{-5} \text{ M})$  y aniones cloruro. Se eligieron altas concentraciones de cloruros, hasta 500 mM. Para ninguna de las pterinas estudiadas se encontró un descenso apreciable de la emisión fluorescente, descartando de esta forma cualquier efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia.

## Estudio resuelto en el tiempo por Single Photon Counting.

Se realizaron experimentos resueltos en el tiempo para analizar la influencia de los aniones en los tiempos de vida de fluorescencia de las formas ácidas de las pterinas. Se prepararon las soluciones acuosas similares a las que se utilizaron en las medidas estacionarias de fluorescencia. Para cada solución se registró el decaimiento de la intensidad fluorescente en función del tiempo.

En todos los casos se observó una significativa disminución de los tiempos de vida de fluorescencia al aumentar la concentración de iones fosfatos. En la Figura 10.28 pueden apreciarse los decaimientos de la emisión fluorescente registrados en soluciones de biopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en presencia de aniones fosfato a pH 6.2. En este gráfico se muestran también los ajustes no lineales realizados suponiendo un comportamiento cinético de primer orden. Puede observarse claramente que al aumentar la concentración del anión, el proceso se acelera. En las gráficas 10.29 a 10.33 se puede observar las variaciones de los tiempos de vida con la concentración de fosfato y los correspondientes análisis de Stern-Volmer.

Figura 10.28: Variación de la emisión fluorescente en función del tiempo de una solución de biopterina (2.5 x  $10^{-5}$  M) de pH 6.2. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones fosfato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.



Figura 10.29: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de pterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2.
(b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.30: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina ( $2.5 \ge 10^{-5}$  M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.31: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de6-formilpterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en función de la concentración de aniones fosfato apH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.32: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de biopterina  $(2.5 \times 10^5 \text{ M})$  en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.33: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en función de la concentración de aniones fosfato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

El mismo tipo de resultados se obtuvo en los experimentos realizados con acetato. A modo de ejemplo, en la Figura 10.34 se muestran las trazas obtenidas con soluciones de biopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) y los correspondientes ajustes no lineales. Puede apreciarse claramente que los tiempos de vida de fluorescencia disminuyen al aumentar la concentración del ión acetato. En las Figuras 10.35 a 10.39 se muestra la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia de los cinco compuestos estudiados con la concentración del ión y las correspondientes gráficas de Stern-Volmer.



Figura 10.34: : Variación de la emisión fluorescente en función del tiempo de una solución de biopterina ( $2.5 \times 10^{-5}$  M) de pH 6.2. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones acetato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.



Figura 10.35: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de pterina  $(2.5 \times 10^5 \text{ M})$  en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.36: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-carboxipterina  $(2.5 \times 10^{-5} \text{ M})$  en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.37: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de 6-formilpterina ( $2.5 \ge 10^{-5}$  M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.38: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de biopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Figura 10.39: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de una solución de neopterina (2.5 x 10<sup>-5</sup> M) en función de la concentración de aniones acetato a pH 6.2. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Los valores de las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) obtenidas en los experimentos resueltos en el tiempo, tanto como para fosfato como para acetato, se listan en la Tabla 10.4. Puede apreciarse que estos valores son similares a los obtenidos en las medidas estacionarias (Tabla 10.2 y 10.3). Este hecho permite inferir, teniendo en cuenta las consideraciones teóricas expuestas en el *Capítulo 6*, que el proceso de quenching es de tipo dinámico.

Compuesto	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) Iones fosfato	K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> ) Iones acetato
pterina	12.7	14.2
6-carboxipterina	5.1	9.3
6-formilpterina	6.1	12.8
biopterina	12.8	15.3

neopterina	10.9	12.5
------------	------	------

Tabla 10.4: Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para el proceso de quenching de fluorescencia de pterinas por aniones fosfato y acetato, calculadas a partir de medidas de emisión resueltas en el tiempo.

### Cálculo de las constantes bimolecular de quenching de fluorescencia.

Como se expuso en el *Capítulo 6*, la constante de Stern-Volmer se relaciona con la constante bimolecular de *quenching* de fluorescencia de la siguiente forma:

$$\mathbf{K}_{\mathrm{SV}} = \mathbf{\tau}_{\mathrm{F}}^{0} k_{\mathrm{q}}$$

Así el cálculo de la constante bimolecular de quenching de fluorescencia a partir de K<sub>SV</sub> es posible si se conoce el tiempo de vida de fluorescencia del compuesto estudiado en ausencia del *quencher* ( $\tau_{F}^{0}$ ). Los tiempos de vida de fluorescencia de cada pterina fueron presentados en el *Capítulo 9*. En la Tabla 10.5 se listan las constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia calculadas para las formas ácidas de las cinco pterinas estudiadas, con aniones acetato y fosfato. Los valores de K<sub>SV</sub> empleados para calcular estas constantes se obtuvieron promediando los valores obtenidos en los dos grupos de experimentos (medidas estacionarias y resueltas en el tiempo).

Compuesto	anión	$k_{\rm q} \ (10^9 \ {\rm M}^{-1} {\rm s}^{-1})$
ntoring	fosfato	1.61
pterina	acetato	2.09
6-carboxipterina	fosfato	1.93

	acetato	1.61
( formilatoria	fosfato	0.79
o-tormilpterina	acetato	1.51
Liontoring	fosfato	1.46
biopterina	acetato	1.64
noontoring	fosfato	1.33
пеориегша	acetato	1.51

 Tabla 10.5: Constantes bimolecular de quenching de fluorescencia de pterinas

 con aniones acetato y fosfato a pH 6.2.

De lo expuesto en el presente Capítulo se puede concluir que la fluorescencia exhibida por las formas ácidas de pterinas es fuertemente disminuida por aniones fosfato y acetato. Este *quenching* de fluorescencia observado es selectivo de algunos iones, ya que otros aniones, como sulfato, nitrato o cloruro, no lo producen.

El proceso de quenching estudiado tiene importancia analítica, ya que muchas técnicas utilizan la fluorescencia de las pterinas para su detección y cuantificación. Los solventes utilizados en dichas técnicas son, frecuentemente, *buffers* de fosfato. De acuerdo al pH elegido puede obtenerse mayor o menor sensibilidad en el método. Así, los iones fosfato y acetato en medio alcalino podrán usarse sin restricciones para detectar y cuantificar pterinas. Mientras que en medio ácido deberían tener en cuenta el proceso de quenching y realizarse las modificaciones necesarias para evitarlo.

## Capítulo 11

## PRODUCCIÓN DE OXIGENO SINGLETE

Como se detalló en el *Capítulo 2* existen muchas moléculas orgánicas que pueden actuar como sensibilizadores y producir oxígeno singlete al iluminar soluciones acuosas aireadas. El sensibilizador en su estado basal es un singlete y al absorber un fotón pasa a un estado singlete excitado, que luego puede formar un triplete excitado por cruzamiento intersistemas. Este triplete puede reaccionar con el triplete basal del oxígeno y formar oxígeno singlete [Foote *et al.*, 1995; Turro, 1991]. Por ello, y por la baja energía necesaria, el oxígeno molecular es un buen *quencher* de estados tripletes de moléculas orgánicas.

Es evidente que, debido a la amplia distribución de las pterinas en los sistemas biológicos, a su presencia en zonas expuestas a la luz solar, y, en particular, a su acumulación en la piel de los seres humanos afectados de enfermedades tales como vitiligo, es interesante investigar la capacidad de esta familia de compuestos para producir oxígeno singlete. En este capítulo se presentan resultados de un estudio realizado sobre este punto

#### Quenching de oxígeno singlete por pterinas en solución acuosa.

Tal como se detalló en la parte experimental (*Capítulo* 7), el método empleado para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia requiere del conocimiento de la constante de *quenching* total ( $k_T$ ) del sensibilizador estudiado. Es decir es necesario conocer la cantidad de oxígeno singlete generado que se desactiva con el propio sensibilizador. Se realizó este estudio para todos los compuestos de los cuales se quiere determinar el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete. Las medidas se realizaron en soluciones aireadas en medio alcalino (pD=10) y empleando rosa de bengala como sens ibilizador. La irradiación se realizó a 547 nm, longitud a la cual ninguna pterina absorbe luz.

Este estudio es interesante desde el punto de vista del mecanismo de las reacciones de fotooxidación de las pterinas, en particular para el ácido fólico. En efecto, en estudios previos de estas reacciones se sugirió que el oxígeno singlete podría actuar como intermediario activado en la fotooxidación del ácido fólico, tanto en medio ácido como en medio alcalino, sin embargo, no se presentó evidencia directa en este sentido [Thomas *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002].

Se realizó un estudio del *quenching* de oxígeno singlete por seis pterinas: pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, biopterina, neopterina y ácido fólico. En la Figura 11.1 se muestra, a modo de ejemplo, las señales obtenidas en un experimento típico. Se mantiene la concentración de sensibilizador (rosa de bengala) constante y se varía la concentración del *quencher* (una pterina, en este caso). Puede observarse que al aumentar la concentración de la pterina, la señal de oxígeno singlete disminuye. Esto significa que el oxígeno singlete es desactivado por la presencia de la pterina.

Se realizaron las gráficas de Stern-Volmer de la emisión infrarroja del oxígeno singlete según la Ecuación 12 que se describió en el *Capítulo 7*. Estas gráficas son lineales en el rango de concentraciones utilizadas (Figura 11.2). Los valores de  $k_{\rm T}$  se calcularon de las pendientes de las curvas, tomando el valor de 62 µs para el tiempo de vida del oxígeno singlete ( $\tau_{\Delta}$ ) en D<sub>2</sub>O. La Tabla 11.1 muestra estos resultados.

