



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

Trabajo de Tesis Doctoral

MECANISMOS DE OXIDACIONES FOTOSENSIBILIZADAS DE NUCLEÓTIDOS
PÚRICOS Y PIRIMIDÍNICOS POR PTERINAS DE INTERÉS BIOMÉDICO

LIC. SERRANO MARIANA PAULA

Director: Dr. Andrés H. Thomas
Co-director: Dra. Carolina Lorente
Diciembre 2014

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección del Dr. Andrés H. Thomas y la co-dirección de la Dra. Carolina Lorente. 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, © Diciembre 2014

A Graciela

"Frente a una sociedad dinámica en transición, no admitimos una educación que lleve al hombre a posiciones quietistas, sino aquellas que lo lleven a procurar la verdad en común,"oyendo, preguntando, investigando". Sólo creemos en una educación que haga del hombre un ser cada vez más consciente de su transitividad, críticamente, o cada vez más racional".

— Paulo Freire [1]

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas de Universidad Nacional de La Plata por la educación pública y gratuita, donde fue posible mi formación de postgrado. En particular, agradecer a cada una de las personas que con sus impuestos sostienen la universidad y, en especial, a aquellos que lucharon y que luchan por la educación pública, gratuita y de calidad.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis. Al CONICET, por el otorgamiento de la beca que me permitió dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis.

Al Dr. Andrés Thomas, director de este trabajo de tesis, por su ayuda y dedicación durante estos años. Por estar siempre disponible para resolver los problemas y discutir resultados. Y principalmente, por enseñarme el valor del trabajo en grupo. A la Dra. Carolina Lorente, co-director de este trabajo de tesis, por su acompañamiento y paciencia. Por el tiempo dedicado a mi formación.

Al Dr. Caludio Borsarelli y al Dr. Eduardo Morán por su ayuda en los experimentos y en la interpretación de los resultados de láser flash fotólisis. A todos los integrantes del Laboratorio de Cinética y Fotoquímica (LACIFO) por la ayuda brindada y los buenos momentos compartidos durante los días de trabajo en Santiago del Estero.

A la Dra. Patricia Vicendo del Laboratoire des IMRCP de la Université Paul Sabatier, por toda su ayuda durante mi estadía en Toulouse. A la Dra. Nathalie Martins-Froment, por su colaboración en los experimentos de Espectrometría de masas. A la Dra. Esther Oliveros por su ayuda en la interpretación de algunos resultados y en la discusión de los mecanismo. A Esther, André, Maite por toda la ayuda brindada durante mi estadía en Toulouse.

A las chicas de la casita, a las que estaban cuando llegué y a las que vinieron después, Laura, Paula, Mariana, Diana, Adri y Sandra. Gracias por el compañerismo, por estar siempre que las necesité y por la gran ayuda que me brindaron, siempre desinteresada. Por todos los lindos momentos que compartimos juntas que hicieron que disfrute mucho más el trabajo. Por haberme acompañado estos años en La Plata, por ser mis amigas. A todos los compañeros de trabajo del INIFTA, especialmente a la gente del primer piso y de la casita, por los lindos momentos compartidos.

Al equipo de voley de la Universidad de La Plata, que me permite practicar ese deporte que tanto me gusta y necesito. A mi amiga Marita, gracias por tu sinceridad, por tu amistad, por ser siempre incondicional.

A Fany, Eli, Nathalie y Marce mis amigas y compañeras de la facultad, por que compartimos muchas cosas juntas, en particular las ganas de cambiar las cosas. Por siempre estar presentes a pesar de la distancia.

A mi familia que siempre me apoyó y acompañó, en especial, estos años que estuve lejos de mi ciudad. Por las despedidas y las bienvenidas. Por los asados, los alfajores por todos los detalles que hicieron que no extrañe tanto mi casa. A mis hermanos, Federico y Gustavo que de forma diferente me acompañaron y me dieron su apoyo estos años. A Federico por darme las herramientas para ser un poco más libre, por su paciencia para enseñarme y su insistencia en el uso de software libre.