Los valores de  $k_{\rm T}$  para pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, neopterina, y biopterina son bastante similares (toman valores entre 1.4 - 2.9 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), mientras que la del ácido fólico es un orden de magnitud mayor. Este comportamiento especial del ácido fólico puede ser debido a la relativamente eficiente reacción entre el oxígeno singlete y este compuesto. Puede inferirse esta hipótesis de los resultados mencionados anteriormente sobre la fotoquímica del ácido fólico y 6-formilpterina en solución acuosa:

se ha sugerido que el oxígeno singlete es un intermediario en la fotooxidación autosensibilizada del ácido fólico, mientras que no está involucrado en el caso de la 6 formilpterina.



Figura 11.1: *Quenching* de  ${}^{1}O_{2}$  por ácido fólico. Soluciones de rosa de bengala (A<sup>547</sup> = 1.46) y diferentes concentraciones de ácido fólico: (a) 0 mM, (b) 0.09 mM, (c) 0.16 mM, (d) 0.32 mM, (e) 0.65 mM (f) 0mM.



Figura 11.2: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de la emisión infrarroja del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, biopterina, neopterina y ácido fólico.

Compuesto	K <sub>SV</sub> ( M <sub>-1</sub> )	$k_{\rm T}^{\rm a}  ({\rm M}^{-1}  {\rm s}^{-1})$
pterina	1.80 104	2.9x10 <sup>6</sup>
6-carboxipterina	$0.87 \ 10^4$	1.4x10 <sup>6</sup>
6-formilpterina	0.87 104	1.4x10 <sup>6</sup>
ácido fólico	1.86 10-3	3.0x10 <sup>7</sup>
biopterina	1.49 104	2.4x10 <sup>6</sup>
neopterina	1.41 104	2.3x10 <sup>6</sup>

Tabla 11.1: Valores de pendientes de las gráficas de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) y de constantes de velocidad de *quenching* total de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $k_T$ ), en soluciones aireadas de derivados pterínicos.

Pueden hacerse, en este punto, algunas especulaciones sobre estas diferencias en la reactividad frente al oxígeno singlete. Es bien sabido que las aminas reaccionan con el oxígeno singlete mediante un mecanismo que involucra transferencia de electrones [Darmanyan *et al.*, 1998]. Similarmente, podría existir una transferencia de electrones del nitrógeno unido al grupo metileno en la molécula de ácido fólico al oxígeno singlete, conduciendo a la oxidación de la amina (-CH<sub>2</sub>-NH-) a una imina (-CH=N-). La hidrólisis posterior podría inducir la ruptura y oxidación de la molécula para dar 6-formilpterina y ácido p-aminobenzoilglutámico. Esta serie de reacciones se muestra en la Figura 11.3.

Este tipo de mecanismo ha sido propuesto en la literatura para aminas primarias y secundarias [Gollnick y Lindner, 1973]. La ausencia del grupo amino en la estructura química de las otras pterinas, explicaría la menor reactividad con el oxígeno singlete.

$$R1-CH_{2}-NH-R2 + 10_{2} \longrightarrow R1-CH_{2}-N_{H}^{1+}-R2 \longrightarrow H_{2}O_{2} + R1-CH_{2}-N-R2$$

$$R1-CH_{2}-NH-R2 + H_{2}O \longrightarrow R1-CH + H_{2}N-R2$$

Figura 11.3: Mecanismo propuesto para la fotooxidación del ácido fólico. (R1 representa la porción pterínica y R2 el residuo de ácido *p*-aminobenzoilglutámico de la molécula de ácido fólico)

### Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete por pterinas.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete  $(\Phi_{\Delta})$  de los seis componentes mencionados en la sección anterior en soluciones equilibradas con aire preparadas en D<sub>2</sub>O, monitoreando la emisión de luz infrarroja del oxígeno singlete. Las pterinas se excitaron con luz de 367 nm.

Como se mostró en el *Capítulo 9* todas las pterinas estudiadas, excepto el ácido fólico, tienen rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) relativamente altos. Por ello es necesario investigar posibles colas de emisión fluorescente de las pterinas en el infrarrojo cercano. Debido a esto se realizaron experimentos, a modo de controles, en soluciones saturadas en argón. En estas condiciones, como no hay oxígeno en el medio, si se detectara emisión de luz infrarroja, esta no provendría del oxígeno singlete sino de la sustancia en estudio. Los controles se realizaron en medio ácido (pD=5.5) y medio alcalino (pD=10.0). No se detectó luminiscencia a 1270 nm bajo esas condiciones para ninguno de los compuestos estudiados.

Las determinaciones de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete  $(\Phi_{\Delta})$  se realizaron para las formas ácidas (pD=5.0-6.0) y para las formas alcalinas (pD=10-11) de los seis compuestos pterínicos estudiados. Además se realizaron algunas determinaciones a valores de pD intermedios y en soluciones fuertemente

alcalinas (pD>12). Como sensibilizadores de referencia se utilizó 1H-fenalen-1-ona ( $\lambda_{exc} = 367 \text{ nm}$ ) y rosa de bengala ( $\lambda_{exc} = 547 \text{ nm}$ ) para los experimentos en medio ácido y alcalino, respectivamente.

Se detectó significativa emisión de oxígeno singlete para cada pterina, tanto en medio ácido como alcalino, excepto para el ácido fólico con el cual se observa una muy pequeña emisión del oxígeno singlete en medio ácido, y es apenas detectada en medio alcalino. Los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete de las seis pterinas en medio alcalino se calcularon con la siguiente ecuación, deducida en el *Capítulo* 7:

$$\frac{S_e^{\rm S}}{S_e^{\rm R}} = \frac{P_0^{\rm S}}{P_0^{\rm R}} \frac{\Phi_{\Delta}}{\Phi_{\Delta}^{\rm R}} \frac{k_{\rm d}}{k_{\rm d} + k_{\rm T}^{\rm Sens} \left[\text{Sens}\right]} = \frac{P_0^{\rm S} \Phi_{\Delta}^{\rm app}}{P_0^{\rm R} \Phi_{\Delta}^{\rm R}}$$

Como se explicó en dicho Capítulo para el cálculo de lo valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete debe conocerse la constante de *quenching* del oxígeno singlete  $(k_T^{Sens})$  del sensibilizador utilizado (Tabla 11.1). Bajo las condiciones aquí utilizadas para la determinación de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en medio alcalino,  $k_d$  resulta mucho nayor que el producto  $k_T^{Sens}$ [Sens] para todos los compuestos  $(k_d/(k_T^{Sens}[Sens]))$  35), excepto para ácido fólico  $(k_d/(k_T^{Sens}[Sens]))$  approx. 5). De esta manera, se pudieron calcular los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete para las formas alcalinas de las seis pterinas. Estos resultados se exponen en la Tabla 11.2.  $k_T^{Sens}$  no fue medida en medio ácido, por ello los valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete aparentes ( $\Phi_{\Delta}^{app}$ ). Sin embargo, se puede asumir que los valores de  $k_T^{Sens}$  no cambian drásticamente con el pH, o pueden ser menores como se observa para otros compuestos [García, 1994; Luiz *et al.*, 1995]. Por ello puede considerarse a los  $\Phi_{\Delta}^{app}$  como valores de  $\Phi_{\Delta}$  reales.

~	арр		
Compuesto	pD=5.5	pD=10.5	pD=12.6
pterina	0.18±0.02	0.30±0.02	0.08 <u>+</u> 0.02
6-carboxipterina	0.27±0.03	0.37±0.02	0.09 <u>+</u> 0.02
6-formilpterina	0.45 <u>+</u> 0.05	0.47±0.2	0.26 <u>+</u> 0.02
ácido fólico	≤0.02	≤0.02	< 0.02
biopterina	0.34 <u>+</u> 0.01	0.40 <u>+</u> 0.03	0.08 <u>+</u> 0.02
neopterina	0.23 <u>+</u> 0.01	0.34 <u>+</u> 0.04	0.08 <u>+</u> 0.02

Tabla 11.2: Rendimientos cuánticos de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a diferentes pH.

Una de las observaciones más notables que surge de analizar la Tabla 11.2 se refiere a la gran diferencia en los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete del ácido fólico y el resto de las pterinas. Similarmente se encontró la misma diferencia al analizar el conjunto de rendimientos cuánticos de fluorescencia en el *Capítulo 9*: el ácido fólico presenta valores de rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menores que el resto de los compuestos estudiados. En dicho Capítulo se mencionaron varias hipótesis que podían justificar tales diferencias. Una de ellas planteaba un más eficiente cruzamiento intersistemas para el ácido fólico respecto de las otras pterinas. Si este fuera el caso, se debería esperar un mayor rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete debido a una mayor proporción de estados tripletes, excepto que dichos estados tripletes no puedan transferir su energía al oxígeno por razones energéticas. La segunda hipótesis planteada en el *Capítulo 9* parece tener mayor sentido considerando los resultados que se presentan en este Capítulo: si el estado singlete excitado se desactiva rápidamente al estado singlete basal por una vía

no radiativa tanto el rendimiento cuántico de fluorescencia como el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete deberían ser muy bajos.

Asumiendo esta hipótesis, la pregunta que surge inmediatamente se refiere a por qué el ácido fólico presenta tal vía de desactivación no radiativa y el resto de las pterinas no. Puede arriesgarse una explicación para esta cuestión comparando la estructura molecular del ácido fólico con la de los demás compuestos estudiados. El sustituyente de la posición 6 del ácido fólico es mucho más grande que los demás y presenta muchas posibilidades de movimiento. Esta característica podría introducir a los estados electrónicos gran cantidad de estados vibrorrotacionales, lo cual podría favorecer la desactivación por procesos no radiativos.

Puede observarse en la Tabla 11.2 que la capacidad de producción oxígeno singlete de cada pterina tiene diferencias con el pD. Las formas alcalinas tienen mayores rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete que las correspondientes formas ácidas, excepto para el ácido fólico que posee valores tan bajos que resultan imposibles de comparar. En realidad, dentro del error experimental, la 6 formilpterina posee valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete equivalentes, para ambas formas ácido-base. Para los cuatro compuestos restantes es interesante analizar este punto teniendo en cuenta los resultados de fluorescencia presentados en el Capítulo 9. En dicho Capítulo se mostró que los valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia de las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas, mientras que las constantes de velocidad intrínseca  $(k_{\rm F}^{0})$  son equivalentes, considerando el error experimental. Se sugirió, entonces, que en las formas alcalinas debe ser más eficientes la desactivación de los estados excitados singletes  $(S_1)$  por otra u otras vías diferentes a la emisión fluorescente. El análisis de los valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete obtenidos permite sugerir que en las formas alcalinas el cruzamiento intersistemas podría ser mayor que en las ácidas, justificando de esta forma, mayores rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete en las formas alcalinas y mayores rendimientos cuánticos de fluorescencia en las formas ácidas.

Se investigó la producción de oxígeno singlete en soluciones fuertemente alcalinas. Para ello se determinaron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete de los seis compuestos estudiados a un valor de pD igual a 12.6 en soluciones aireadas. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 11.2. Puede apreciarse claramente que los valores obtenidos en estas condiciones son notablemente menores que los obtenidos a pD = 10.5. Una vez más resulta interesante relacionar estos resultados con el estudio de la fluorescencia de las pterinas. En el *Capítulo 9* se mostró que a pH superiores a 11, la fluorescencia de las pterinas por excitación a 350 nm se desactiva muy eficientemente por iones hidroxilo (HO<sup>-</sup>) y que este *quenching* es un proceso dinámico. Puede deducirse, entonces, que la desactivación del estado excitado singlete (S<sub>1</sub>) por hidroxilo reduce la eficiencia del cruzamiento intersistemas ( $\Phi_{ISC}$ ) y, consecuentemente, el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.

Con el fin de evaluar el comportamiento global del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete con el pD, para algunos compuestos se realizaron más determinaciones a diferentes valores de pD. La Figura 11.4 muestra la variación de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete para pterina y 6-carboxipterina como función del pD en el rango 4 – 13. Para ambos compuestos el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete muestra una pequeña variación dentro del error experimental en el rango 4 a 6.5 y 9 a 11, donde una sóla forma ácido base está presente. Entre estas zonas aparece un rango de pD en el cual se observa una fuerte variación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete ambas formas ácido-base. A valores de pD mayores de 11 se observa un rápido descenso del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete al aumentar el pD.

Se realizaron también algunas determinaciones de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en soluciones saturadas con oxígeno. Para ello se burbujearon con oxígeno las soluciones a analizar durante 15 minutos, previamente a las medidas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.3.



Figura 11.4: Variación de los rendimientos cuánticos de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( ) como función del pD; a) pterina b) 6-carboxypterina ( <sub>exc</sub> =367 nm).

Comparando los dos conjuntos de datos, puede apreciarse que el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete, en las condiciones experimentales empleadas, es independiente de la concentración de oxígeno para todos los casos analizados. Esto sugiere que los estados excitados tripletes son desactivados completamente por el oxígeno, aún a la concentración correspondiente a soluciones aireadas. Por consiguiente podría considerarse que los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete obtenidos son una buena aproximación a los valores correspondientes a los rendimientos cuánticos de cruzamiento intersistemas ( $\Phi_{ISC}$ ).

	(pD = 5.5)	(pD =10.5)
pterina	0.18±0.02	0.28±0.02
6-formilpterina	0.52 <u>+</u> 0.02	0.44 <u>+</u> 0.02
biopterina	0.33±0.02	
neopterina	0.21 <u>+</u> 0.02	

Tabla 11.3: Rendimientos cuánticos de producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en soluciones saturadas con oxígeno.

## Capítulo 12

## PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE LAS PTERINAS SOBRE NUCLEÓTIDOS

Como se describió anteriormente en el *Capítulo 3*, muchas veces las moléculas reaccionan en presencia de luz de longitudes de onda que no es absorbida por ellas. No obstante puede ocurrir una reacción fotoquímica si está presente una especie capaz de absorber dicha luz, y transferir la energía a una molécula potencialmente reactiva. Este proceso se llama fotosensibilización. En el mencionado capítulo se expusieron los diferentes mecanismos involucrados en algunos procesos de fotosensibilización y, en particular, se describieron los mecanismos de las oxidaciones fotosensibilizadas. Asimismo se mencionó la importancia de procesos fotosensibilizados que involucran biomoléculas y, especialmente, aquéllos en los cuales el ácido desoxirribonucleico y sus componentes sufren distintos tipos de alteraciones.

Con el objeto de investigar la participación de pterinas en este tipo de procesos, se encararon varios estudios. En el presente capítulo se muestran resultados de un estudio realizado sobre tres nucleótidos, utilizando pterina como sensibilizador.

## Características espectroscópicas de los nucleótidos

Los nucleótidos no absorben luz de 350 nm pero son susceptibles de participar en reacciones fotosensibilizadas al ser expuestos a luz de dicha longitud de onda en presencia de algunas moléculas que sí la absorben. Todos los nucleótidos utilizados presentan absorción en la zona UV a longitudes de onda menores de 300 nm. En la Figura 12.1. se muestran los espectros de los tres nucleótidos que se emplearon en los experimentos descriptos en este capítulo: 2'desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP), 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP).



Figura 12.1: Espectros de absorción normalizados de soluciones de dGMP, dAMP y dCMP.

Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas. Estudios espectrales.

Se realizaron experimentos de irradiación continua (luz de 350 nm) sobre soluciones de nucleótidos y pterina (pH = 6.0). Se llevaron a cabo experimentos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. También se realizaron estudios en presencia de azida sódica (NaN<sub>3</sub>), un poderoso agente secuestrador de oxígeno singlete. Cada nucleótido es analizado por separado, debido a que los resultados son diferentes para cada uno de ellos.

*2'- desoxiguanosina -5' -monofosfato*: En las Figuras 12.2 y 12.3 se muestran los cambios espectrales que ocurren en una solución acuosa aireada de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (500  $\mu$ M) y pterina (50  $\mu$ M) a pH 6.0, al ser irradiada con luz UV-A ( $\lambda$  = 350 nm).

Puede observarse un claro aumento de la absorbancia entre 216 y 240 nm, con un máximo en 224 nm, y entre 290 y 400 nm, con un máximo en 305nm. Esto se ve más claramente en los espectros diferencia presentados en la figura 12.3. También se observan 3 puntos isosbésticos a 214, 242 y 290 nm, que se mantienen durante los 30 minutos que se irradia la solución, sugiriendo que existe un único proceso en el período de tiempo analizado.

Por otro lado, con el objetivo de investigar si existe reacción térmica entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, se realizaron controles sobre mezclas de soluciones de ambos compuestos no irradiadas: se mezclaron soluciones de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, y se tomaron espectros de absorción a distintos tiempos luego de realizar la mezcla. En estos experimentos no se observaron cambios espectrales. Además se comparó el espectro de la solución mezcla con la suma de los espectros de ambas soluciones por separado (considerando el efecto de la dilución). Los resultados obtenidos con estos experimentos permiten descartar reacciones térmicas entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina en solución acuosa.

Paralelamente se irradió, en idénticas condiciones, una solución de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato en ausencia de pterina, a modo de control. No se observaron cambios espectrales de dicha solución. También se realizaron controles irradiando soluciones de pterina y no se observaron cambios en los mismos tiempos de la irradiación. Teniendo en cuenta los resultados de estos experimentos de control puede inferirse que tanto 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato como pterina son fotoestables en las condiciones de irradiación empleadas. Si embargo, cuando estos compuestos son irradiados conjuntamente se produce un proceso fotoquímico que se evidencia por los cambios espectrales.



Figura 12.2: (a) Evolución de los espectros de absorción de una solución de – pterina (5 x 10<sup>-5</sup>M) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (5 x 10<sup>4</sup>M) a pH 6.0 durante la irradiación a 350 nm (se restó el espectro de la pterina). (b) Variación de la absorbancia de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato a 224 nm con el tiempo de irradiación.

Con el objeto de investigar el efecto del pH sobre el proceso en estudio, se realizó un conjunto de experimentos en condiciones similares al descripto en los párrafos anteriores, pero a pH = 10.5. Los resultados en esta condición de pH son muy similares a los obtenidos a pH 6.0: no existe reacción térmica entre 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y pterina, ambos compuestos son fotoestables

cuando se encuentran separados y se observan significativos cambios espectrales cuando se irradian una mezcla de ambos, revelando un proceso fotoquímico.



Figura 12.3: Espectros diferencia correspondientes a la irradiación de dGMP en presencia de pterina con luz de 350 nm de la Figura 12.2.

2'- desoxiadenosina -5' -monofosfato: Se realizó un estudio análogo para 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato. Los resultados de estos experimentos llevados a cabo en medio ácido (pH = 6.0) permiten inferir conclusiones similares a las propuestas para 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Es decir, a pH 6.0, el nucleótido 2'desoxiadenosina-5'-monofosfato no reacciona térmicamente con pterina y no sufre alteraciones al ser irradiado aisladamente a 350 nm. Por el contrario, existe un proceso fotoquímico cuando ambos compuestos son irradiados en forma conjunta. Sin embargo, los cambios espectrales observados en este caso son mucho más lentos que los observados en los experimentos con el nucleótido 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato.