A mi mamá por acompañarme y apoyarme siempre. Gracias.

PREFACIO

La radiación UV es la porción más energética del espectro solar que alcanza la superficie terrestre. Este tipo de radiación y, en mucha menor proporción, la luz visible, son capaces de modificar la estructura química de ciertas macromoléculas y metabolitos presentes en los tejidos. En particular, los cambios químicos sufridos por las proteínas y por el ADN producen graves consecuencias a nivel celular. Dichos efectos van desde disfunciones en el metabolismo celular hasta la muerte, pasando por la generación de mutaciones en la secuencia de bases del ADN. La formación de mutaciones puede conducir a la proliferación sin control de la célula con la consiguiente generación de un proceso neoplásico en el tejido que la contiene.

Existen dos grupos de mecanismos mediante los cuales la radiación electromagnética modifica o daña al ADN. Los procesos directos se inician con la absorción de fotones por las bases nitrogenadas que son los cromóforos del ADN. Estos procesos ocurren normalmente con una frecuencia muy baja porque el tipo de radiación que absorben las bases nitrogenadas es filtrada en su mayor parte por la atmósfera y sólo llega a la superficie de la Tierra una porción muy pequeña. El otro grupo de procesos fotoquímicos que dañan al ADN y otras macromoléculas son indirectos. En los mismos, un segundo compuesto, denominado fotosensibilizador o simplemente sensibilizador, absorbe la radiación y genera estados electrónicamente excitados, los cuales desencadenan reacciones que involucran al ADN y otros componentes celulares. La radiación de tipo UV-A (320-400 nm) y visible no es filtrada por la atmósfera y puede, por consiguiente, ser absorbida por diversos fotosensibilizadores, por lo cual la protección de la capa de ozono no evita este tipo de reacciones.

A partir del descubrimiento, relativamente reciente, de estos procesos fotosensibilizados, se inició la búsqueda y estudio de compuestos que pudieran actuar como fotosensibilizadores. La investigación en este campo persigue varios objetivos. Por un lado, la identificación de sensibilizadores permite evitar la exposición a los mismos. Por otro lado, se pretende entender mejor los mecanismos implicados en la generación de procesos neoplásicos provocados por la radiación solar. Por último, se han desarrollado diversas aplicaciones basadas en el uso de fotosensibilizadores, como sistemas de esterilización y técnicas de terapia fotodinámica. En la actualidad se sabe que varios grupos de compuestos heterocíclicos naturales se comportan como fotosensibilizadores, entre los que se encuentran las pterinas.

Las pterinas son una amplia familia de compuestos con estructuras químicas, propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas muy variadas. En particular las pterinas oxidadas son fotosensibilizadores eficientes, capaces de actuar a través de diferentes mecanismos como son la producción de especies reactivas de oxígeno y procesos de transferencia electrónica. Se ha demostrado que pterina, el compuesto modelo no sustituido de esta

familia, es capaz de modificar a través de procesos fotosensibilizados ADN, nucleótidos, proteínas, péptidos y aminoácidos.

Las pterinas más importantes desde el punto de vista biológico son las tetrahidropterinas que no son fotoquímicamente activas, mientras que las oxidadas no están presentes en los mamíferos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se acumulan en la piel de los seres humanos que sufren de vitiligo, una enfermedad cutánea que cursa con una interrupción en la síntesis de melanina, causando manchas blancas en la piel. En esta enfermedad la protección de la piel contra la radiación UV falla debido justamente a la falta de melanina. Por lo tanto, la fotoquímica y las propiedades fotosensibilizadoras de las pterinas adquieren particular interés para la comprensión del mecanismo de esta enfermedad.

OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo de tesis es dilucidar los mecanismos implicados en la oxidación fotoinducida de los componentes del ADN por pterinas oxidadas en solución acuosa, bajo irradiación UV-A. Para ello se trabajó con derivados pterínicos presentes en piel de pacientes con vitiligo, biopterina (Bip), 6-formilpterina (Fop) y 6-carboxipterina (Cap), y con pterina (Ptr) como fotosensibilizador modelo. Como sustratos se emplearon dos nucleótidos púricos, 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP), y uno pirimidínico, 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP).

A continuación se mencionan los objetivos específicos que han dirigido el desarrollo de la tesis.

- Investigar si las pterinas que se acumulan en piel en condiciones patológicas son capaces de actuar como fotosensibilizadores endógenos, produciendo modificaciones químicas en nucleótidos púricos.
- Dilucidar un mecanismo general para los procesos fotosensibilizados de nucleótidos púricos inducidos por pterinas oxidadas en solución acuosa.
- Investigar si los nucleótidos pirimidínicos pueden sufrir reacciones fotosensibilizadas por pterinas y, en caso afirmativo, dilucidar los mecanismos involucrados.
- Identificar los productos de las reacciones de fotosensibilizadas y su distribución bajo distintas condiciones experimentales.
- Caracterizar las propiedades fotofísicas y fotosensibilizadoras de las dihidropterinas.

ESTRUCTURA Y DISEÑO DEL TRABAJO DE TESIS

El presente trabajo de Tesis doctoral se divide en tres partes principales, cada una de las cuales está subdividida en capítulos. Y dos partes más que corresponden a las conclu-

siones generales y la bibliografía. A continuación se presentará un breve resumen sobre el contenido de cada una de las partes principales.

PARTE I: INTRODUCCIÓN. En los primeros capítulos se desarrollan brevemente algunos aspectos básicos de fotoquímica, se explican los distintos mecanismos por los cuales se producen las reacciones fotosensibilizadas y se resumen los efectos nocivos de la radiación solar sobre el ADN y sus componentes. Posteriormente, se desarrolla un breve resumen de la nomenclatura básica y propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados, además de una síntesis de la participación de las pterinas en los sistemas biológicos en condiciones fisiológicas y patológicas. Para finalizar esta sección, se resume la información accesible en literatura acerca del comportamiento fotoquímico y fotofísico de las pterinas en general y de los derivados estudiados en este trabajo, en particular, enfatizando los antecedentes en procesos fotosensibilizados.

PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES. En esta parte, se detalla la metodología de trabajo y las técnicas experimentales utilizadas.

PARTE III: RESULTADOS. Corresponde a la presentación, análisis y discusión de los resultados experimentales obtenidos. Se presentan los resultados correspondientes a la caracterización fotofísica de los estados electrónicamente excitados tripletes de pterinas oxidadas en solución acuosa (Capítulo 8). Luego se presentan los estudios de fotooxidación inducidos por pterinas de interés biomédico (Bip, Fop y Cap) sobre los nucleótidos púricos, dAMP (Capítulo 9) y dGMP (Capítulo 10). En estos dos capítulos se evalúa la capacidad de los mencionados derivados pterínicos como fotosensibilizadores y se analizan los mecanismos de reacción involucrados. Investigando, en particular, procesos mediados por oxígeno singlete y de transferencia electrónica. Posteriormente, se expone un estudio cinético en busca de un modelo general para el mecanismo de fotosensibilización de dGMP inducido por pterinas oxidadas. Se identifican productos de reacción fotosensibilizada y su distribución en diferentes condiciones experimentales (Capítulo 11). Luego se aborda el estudio del proceso de degradación de dTMP fotosensibilizado por Ptr, incluyendo el análisis de productos de reacción y los mecanismos implicados en el proceso (Capítulos 12 y 13). Finalmente, se presentan experimentos de fotosensibilización utilizando un dihidroderivado como sensibilizador. Con el fin de interpretar los resultados obtenidos se complementó el estudio con la caracterización de las propiedades fotofísicas de una serie de dihidroderivados (Capítulo 14).