Por otro lado, los experimentos llevados a cabo en medio alcalino muestran resultados completamente diferentes. En este caso, cuando se irradia una mezcla de 2'desoxiadenosina-5'-monofosfato y pterina a pH 10.7, no se observan cambios espectrales, aún luego de dos horas de irradiación. Estos experimento fueron realizados en las mismas condiciones experimentales (concentración irradiación, etc) que los correspondientes al estudio con 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Los controles, por su parte, mostraron resultados equivalentes a los controles para los estudios anteriores: existe reacción térmica entre pterina no у 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato y el nucleótido no sufre alteraciones cuando se irradia a 350 nm en forma aislada.

2'- desoxicitosina -5'-monofosfato: Se realizaron los mismos estudios que a los dos nucleótidos anteriores. Tanto en medio ácido como en medio alcalino se observaron resultados análogos: al irradiar 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato no se observan cambios espectrales, tanto en presencia como ausencia de pterina.

A fin de evaluar el papel del oxígeno en los procesos fotoquímicos detectados, se efectuaron experimentos en soluciones burbujeadas con nitrógeno. Estos experimentos, realizados en anaerobiosis, se llevaron a cabo en idénticas condiciones de pH, concentración e irradiación que aquellos descriptos anteriormente. En los tres casos analizados (2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, pH 6.0 y pH 10.5, y 2' desoxiadenosina-5'-monofosfato, pH 6.0) se observó el mismo resultado: no se observaron cambios espectrales.

Vale la pena, en este punto, analizar en conjunto los resultados experimentales expuestos hasta el momento en este Capítulo. El nucleótido 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, que contiene en su estructura una base púrica, parece ser el nucleótido más sensible a alteraciones fotoinducidas por la pterina, y este efecto se observa tanto para la forma ácida como para la alcalina de la pterina. El nucleótido 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, que también posee una base púrica, es menos sensible en medio ácido y es resistente a este tipo de procesos en medio alcalino. El nucleótido 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato, el único analizado que posee una base pirimídica, es fotoestable en presencia de pterina en ambas condiciones de pH. Debido a que los procesos detectados no ocurren en ausencia de oxígeno, puede sugerirse que se trata de oxidaciones fotosensibilizadas.

Estas diferencias en el comportamiento frente a la irradiación continua a 350 nm podrían explicarse con los potenciales de reducción de las diferentes bases. Las purinas tienen menor potencial de reducción que las pirimidinas. Entre las purinas la guanina es la que posee menor potencial de reducción, siendo entonces la más reactiva [Saito et al., 1995]. Así, el orden en la reactividad encontrado en los nucleótidos analizados coincide con el orden creciente de los potenciales de oxidación.

Para evaluar el papel del oxígeno singlete en las oxidaciones fotosensibilizadas que se acaban de describir se realizaron experimentos en presencia de azida sódica (Na N<sub>3</sub>). Este compuesto es un potente secuestrador de oxígeno singlete, debido a que su constante de velocidad de *quenching* total de oxígeno singlete  $(k_T)$  es muy elevada. En estos experimentos se irradiaron mezclas de pterina 50  $\mu$ M, 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato 500  $\mu$ M y azida sódica 100 mM. Se tomaron los espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación. En cada caso se realizó un control del experimento en las mismas condiciones pero en ausencia de azida. Para los tres casos analizados (soluciones ácidas y alcalinas de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y soluciones ácidas de 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato) no se observaron cambios espectrales apreciables en las irradiaciones realizadas en presencia de azida sódica. Es decir, la presencia de un secuestrador de oxígeno singlete inhibe las fotoxidaciones detectadas en los experimentos anteriores. Si bien no se pueden

descartar otros mecanismos de reacción, estos experimentos sugieren fuertemente que en los procesos observados el oxígeno singlete tiene un papel fundamental como especie reactiva.

# Irradiación continua de nucleótidos en presencia de pterinas. Análisis cromatográficos.

Se analizaron mediante cromatografías soluciones irradiadas de pterina y 2'desoxiguanosina-5'-monofosfato. Estos dos compuestos pueden ser separados por TLC. En las placas cromatográficas de celulosa con indicador fluorescente descriptas en el *Capítulo 8*, la pterina aparece como una mancha fluorescente cuando se expone la placa a luz de 350 nm. La 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato no se observa con luz de 350 nm, pero aparece como una mancha opaca sobre fondo fluorescente cuando la placa se ilumina con luz de 254 nm.

Se preparó una solución de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato ( $0.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) y de pterina ( $0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) a pH 6.0. Se irradiaron alícuotas de dicha solución a distintos tiempos. En la misma placa se siembran soluciones irradiadas a tiempos diferentes y soluciones de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato por separado según el esquema de la Figura 12.4, donde cada número corresponde a una solución diferente: (1) pterina ( $0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), (2) 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato ( $0.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), (3), (4) y (5) soluciones de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato ( $0.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), y pterina ( $0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) irradiadas durante 0, 1 y 30 minutos respectivamente. Con fines comparativos se sembró la misma cantidad de gotas en todas las calles. Como fase móvil se utilizó NH<sub>4</sub>Cl al 0.3 % p/v.

Luego de realizar la corrida se observan tres manchas diferentes representadas en el esquema de la Figura 12.4:

-mancha **A** (Rf = 0.75), que corresponde a 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato; -mancha **B** (Rf = 0.52) que corresponde a pterina; -mancha  $\mathbf{C}$  (Rf = 0) que corresponde a un producto que aparece solamente después de la irradiación.

Se observo que la mancha B, correspondiente a pterina, es igual en las calles correspondientes a las mezclas irradiadas e igual a la de la solución testigo. Estos resultados sugieren que la pterina no se modifica durante la irradiación y, por ende, actúa como sensibilizador. mancha A, correspondiente La а 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato, por el contrario, muestra una progresiva disminución en su intensidad al aumentar el tiempo de irradiación, indicando que el nucleótido sufre una transformación química. Por último, la mancha C, que no se detecta en la mezcla no irradiada, aparece luego de la irradiación y se intensifica con el tiempo. El compuesto de esta mancha es, evidentemente, un producto que sólo se genera al irradiar una mezcla 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato y de pterina.



Figura 12.4: Esquema de la corrida cromatográfica de una irradiación continua de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. (Las calles se explican en el texto).

#### Efecto del oxígeno singlete.

Se realizaron experimentos para investigar si el oxígeno singlete generado por pterina sufre *quenching* por los nucleótidos estudiados. Para ello se utilizó el equipo descripto en el *Capítulo 7* y la técnica allí explicada para determinar *quenching* total de oxígeno singlete. Estos experimentos se realizaron irradiando mezclas de pterina (1.7 x 10<sup>-4</sup> M) y un nucleótido en D<sub>2</sub>O a 367 nm.

Se prepararon soluciones de pterina con y sin nucleótidos. Puede observarse, en la Figura 12.5, que la concentración estacionaria de oxígeno singlete  $\pounds$  vuelve despreciable en la solución que contiene 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (6 x 10<sup>-4</sup> M). En la Figura 12.6 se observa que la concentración estacionaria de oxígeno singlete disminuye, sólo parcialmente, en la solución que contienen 2'-desoxiadenosina-5'monofosfato en una concentración mayor (2.4 x 10<sup>-3</sup> M). Para este nucleótido se eligió una concentración mayor debido a que se observaron pequeños cambios en la señal, pero dentro del error experimental. Al concentrar la muestra en el nucleótido la señal disminuye en forma apreciable. No se observan cambios en la señal de la solución que contiene 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (6 x 10<sup>-4</sup> M).



Figura 12.5: Señales de oxígeno singlete para soluciones de a) rosa de bengala,
b) pterina y c) pterina y dGMP (6 x 10<sup>-4</sup> M).



Figura 12.6: Señales de oxígeno singlete para soluciones de a) pterina, b) pterina y dCMP (6 x  $10^{-4}$  M) y c) pterina y dAMP (2.5 x  $10^{-3}$  M).

Irradiación de nucleótidos en presencia de pterina. Medida electroquímica de oxíge no.

Los resultados mostrados hasta el momento sugieren que los procesos estudiados son oxidaciones fotosensibilizadas, en las cuales interviene el oxígeno singlete generado a partir del oxígeno presente en las soluciones. Si esta hipótesis es verdadera, à concentración del oxígeno disuelto en la mezcla debería disminuir con el tiempo de irradiación. Para corroborar esto se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones conteniendo pterina y un nucleótido (a un determinado pH) y se determinó en las mismas la concentración de oxígeno, empleando para ello un electrodo sensible a dicho gas (ver *Capítulo 8*). A modo de control y con el objeto de evaluar si la irradiación de pterina en solución acuosa genera cambio en la concentración de

oxígeno, se efectuaron experimentos similares con soluciones de pterina en ausencia de nucleótidos.

Como puede apreciarse en la Figura 12.7 la irradiación de una solución conteniendo pterina (92  $\mu$ M) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (380  $\mu$ M) a pH 5,5 provoca una disminución en la concentración de oxígeno de casi un orden de magnitud en una hora. En la misma figura se muestra, con fines comparativos, la evolución en la concentración de oxígeno en función del tiempo de irradiación obtenida en un experimento control, realizado con una solución de pterina de la misma concentración (92  $\mu$ M) y el mismo pH, y con la misma geometría de irradiación. Puede observarse que en este experimento el consumo de oxígeno es prácticamente despreciable durante más de una hora, descartando que procesos que le ocurren a la pterina en ausencia de nucleótidos puedan contribuir al descenso de la concentración de oxígeno en los experimentos realizados irradiando las mezclas de pterina y nucleótidos.



Figura 12.7. Cambios en la concentración de O<sub>2</sub> disuelto durante la irradiación de una solución de pterina (92 M) y dGMP (380 M) a pH 5,5 y una solución control de pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Resultados similares se encontraron para experimentos del mismo tipo (irradiación de mezclas de pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato), pero realizados en medio alcalino. En la Figura 12.8 se muestra la evolución de la concentración de oxígeno en un experimento realizado irradiando una solución con pterina (94  $\mu$ M) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (375  $\mu$ M) a pH 10,4. Considerando que este experimento se efectuó en condiciones prácticamente iguales que las del experimento expuesto en el párrafo anterior, pueden compararse las dos velocidades de consumo de oxígeno, siendo las mismas muy parecidas entre sí. En la Figura 12.8 puede apreciarse además el correspondiente control realizado en ausencia de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato.