PUBLICACIONES

Algunos de los datos y figuras que se muestran en el presente trabajo de tesis fueron parte de las publicaciones que se listan a continuación:

Serrano, Mariana P, Vignoni, Mariana, Dántola, M Laura, Oliveros, Esther, Lorente, Carolina y Thomas, Andres H., "*Emission properties of dihydropterins in aqueous solutions*", Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP (2011), 7419–25.

Serrano, Mariana P, Lorente, Carolina, Vieyra, Faustino E Morán, Borsarelli, Claudio D y Thomas, Andrés H, "*Photosensitizing properties of biopterin and its photoproducts using 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate as an oxidizable target*", Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP (2012), 11657–65.

Serrano, Mariana P, Borsarelli, Claudio D y Thomas, Andrés H, "*Type I photosensitization of 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (5'-dAMP) by biopterin and its photoproduct formylpterin.*", Photochemistry and Photobiology (2013), 1456–1462.

ÍNDICE GENERAL

i	INTRODUCCIÓN	1
1	INTRODUCCIÓN A LA FOTOQUÍMICA Y FOTOSENSIBILIZACIÓN	3
1.1	Procesos fotofísicos	3
1.1.1	Procesos de desactivación unimolecular	3
1.1.2	Procesos de desactivación bimolecular	5
1.2	Procesos fotoquímicos	8
1.3	Fotosensibilización	9
1.3.1	Transferencia de energía	9
1.3.2	Transferencia electrónica	11
1.4	Oxidaciones fotosensibilizadas	11
1.4.1	Mecanismos Tipo I	12
1.4.2	Mecanismos Tipo II	13
2	EFEECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE EL ADN Y SUS COMPONENTES	15
2.1	Radiación solar que alcanza la superficie terrestre	15
2.2	Ácido desoxirribonucleico y sus componentes	16
2.2.1	Estructura química	17
2.2.2	Espectros de absorción	19
2.2.3	Ácido desoxirribonucleico	21
2.3	Causas y consecuencias del daño al ADN por radiación	21
2.3.1	Implicancias biológicas	21
2.3.2	Mecanismos de daño al ADN por radiación electromagnética	23
2.3.3	Daño directo al ADN	24
2.4	Daño al ADN mediante procesos fotosensibilizados	26
2.4.1	Transferencia de energía de un sensibilizador al ADN	26
2.4.2	Oxidaciones fotosensibilizadas Tipo I	27
2.4.3	Oxidaciones fotosensibilizadas Tipo II	30
3	PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DE PTERINAS	33
3.1	Estructura química	33
3.2	Propiedades ácido-base y equilibrio tautomérico	35
3.3	Espectros de absorción	36
3.4	Reactividad química de pterinas	38
3.5	Bioquímica de biopterina y sus derivados reducidos	40
3.6	Vitiligo	42
4	FOTOQUÍMICA Y PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE PTERINAS	45
4.1	Fotofísica de pterinas	45
4.1.1	Propiedades de los estados excitados singletes	45