Figura 12.8. Evolución de la concentración de O<sub>2</sub> durante la irradiación de una solución conteniendo pterina (94 M) y dGMP (375 M) a pH 10,4 y una solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Por último, se llevaron a cabo experimentos similares con 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato. En medio ácido se observó un consumo de oxígeno apenas superior al mostrado por el correspondiente blanco. En medio alcalino, por su parte, las diferencias en las velocidades de consumo de oxígeno, prácticamente caen dentro del error experimental del método. En la figura 12.9 se muestran las curvas experimentales correspondientes a estos experimentos. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos de irradiación continua expuestos anteriormente.



Figura 12.9: Evolución de la concentración de O<sub>2</sub> durante la irradiación de una solución conteniendo: a) pterina (94 M) y dAMP (380 M) a pH 5,5 y una solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH; y b) pterina (92 M) y dAMP (388 M) a pH 10.4 y una

solución control conteniendo pterina en las mismas condiciones de concentración y pH.

Puede inferirse de los experimentos analizados en esta sección la misma conclusión obtenida del estudio espectrofotométrico: el proceso que ocurre al irradiar una solución ligeramente ácida conteniendo pterina y 2'-desoxiadenosina-5'- monofosfato es más lento que aquél que ocurre en las soluciones conteniendo pterina y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Asimismo el proceso que ocurre en medio alcalino al irradiar una mezcla de pterina y 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato es despreciable.

## Capítulo 13

# FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Moléculas pequeñas, aromáticas y planas pueden intercalarse entre bases adyacentes en la hélice del ácido desoxirribonucleico pudiendo o no provocar distorsiones en su estructura. La intercalación no es indispensable para que se produzca el daño fotoinducido, pero moléculas planas pueden ser capaces de participar en procesos de fotosensibilización del ácido desoxirribonucleico [Armitage, 1998]. Las pterinas son biomoléculas aromáticas y planas, que podrían intercalarse en la doble hélice del ácido desoxirribonucleico. Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto de las pterinas como fotosensibilizadores de material genético, así como evaluar el papel del oxígeno singlete en este proceso, pues la información existente era indirecta y escasa desde el punto de vista fotofísico.

En el *Capítulo 4* se expusieron las razones por las cuales se eligió el plásmido pUC18 como molécula blanco para este estudio. Por otro lado, se eligió pterina como sensibilizador por varias razones. Por un lado, este compuesto es mucho menos fotosensible que otros compuestos de la familia [Thomas, 2001] y, por ende, las reacciones de degradación fotoquímica de este compuesto no interferirán en el análisis de los resultados de los procesos de fotosensibilización que se quiere estudiar. Por otro lado, la ausencia de sustituyentes en la molécula de pterina permite evaluar al doble anillo pterínico como sensibilizador, evitando el efecto de los sustituyentes.

#### **Estudios preliminares.**

Se realizó un conjunto de experimentos sencillos con el objeto de detectar un posible efecto de fotosensibilización del ácido desoxirribonucleico plasmídico por pterina. Este estudio preliminar consistió en irradiar soluciones de ácido desoxirribonucleico y soluciones de pterina por separado y, finalmente, una mezcla de ambas.

Como se mencionó anteriormente, el ácido desoxirribonucleico no absorbe luz UV-A y, por consiguiente, este tipo de luz no debiera provocar ningún efecto directo sobre el plásmido pUC18. Los experimentos control, realizados en este sentido, revelan que una solución del plásmido (3.8 x 10<sup>-5</sup> M bp) irradiada en forma continua durante 2 horas no presenta cambios espectrales ni electroforéticos respecto de la misma solución no irradiada.

Por otro lado, los experimentos control realizados sobre soluciones de pterina mostraron que este compuesto tampoco sufre alteraciones químicas al ser irradiado en las condiciones experimentales que luego se utilizaron en los estudios de fotosensibilización. En efecto, se analizó una solución de pterina (1 x  $10^4$  M, pH = 6.5) irradiada durante 2 horas mediante espectrofotometría y cromatografía (TLC). No se detectaron cambios espectrales ni productos de fotólisis en las corridas cromatográficas que sugieran cambios químicos significativos en la solución de pterina irradiada.

Sin embargo, cuando se irradió una solución acuosa conteniendo ambos compuestos se observaron cambios espectrales significativos en función del tiempo de irradiación. Estos cambios, inducidos por la luz, evidencian una variación en la composición química del sistema y ocurren únicamente cuando están presentes ambas sustancias.

Por último, se realizaron controles tendientes a descartar una reacción térmica entre el ácido desoxirribonucleico y pterina. Para ello, se mezclaron soluciones de ambos compuestos y se mantuvieron en la oscuridad durante distintos períodos de tiempo. Posteriormente, estas soluciones fueron analizadas por espectrofotometría y electroforesis. Los resultados de estos controles sugieren que no existen reacciones químicas térmicas entre pterina y la macromolécula estudiada.

En la siguiente sección se analizará detalladamente la evolución de los espectros de absorción en experimentos de irradiación continua. Posteriormente, se expondrá el análisis de las soluciones irradiadas empleando técnicas electroforéticas, a partir de las cuales puede obtenerse información de los cambios estructurales sufrid os por el ácido desoxirribonucleico.

#### Análisis espectrofotométrico.

Se realizaron experimentos de irradiación continua para estudiar las variaciones espectrales que se producen como consecuencia del efecto de la pterina excitada sobre el ácido desoxirrib onucleico. En todos estos estudios de fotosensibilización se procedió sistemáticamente de la misma manera. Se prepararon soluciones madres de pterina y ácido desoxirribonucleico. A partir de ellas se prepararon las soluciones control y la mezcla. Cada solución madre diluida a la mitad con agua se utilizó a modo de control. La solución restante es una mezcla en partes iguales de ambas soluciones madres. Cada solución se sometió a irradiación con luz UV-A de 350 nm en idénticas condiciones experimentales (geometría de irradiación, celda, temperatura, pH, etc) durante un período total de aproximadamente dos horas. Se registró el espectro de absorción de las soluciones antes de la irradiación y posteriormente se tomaron los espectros de absorción a distintos períodos de irradiación. Todos los experimentos que se presentarán en esta sección se realizaron en presencia de oxígeno.

Como se mencionó en la sección anterior, las soluciones control demostraron ser fotoquímicamente estables para el tiempo de irradiación y las condiciones experimentales empleadas. A diferencia de los controles, en iguales condiciones experimentales, se observaron importantes cambios en los espectros de absorción de soluciones conteniendo pterina y plásmido, desde los primeros minutos de irradiación. En la Figura 13.1 se muestran los resultados de un experimento realizado irradiando una solución mezcla ([ADN] =  $3.8 \times 10^{-5}$  M bp y [pterina] =  $1 \times 10^{-4}$  M, pH = 6.5).



Figura 13.1: (a) Variación del espectro de absorción de una solución de ADN (3.8 x  $10^{-5}$  M bp) y pterina (1 x  $10^{-4}$  M) a pH = 6.5 en el tiempo, al ser irradiada con luz UV de 350 nm. (b) Espectros diferencia.

Como el ácido desoxirribonucleico no absorbe a longitudes superiores a 300 nm, se puede evaluar el comportamiento de la banda de la pterina en la región comprendida entre 300 y 400 nm. Como puede observarse en la Figura 13.1, dicha banda permaneció inalterada durante todo el tiempo de irradiación. Estos resultados sugieren que la pterina no sufre alteraciones químicas significativas como consecuencia de la irradiación. Asumiendo que la pterina resulta inalterada, los cambios espectrales observados (en la región comprendida entre 215 y 300 nm) se pueden atribuir a

modificaciones en las moléculas de ácido desoxirribonucleico. En **a** Figura 13.2 se muestran los espectros de absorción registrados a distintos tiempos de irradiación a los que se les ha restado el espectro correspondiente a la pterina. De esta manera, en esta figura se muestra la evolución del espectro del plásmido durante el proceso estudiado.



Figura 13.2: Variación del espectro de absorción del ADN en el tiempo, al ser irradiado con luz UV de 350 nm en presencia de pterina

En otra serie de experimentos realizados a concentración de ácido desoxirribonucleico constante (5 x  $10^{-5}$  M bp) se analizó la influencia de la concentración de pterina sobre los cambios espectrales observados. En todos los casos se observó, cualitativamente, el mismo tipo de cambio espectral. Es decir, los espectros diferencia normalizados obtenidos en experimentos realizados a distintas concentraciones de pterina son similares. Este hecho sugiere que el proceso observado es siempre el mismo, independientemente de la concentración de pterina.

Sin embargo, la velocidad y la intensidad de los cambio espectrales muestran una fuerte dependencia con la concentración de pterina. En la Figura 13.3 se muestran las variaciones en la absorbancia del ácido desoxirribonucleico en estos experimentos. El análisis cinético de estos resultados revela que el cambio de absorbancia,  $(A_t - A_o)$ , sigue una ley de primer orden. En la Tabla 13.1 se presentan los resultados de las constantes de velocidad (*k*) y de  $(A_{\infty} - A_o)$ , ajustados con la ecuación (1):

$$(A_t - A_o) = (A_\infty - A_o).[1 - exp(-k.t)].$$
 (1)

donde  $A_0$ ,  $A_t y A_\infty$  son las absorbancias a 260 nm antes de iniciar la irradiación , al tiempo t y al tiempo infinito, respectivamente.