4.1.2	Propiedades de los estados excitados tripletes	46
4.2	Reactividad fotoquímica de las pterinas aromáticas	48
4.2.1	Pterinas sin sustituyente oxidable	48
4.2.2	Biopterina y neopterina	48
4.2.3	6-Formilpterina	49
4.2.4	Reactividad fotoquímica de los derivados reducidos	50
4.3	Propiedades fotosensibilizadoras de pterinas	50
4.3.1	Fotosensibilización de bases púricas y desoxirribonucleótidos	51
4.3.2	Fotosensibilización de ADN eucariota	53
4.3.3	Fotosensibilización de ADN plasmídico	54
4.3.4	Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas.	54
4.3.5	Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas	54
ii	MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	57
5	PREPARACIÓN E IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE SOLUCIONES	59
5.1	Reactivos	59
5.2	Preparación de soluciones	59
5.2.1	Soluciones acuosas	59
5.2.2	Soluciones en D_2O	61
5.2.3	Condiciones anaeróbicas y de saturación de O_2	61
5.3	Irradiación estacionaria de las soluciones	62
5.3.1	Sistemas de irradiación	62
5.3.2	Metodología general para la toma de las muestras	64
5.4	Experimentos en condiciones especiales	64
5.4.1	En presencia de yoduro de potasio	64
5.4.2	En presencia de superóxido dismutasa	65
5.4.3	En H_2O y D_2O	65
5.5	Determinación del rendimiento cuántico	66
5.6	Actinometría	67
6	ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES IRRADIADAS	71
6.1	Espectrofotometría UV-visible	71
6.2	Cromatografía líquida con detección espectrofotométrica y fluorométrica	72
6.3	Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas	74
7	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS AVANZADAS	77
7.1	Espectroscopía de emisión	77
7.1.1	Descripción del equipo	77
7.1.2	Fluorescencia	79
7.1.3	Fosforescencia a 77 K en la región UV-visible	83
7.1.4	Oxígeno molecular singlete	84
7.2	Fotólisis de destello	87
7.2.1	Conceptos teóricos	87

7.2.2	Descripción del equipo	88
7.2.3	Decaimientos y espectros de especies transitorias	90
7.3	Resonancia paramagnética electrónica	91
iii	RESULTADOS	95
8	CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES DE PTERINAS OXIDADAS	97
8.1	Caracterización de especies transientes por fotólisis de destello láser	97
8.1.1	Espectro de absorción de transientes	97
8.1.2	Tiempo de vida de los estados excitados tripletes	98
8.1.3	Desactivación de los estados excitados tripletes por O ₂	102
8.2	Estudios de fosforescencia a 77 K	103
8.2.1	Espectros de emisión fosforescente a 77 K	105
8.2.2	Tiempo de vida de fosforescencia	107
9	FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIADENOSINA 5'-MONOFOSFATO POR BIOPTERINA Y SUS FOTOPRODUCTOS	109
9.1	Biopterina como sensibilizador de <i>dAMP</i>	110
9.1.1	Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de Bip	110
9.1.2	Controles	114
9.2	Participación de los estados excitados tripletes	114
9.2.1	Rol del O ₂	117
9.2.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio	117
9.2.3	Efecto de <i>dAMP</i> sobre la fotoquímica de Bip	119
9.2.4	Desactivación de los estados excitados tripletes	121
9.3	Fotosensibilización por transferencia electrónica	126
9.3.1	Irradiación en presencia de superóxido dismutasa	126
9.3.2	Cálculo de la variación de energía libre de Gibbs	128
9.3.3	Investigación del radical adenina	129
9.4	Mecanismo de reacción	132
10	FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIGUANOSINA 5'-MONOFOSFATO POR BIOPTERINA Y SUS FOTOPRODUCTOS	135
10.1	Biopterina como sensibilizador de <i>dGMP</i>	135
10.1.1	Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de Bip	135
10.1.2	Controles	140
10.1.3	Eficiencia de Bip y sus fotoproductos como fotosensibilizadores	140
10.2	Rol del ¹ O ₂	143
10.3	Participación de los estados excitados tripletes	146
10.3.1	Rol del O ₂	146
10.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio	148
10.3.3	Efecto de la presencia de <i>dGMP</i> en la fotoquímica de Bip	148
10.3.4	Desactivación de los estados excitados tripletes	152