Figura 13.3: Variación de la absorbancia a 260 nm para soluciones ADN (5 x 10<sup>-5</sup> M bp) y distinta concentración de pterina. Las líneas corresponden a ajustes con la ecuación (1).

[Pt]/mM	(A - A <sub>0</sub> )	<i>k</i> /min
7 x 10 <sup>-4</sup> M	0.04	0.0225
4 x 10 <sup>-4</sup> M	0.06	0.0259
7 x 10 <sup>-5</sup> M	0.18	0.0269

 Tabla 13.1: Parámetros obtenidos realizando ajustes no lineales de los datos

 mostrados en la Figura13.3 con la ecuación (1).

#### Análisis electroforético.

Se realizaron experimentos de irradiación continua similares a los descriptos en la sección anterior, pero en este caso las soluciones irradiadas con luz UV-A en presencia de oxígeno se analizaron mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa descripta en el *Capítulo 8*.

En corridas electroforéticas realizadas con soluciones acuosas no irradiadas del plásmido pUC18 se observan tres formas principales del plásmido, que corresponden a una forma superenrollada (que presenta mayor movilidad), a una forma relajada o con un grado menor de superenrollamiento (de movilidad intermedia) y una forma dimérica (de menor movilidad). Esto puede observarse en la primera calle de la corrida electroforética mostrada en la Figura 13.4 (tiempo cero de irradiación). La intensidad relativa de las bandas da una idea de la proporción de cada topoisómero presente en las soluciones analizadas.

El análisis electroforético de soluciones de plásmido (3.8 x 10<sup>-5</sup> M bp) irradiado con luz UV-A en presencia de pterina (1 x 10<sup>-5</sup> M) revela importantes cambios sobres las cantidades relativas de las tres bandas. La figura 13.4 muestra una corrida electroforética en la cual fueron sembradas alícuotas tomadas a distintos tiempos de irradiación. Puede apreciarse que disminuye la intensidad de la banda de mayor movilidad electroforética, a la vez que aumenta la intensidad de la forma relajada del plásmido.



Figura 13.4: Electroforesis de soluciones de ácido desoxirribonucleico irradiadas en presencia de pterina. Los números sobre cada calle representan el tiempo de irradiación en minutos.

A partir de las variaciones en la intensidad de fluorescencia generada por cada fracción se realizó un análisis de los cambios que experimenta la concentración de cada topoisómero del plásmido como función del tiempo de irradiación. Para realizar este análisis se integraron las intensidades de cada banda presente en el gel mediante un programa de computación adecuado. A causa de la menor intercalación del bromuro de etidio en la forma superenrollada, más compacta, debe realizarse una corrección a la intensidad en esa banda por 0.8 [Bauer W, 1968]. Luego, para los distintos tiempos de irradiación, se calculó la fracción de intensidad de cada topoisómero sobre la intensidad total correspondiente a cada una de las calles. En la Figura 13.5 puede observarse la

variación de la intensidad relativa de las bandas correspondientes al plásmido relajado y superenrollado.

Las gráficas de la Figura 13.5 muestran claramente que la iluminación del plásmido con luz UV-A en presencia de pterina conduce a la conversión de la forma superenrollada en la forma relajada. Además esta conversión ocurre en un período de tiempo que coincide con el período correspondiente a los cambios espectrales mostrados en la sección anterior.



Figura 13.5: Evolución de la intensidad de fluorescencia de las bandas presentes en la corrida electroforética mostrada en la figura 13.4, con el tiempo de irradiación. Se asignó el valor 1 a la fracción de la intensidad a t=0. a) forma relajada. b) forma superenrollada.

Para que ocurra la transformación mencionada es necesario que una de las cadenas de la molécula de plásmido circular superenrollada se corte. Una vez

producida dicha ruptura, la conversión a la forma relajada ocurre espontáneamente. Por consiguiente, estos resultados sugieren que el proceso de fotosensibilización estudiado conduce a la ruptura de un enlace covalente en las cadenas de ácido desoxirribonucleico.

Además, en los tiempos más largos de irradiación, se puede observar la aparición de una nueva banda, la cual tiene una movilidad intermedia entre la forma relajada y la superenrollada. La aparición de esta nueva forma de plásmido, indica claramente que el ácido desoxirribonucleico está experimentando alteraciones importantes en su estructura. Sin embargo, por hallarse con una movilidad intermedia entre las bandas originales, no debería presentar modificaciones significativas en su peso molecular.

Si una molécula de ácido desoxirribonucleico circular sufre un corte en una de sus hebras y otro corte en la otra y las posiciones de estos cortes son lo suficientemente cercanas entre sí, la molécula puede cortarse transformándose en una molécula de plásmido lineal. Para comprobar si la nueva banda que aparece en las soluciones irradiadas corresponde a ácido desoxirribonucleico lineal se preparó un patrón del plásmido "linealizado" por medio de una enzima de restricción.

Las enzimas de restricción son un grupo de enzimas que poseen la capacidad de producir cortes en moléculas de ácido desoxirribonucleico en regiones específicas. Estas enzimas reconocen una secuencia específica sobre el ácido desoxirribonucleico de doble hélic e, y lo escinden en ese lugar. Una molécula de ácido desoxirribonucleico circular se convierte en una molécula lineal de igual peso molecular, si se la somete a la acción de una enzima de restricción que reconoce una secuencia de bases que se encuentra presente una sola vez sobre dicha molécula. Cumple con esta condición para el plásmido pUC18 la enzima RI de la bacteria *Escherichia coli (Eco*RI). Cuando el plásmido pUC18 es incubado en presencia de dicha enzima en un buffer adecuado a 37 °C, se corta sobre la siguiente secuencia de bases:



(las flechas indican los punto de corte).

En la Figura 13.6 se muestran los resultados de experimentos que sugieren fuertemente la "linealización" del ácido desoxirribonucleico plasmídico como consecuencia de la irradiación en presencia de pterina. La calle 1 corresponde a una solución de plásmido ( $3.8 \times 10^{-5} \text{ M}$  bp) y pterina ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) irradiada durante 140 minutos, mientras que la calle 4 corresponde al patrón de ácido desoxirribonucleico lineal. Puede observarse claramente que la banda del patrón presenta la misma movilidad que la banda que aparece al irradiar. Las calles 2 y 3 corresponden a controles, el primero, plásmido no irradiado sin mezclar con pterina y, el segundo, una solución no irradiada de ácido desoxirribonucleico y pterina, ambos en igual concentración que la calle 1.



Figura 13.6: Análisis electroforético del experimento que muestra la presencia de ADN lineal en soluciones irradiadas de plásmido en presencia de pterina. El detalle de cada calle se encuentra en el texto.

Los resultados presentados en esta sección, muestran que el proceso de fotosensibilización estudiado conduce, en una primera etapa, a cortes de una cadena que, a su vez, llevan a la relajación del plásmido. En una segunda etapa se producen cortes en la doble hélice generando la "linealización" del plásmido. Una hipótesis que se puede plantear para explicar el proceso total consiste en suponer que la macromolécula sufre cortes en cada hebra acumulativos y al azar. Es decir, cada molécula plasmídica se relaja luego de sufrir el primer corte y sigue acumulando cortes distribuidos al azar al aumentar el tiempo de irradiación. Como se explicó anteriormente, si dos de estos cortes se producen en diferentes cadenas y están lo suficientemente cercanos entre sí, la molécula de plásmido se transforma en una molécula lineal. Experimentalmente esto sólo podrá observarse cuando se acumulen suficientes cortes que hagan apreciable la probabilidad de que se produzea la "linealización".

#### Papel del oxíge no en el mecanismo de reacción.

Se realizaron estudios similares a los llevados a cabo en soluciones aireadas tendientes a evaluar el rol del oxígeno molecular y algunos de sus derivados (oxígeno singlete, radical hidroxilo) en el mecanismo involucrado en el daño fotoinducido observado sobre el ácido desoxirribonucleico.

Para determinar el papel de las especies reactivas del oxígeno, oxígeno singlete y radical hidroxilo, se utilizaron secuestradores o *quenchers* selectivos para cada una de ellas. Para evaluar el papel del radical hidroxilo, se realizaron experimentos en presencia de sustancias que lo capturan, como ser manitol, etanol, formato de sodio u otros. En este caso, se empleó etanol en concentración 1.7 mM [Chemg et al., 1993; Lesko et al., 1980]. Por otro lado, para evaluar el rol del oxígeno singlete se realizaron experimentos en presencia de histidina. En particular, se utilizó Lmonohidroclorohistidina en concentración 1.2 mM [Nilsson et al., 1972].

Ambos ensayos se evaluaron de la misma forma que para las soluciones aireadas: por seguimiento de los espectros de absorción y electroforesis en geles de agarosa. Los cambios fueron similares a los observados en ausencia de histidina y etanol, es decir, se observó la transformación de la forma superenrollada en la forma relajada y la aparición de la forma lineal. Además, estos cambios se produjeron en tiempos similares a los observados anteriormente. Estos resultados proveen evidencia de que el daño fotoinducido por pterina al ácido desoxirribonucleico no es consecuencia de la participación del oxígeno singlete ni del radical hidroxilo.

Por otro lado, se realizaron experimentos en presencia de diferentes concentraciones de oxígeno. Se preparó una solución conteniendo plásmido  $(3.8 \times 10^{-5} \text{ M bp})$  y pterina  $(1 \times 10^{5} \text{ M})$  a pH 6.5. Esta solución se dividió en tres alícuotas: en una primera alícuota se eliminó el oxígeno burbujeando nitrógeno (libre de oxígeno y helio) durante 15 minutos, otra se saturó con oxígeno y, la tercera se empleó directamente. En los tres casos se irradió durante 120 minutos con luz de 350 nm en las mismas condiciones experimentales. Los cambios observados, tanto en los espectros de absorción como en las corridas electroforéticas (Figura 13.7), fueron equivalentes en las tres concentraciones de oxígeno.



Figura 13.7: Solución de ADN (3.8 x  $10^5$  M bp) y pterina (1 x  $10^{-5}$  M) sin irradiar (1) e irradiadas en ausencia de O<sub>2</sub> (2), con aire (3) y atmósfera saturada con O<sub>2</sub> (4).

Estos resultados confirman que el oxígeno molecular, o especies reactivas derivadas de él, no tiene un rol principal en el daño fotoinducido del ácido

desoxirribonucleico, que ocurre al irradiar soluciones del mismo con luz UV-A en presencia de pterina.

Si bien para plantear una hipótesis sobre los mecanismos involucrados en el proceso de fotosensibilización estudiado es necesario llevar a cabo más experimentos, pueden realizarse algunas consideraciones sobre este punto. Tal como se explicó en el *Capítulo 3* el oxígeno singlete daña al ácido desoxirribonucleico a través de su reacción con la guanina y, de acuerdo a los resultados presentados en los *Capítulos 11* y *12*, la pterina genera oxígeno singlete e induce a la fotooxidación sensibilizada de la 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Debido a esto, es lógico pensar que debería existir fotosensibilización de ácido desoxirribonucleico por pterinas a través de un mecanismo mediado por oxígeno singlete. Sin embargo, de los experimentos planteados en esta Sección, puede inferirse que el oxígeno singlete no es la única especie reactiva implicada, e, incluso que el mismo no es el responsable principal de los cambios observados sobre moléculas de plásmido al ser irradiado por luz UV-A en presencia de pterina.

Es importante resaltar que el daño fotoinducido por la pterina al ácido desoxirribonucleico tiene relevancia biológica. La presencia de derivados pterínicos en los sistemas biológicos hace que este proceso fotosensibilizado pueda ocurrir en organismos vivos en zonas expuestas a la luz solar. Por otro lado, las pterinas podrían tener aplicación en técnicas biomédicas que usan la destrucción fotoinducida del ácido desoxirribonucleico con diversos fines, tales como la fototerapia de procesos neoplásicos y la esterilización de fluidos biológicos.

### **Conclusiones**

En este trabajo de tesis se estudió el comportamiento fotofísico y las propiedades fotosensibilizadoras de un grupo seis compuestos de la familia de las pterinas en solución acuosa: pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, ácido fólico, biopterina y neopterina. La información obtenida permite caracterizar distintos aspectos generales y particulares de la fotofísica de este conjunto de compuestos.

Las pterinas son una familia de compuestos orgánicos, ampliamente distribuida en la naturaleza. Todas comparten una estructura química común de doble anillo, y se diferencian entre sí por presentar distintos sustituyentes en la posición 6 del doble anillo. En soluciones acuosas todas las pterinas presentan un equilibrio ácido-base común que involucra un grupo amida (forma ácida) y un grupo fenolato (forma alcalina), con un pKa cercano a 8.

Las pterinas, sus derivados reducidos y otros compuestos relacionados cumplen importantes funciones metabólicas en los seres vivos. Además están involucrados en diversos procesos fotobiológicos, como por ejemplo en fotorrecepción y fotosensibilización. También tienen importancia en bioquímica clínica y medicina. Es evidente la relevancia que tienen los estudios básicos sobre fotofísica y fotoquímica de las pterinas. A continuación se enuncian las conclusiones generales que pueden extraerse de este trabajo de tesis:

Las pterinas poseen espectros de absorción con características propias. Todas presentan dos bandas de absorción, una menos intensa con un máximo alrededor de 350 nm y otra más intensa con un máximo alrededor de 250 nm. Los máximos de absorción presentan diferencias según el pH del medio: al pasar de la forma ácida a la alcalina, la banda más intensa se corre a longitudes de onda menores y la menos intensa a longitudes de onda mayores. Adicionalmente, las formas alcalinas tienen coeficientes de extinción mayores que las formas ácidas para ambas bandas.

Las pterinas presentan emisión fluorescente característica. Los espectros de emisión poseen una única banda (con un máximo alrededor de 450 nm), independientemente de la longitud de onda de excitación. Esto indica que, a pesar de poseer más de una banda de absorción, y, por lo tanto, más de un estado excitado, sólo uno de dichos estados es emisor. La emisión de las pterinas en solución acuosa ocurre siempre desde el estado excitado de menor energía (S<sub>1</sub>).

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) son relativamente altos para todas las pterinas (0.07 – 0.38), excepto para el ácido fólico que presenta valores extremadamente bajos ( $\Phi_F < 0.005$ ). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos muestran una fuerte dependencia con el pH y con el sustituyente de la posición 6 del doble anillo pterínico. Los valores de las formas ácidas son mayores que los correspondientes a las formas alcalinas.

Los espectros de excitación presentan dos bandas análogas a las de los espectros de absorción. Sin embargo, la relación de intensidades entre la banda de mayor energía y la de menor energía es menor que la relación equivalente en los espectros de absorción, indicando que el estado  $S_2$  se desactiva por más de un mecanismo, siendo el decaimiento a  $S_1$  sólo uno de ellos.

Los tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_{\rm F}$ ) también muestran dependencia con el pH y la naturaleza del sustituyente, siendo mayores para las formas ácidas (5.8 – 8.9 ns) que para las correspondientes formas alcalinas (2.2 – 7.6 ns). Al comparar valores de constantes de velocidad de fluorescencia intrínseca ( $k_{\rm F}^0$ ), se observa que todos son similares, indicando que la velocidad de desactivación desde el estado S<sub>1</sub> por fluorescencia es similar para todas las pterinas, y que las diferencias en los tiempos de vida de fluorescencia se encuentran en otras vías de desactivación.

La intensidad de fluorescencia de las soluciones acuosas de pterinas se ve disminuida si el pH es muy alto (pH > 11). Este fenómeno es consecuencia de un proceso de *quenching* dinámico por iones hidroxilos (OH). La intensidad de fluorescencia de soluciones que contienen la forma ácida de las pterinas también disminuye con la presencia de aniones fosfatos y acetato. Por el contrario, no se ve considerablemente afectada en soluciones alcalinas de las mismas. Del análisis de Stern-Volmer de las medidas estacionarias y resueltas en el tiempo puede deducirse que el *quenching* observado en presencia de estos dos aniones es dinámico. Este fenómeno es selectivo para ciertos iones, debido a que otros aniones estudiados (sulfato, nitrato y cloruro) no producen *quenching* de fluorescencia. El proceso de *quenching* estudiado tiene importancia analítica, ya que muchas técnicas utilizan la fluorescencia de las pterinas para su detección y cuantificación. Los iones fosfato y acetato en medio alcalino podrán usarse en dichas técnicas sin restricciones, mientras que en medio ácido deberían tener en cuenta el proceso de *quenching* y realizarse las modificaciones necesarias para evitarlo.

Todas las pterinas estudiadas en este trabajo son buenas fotosensibilizadoras de oxígenos singlete, tanto en medio ácilo como alcalino ( $\Phi_{\Delta} = 0.18 - 0.47$ ), excepto el ácido fólico que muestra una pequeña producción de oxígeno singlete en ambos medios. Los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete son significativamente mayores para las formas alcalinas. Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de las formas alcalinas disminuyen drásticamente a valores de pH mayores a 11. La desactivación de los estados singletes excitados (S<sub>1</sub>) reduce el cruzamiento intersistemas y, por ende, la generación de los estados tripletes que permiten la transferencia de energía para producir oxígeno singlete.

El ácido fólico es un compuesto que mostró propiedades diferentes al resto de las pterinas estudiadas (valores de  $\Phi_{\Delta}$  y  $\Phi_{\rm F}$  extremadamente bajos). Este comportamiento especial podría deberse a una muy eficiente desactivación no radiativa de su estado excitado singlete (S<sub>1</sub>). La existencia de un sustituyente grande (en comparación con el resto de las pterinas estudiadas) y flexible en la estructura del ácido fólico podría conferirle a la molécula los niveles de energía vibrorrotacional necesarios para que ocurra este fenómeno. La pterina posee propiedades fotosensibilizadoras sobre nucleótidos. La 2'desoxiguanosina-5'monofosfato es rápidamente oxidada cuando se irradia con luz UV-A en presencia de pterina. La 2'desoxiadenosina-5'monofosfato es oxidada mucho más lentamente, mientras que la 2'desoxicitosina-5'monofosfato no sufre alteraciones. Las oxidaciones fotosensibilizadas observadas ocurren a través de un mecanismo Tipo II en el cual el oxígeno singlete generado por la pterina ataca los nucleótidos.

La pterina es capaz de fotosensibilizar al ácido desoxirribonucleico. Las moléculas del plásmido pUC18 sufren cortes en sus cadenas cuando son irradiadas con luz UV-A en presencia de pterina. Estos cortes conducen a la transformación del topoisómero superenrollado al topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes genera, en una segunda etapa, un corte en la doble hebra con la consiguiente transformación del plásmido circular en una molécula lineal. El mecanismo principal de estos procesos no involucra al oxígeno singlete.

## Referencias

- **♦** Aaron J. J. Y Winefordner J. D., *Talanta*, **19**, 21 (1972).
- ✤ Albert A., Biochem J., 54, 646 (1953).
- Aminian-Saghafi T., Nasini G., Caronna T., Braun A. M., Oliveros E., Helv. Chem. Acta, 75, 531, (1992).
- ✤ Armitage B., Chem. Rev., 98, 1171, (1998).

Baur R., Kappel M., Mengel R. & Pfleiderer W., Chemistry and Biology of Pteridines, Edit. R. L. Kisliuk & G. M. Brown, Elsevier/North Holland, New York, 1979.

- Bauer W, Vinograd J., J Mol Biol,; 33, 141 (1968).
- Berns D. S. y Vaughn J. R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 1094.
   (1970).
- Brodhum B. y Häder D. P., Photochem. Photobiol., 52, 865 (1990).
- ✤ Braun A. M., Oliveros E., Pure Appl. Chem., 62, 1467, (1990).
- Cabrerizo F., Comunicación privada, (2002).

Candeias L. P. y Steenken S., Journal of American Society, 115, 2437, (1993)

Chahidi C., Aubailly M., Momzikoff A., BazinM. and Santus R., Photochem. Photobiol, 33, 641, (1981)

Chemg C. C., Rokita S. E. y Burrows C. J., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 32, 277, (1993).

Darmanyan A. P., Jenks W. S. y Jardon P., J. Phys. Chem. A, 102, 7420 (1998).

Eaton D. F., in Handbook of organic phtochemistry, ed. J. C. Scaiano, CRC
 Press, Boca Raton, Florida, 1989, chapter 8.

Fontaine-Aupart M., Renault E., Videlot C., Tfibel F., Pansu R. Charlier
 M y Pernot P., *Photochemistry and. Photobiology*, 70 (6), 829, (1999).

Foote C. S., *Photochem. Photobiol*, **54**, 659 (1991).

Foote C. S., Clennan E. L., "Properties and reactions of singlet dioxygen", in: C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, J. F. Liebman (Eds.), Active Oxygen in Chemistry, Chalman & Hall, Vol. 2, Chapt. 4 (1995).

✤ Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A. y Liebman J. F, "Active oxygen in chemistry", Editorial Blackie A & P (1995).

Galland P, Keiner P., Dörnemann D., Senger H., Brodhun B. y Häder D.
 P. Photochem. Photobiol., 51, 675 (1990).

García N. A., J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 22, 185, 1994.

Gilbert y Baggott, "Essentials of Molecular Photochemistry", Blackwell
 Science, (1991).

Gollnick K. y Lindner J. H. E., Tetrahedron Lett., 21, 1903, (1973).

• Gorman, A. A. y Rodgers, M. A., Singlet oxygen in CRC Handbook of Organic Photochemistry, Vol II, CRC Pres, Boca Raton, 229, (1989).

Hawkins M. E., Pfleireder W., Jungmann O. and Balis F. M., Anal. Biochem., 298, 231 (2001).

Henderson B. W. y Dougherty T. J., *Photochemistry and Photobiology*, 55, 145, (1992).

Hohl N., Galland P. y Senger H. Photochem. Photobiol., 55, 239. (1992).

✤ Hönigsmann H., Jori G. y Young A. R., The Fundamental Bases of Phototerapy, Edit. OMEF.

• Hopkins, F.G., Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, 186, 661. (1895).

Hopkins F. G., Proc. Chem. Soc., 5, 117; (1889a).

Hopkins F. G., Nature (London), 40, 335. (1889b).

Hopkins G, Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, Edit. J. E.
 Ayling et al., Plenum Press, New Nork, (1993)

Hurst J. R. y Schuster G. B., J. Am. Chem. Soc., 105, 5756, (1983).

- Ito K., Kawanishi S., Biochem., 36, 1774 (1997).
- ✤ Kahn A. U., Chem. Phys. Lett., 72, 112, (1980).
- Kelner A., Proc. Natl. Sci. U.S.A., 35, 73(1949).
- Kiewisch S. y Fukshansky L., Photochem. Photobiol., 53, 407 (1991).
- ★ Kino K. y Saito S., Journal of American Society, 120, 7373-7374 (1998).
- Klemm E. y Ninneman H; Photochem. Photobiol., 29, 629 (1979).
- Krasnovsky A. A., Jr., Biophysics, 24, 769, (1979).

 LakowiczJ. R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, 1983.

Ledbetter J. W., Pfleiderer W., Freisheim J. H., Photochem. Photobiol.,
62, 71, (1995).

 Lehninger A. L., "Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular", Ediciones Omega, Segunda Edición. (1985)

Lesko S. A., Lorentzen R. J. y Tso P. O., Biochemistry, 19, 3023, (1980).

Luiz M., Soltermann A. T., Biasutti A. y García N. A., Can. J. Chem., 74, 49, (1995).

Maier J. y Ninnemann H., Photochemistry and. Photobiology, 61, 43, (1995).

 Martinez L. A., Martinez C. G., Klopotek B. B., Lang J., Neuner A., Braun A. M. and Oliveros E., J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 58, 94 (2000).

✤ McCormack J. J. y Newman R. A., "Chromatographic studies of folic acid and related compounds" en "Modern chromatographic Analysis of vitamins", Edit. De Leenheer A. P. Lambert W. E. Y de Ruyter M. G., (1985).

Meech S. R. and Phillips D., J. Photochem., 23, 193 (1993).

Minnock A., Vernon D. I., Schofield J., Griffiths J., Parish H. J. y Brown
 S. B., J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 32, 159 (1996).

Monópoli V. D., Thomas A. H. y Capparelli A. L., Int. J. Chem. Kinet.,
32, 231 (2000).

Muller-Breitkreutz K. Mohr H. Briviba K. y Sies H., J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 30, 63 (1995).

Murasecco-Suardi P., Gassmann E., Braun A. M., Oliveros E., Helv. Chem. Acta, 70, 1760, (1987).

\* Neckers D. C., J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 47, 1,. (1989).

Neverov K. V, Mironov E. A. Lyudnikova T. A., Krasnovsky Jr A. A. Y
 Kritsky, M. S., *Biokhim*, 61, 1627 (1996).

Nichol C. A., Smith G. K. y. Duch D. S. Annu. Rev. Biochem., 54, 729, (1985).

 Nilsson R., Merkel P. B. y Kearns D. R., Photochemistry and. Photobiology, 16, 117 (1972).

 Ninneman H., "The Nitrate Reductase Sistem" en "Blue Light Effects in Biological Systems", Edit., Senger H.; Springer Verlag. (1984).

Oliveros E., Suardi-Murasecco P., Aminian-Saghafi T., Braun A. M., Helv. Chem. Acta, 74, 79, (1991).

 Pfleiderer W., Kappel M. y Baur R., Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines, Vol 3, Edit. Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York, (1984)

Pfleiderer, Liedek, Lohrmann y Rukwied, Chem. Ber., 93, 2015, (1960).

Pirie A. and Simpson D. M., Biochem. J, 40, 19 (1946).

 Rapaport S. I., "Introducción a la Hematología", Salvat, 2da edición, (1988).

Ravanat J., Douki T. y Cadet J., J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 63, 88, (2001).

Rodgers M. A., J. Am. Chem. Soc., 105, 6201, (1983).

 Rokos H., Beazley W. D. y SchallreuterK. U., Biochem. Biophys. Res. Commun., 292, 805 (2002).

Salomaa P. Schaleger L. L. y Long F. A., J. Am. Chem. Soc., 86, 1, (1964) Saito S., Takayama M., Sugiyama H. y Nakatami K., Journal of American Society, 117, 6406, (1995).

Stanier R. Y., Adelberg E. A. y Ingraham J. L., "Microbiología", Ed Reverté, (1984).

- Scaiano J. C., "Handbook of Organic Photochemistry", CRC Press (1989).
- Schallre uter K. U., Büttner G., Pittelkow M. R., Wood J. M., Swanson N. N. y Körner C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 43 (1994a).
- Schallreuter K. U., Wood J. M., Lemke K. R., Pittelkow M. R., Lindsey
   N. J., Gütlich M. y Ziegler I., Biochim. Biophys. Acta, 181, 1226, (1994b).
- Schallreuter K. U., Wood J. M., Pittelkow M. R., Gutlich M., Lemke K.

R., Rodl W., Swanson N. N., Hitzemann K. y Ziegler I., Science, 263, 1444, (1994c).

- \* Schmidt R., J. Am. Chem. Soc., 111, 6983, (1989).
- Schmidt W., Galland P., Senger H. y Furuya M., Planta, 182, 375 (1990).

Schöpf C., Reichert R. y Riefstahl K. Liebigs Ann. Chem., 548, 82, (1941).

- Scott J. M., Methods enzymologics, 66, 437, (1980).
- Siefermann-Harms, D., Fritz B y Ninnemann H. Photochem. Photbiol.,
  42, 771(1985)
- Skoog D. A. y West D. M., Análisis Instrumental, segunda edición, (1990).

 Stanier R. Y., Adelberg E. A. y. Ingraham J. L., *Microbiología*, 4<sup>ta</sup> Ed., Reverté, Barcelona, (1984).

Straight R. C. y Spikes J. D., "Singlet Q ", Vol IV, CRC Press, 85, (1985).

 Stryer L., "Biochemistry", W. H. Freeman and Company, 4ta. edición, (1995).

Suárez G., Cabrerizo F. M., Lorente C., Thomas A. H. y Capparelli A.
 L., Journal of Photochemistry and. Photobiology A: Chem., 132, 53, (2000).

Sugiyama H. y Saito I., "Journal of American Society", 118, 7063, (1996).

Thiéry-Cailly C., "C. R. Acad. Sc. Paris", Serie C, 250, 1968.

Thomas A. H, "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6carboxipterina en solución acuosa", 2001.

Thomas A. H., Féliz M. R.yCapparelli A. L., "Transition Met. Chem.", 21, 317, (1996)

Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A.
 L., "Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chem.", 135, 147 (2000).

Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., García Einschlag F. S., Martino R., Baiocchi C., Pramauro E. y Capparelli A. L., "Helvetica Chimica Acta", 85, 2300 (2002).

Tournaire C., Croux S., Maurette M.-T., Beck I., Hocquaux M., Braun
 A. M., Oliveros E., J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 19, 205 (1993).

Turro N., "Modern Molecular Photochemistry", University Science Books, (1991).

✤ Wayne C. E. y Wayne R. P., "Photochemistry", Oxford Science Publications Nro. 39, (1996).