10.4	Fotosensibilización por transferencia electrónica	154
10.4.1	Irradiación en presencia de superóxido dismutasa	155
10.4.2	Investigación del radical guanina	155
10.5	Mecanismo de reacción	159
11	MECANISMO GENERAL DE FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIGUANOSINA 5'-MONOFOSFATO POR PTERINAS OXIDADAS	161
11.1	Características generales de la reacción fotosensibilizada	162
11.2	Desactivación de los estados excitados tripletes	163
11.3	Investigación del radical guanina	165
11.3.1	Cinética de formación del radical guanina	165
11.3.2	Destino del radical guanina	169
11.4	Rol del 1O_2	176
11.5	Determinación de la constante de reacción química entre 3Ptr y $dGMP$	181
11.6	Análisis de las soluciones irradiadas por UPLC-MS	186
11.6.1	Investigación de los productos de reacción por UPLC-MS	186
11.6.2	Identificación de los productos por UPLC-MS/MS	194
11.6.3	Distribución de los productos de reacción	200
11.7	Mecanismo de reacción	205
12	FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXITIMIDINA 5'-MONOFOSFATO INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE OXÍGENO	209
12.1	Ptr como sensibilizador de $dTMP$	209
12.1.1	Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de Ptr	210
12.1.2	Controles	211
12.2	Interacción de los estados excitados de Ptr con $dTMP$	216
12.2.1	Desactivación del estado excitado singulete	216
12.2.2	Desactivación de los estados excitados tripletes	219
12.3	Participación de los estados excitados tripletes	220
12.3.1	Rol del O_2	220
12.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio	221
12.4	Fotosensibilización por transferencia electrónica	221
12.4.1	Factibilidad termodinámica del proceso de transferencia electrónica fotoinducido	221
12.4.2	Irradiación en presencia de superóxido dismutasa	222
12.4.3	Investigación del radical timidina	223
12.5	Investigación de los productos de reacción por UPLC-MS/MS	229
12.6	Mecanismo de reacción	236
13	FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXITIMIDINA 5'-MONOFOSFATO INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE OXÍGENO	239
13.1	Fotosensibilización de $dTMP$ en condiciones anaeróbicas	239
13.1.1	Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar $dTMP$ en ausencia de O_2	239

13.1.2	Controles	241
13.2	Participación de los estados excitados tripletes	243
13.2.1	Irradiación en presencia de yoduro de potasio	243
13.3	Análisis de los productos	243
13.3.1	Investigación mediante HPLC-FL	243
13.3.2	Estudios de emisión de fluorescencia	246
13.3.3	Investigación por UPLC-MS/MS	250
13.4	Mecanismo de reacción	252
14	PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTSENSIBILIZADORAS DE 7,8 DIHIDROPTERINAS	255
14.1	7,8-Dihidrobiopterina como sensibilizador	255
14.2	Propiedades fotofísicas de 7,8-dihidropterinas	257
14.2.1	6-Formildihidropterina y sepiapterina	259
14.2.2	Dihidrobiopterina, dihidroneopterina y 6-hidroximetildihidropterina	261
iv	CONCLUSIONES	271
v	BIBLIOGRAFÍA	279
	BIBLIOGRAFÍA	281

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de Jablonski.	4
Figura 2	Vías de desactivación química del estado excitado.	9
Figura 3	Proceso fotosensibilizado general.	10
Figura 4	Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y Tipo II.	12
Figura 5	Irradiancia solar espectral	16
Figura 6	Estructura química de un desoxirribonucleótido.	17
Figura 7	Equilibrios ácido-base de dGMP	19
Figura 8	Espectros de absorción de nucleótidos	20
Figura 9	Representación de la estructura química del ADN.	22
Figura 10	Espectros de acción	24
Figura 11	Formación de dímeros de timina ciclobutano (T<>T)	25
Figura 12	Formación y fotoisomerización del fotoproducto (6,4) de la timina.	25
Figura 13	Productos de degradación de 2'-desoxiguanosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.	28
Figura 14	Productos de degradación de 8-oxodGuo mediante mecanismo Tipo I.	29
Figura 15	Productos de degradación de 2'-desoxiadenosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.	29
Figura 16	Productos de degradación de 2'-desoxitimidina en ADN mediante mecanismo Tipo I.	30
Figura 17	Productos de degradación de 2'-deoxiguanosina mediante mecanismo Tipo II.	31
Figura 18	Productos de degradación de 8-oxodGuo mediante mecanismo Tipo II.	31
Figura 19	Estructura química básica de pteridinas. Anillo de pirimidina (I) y pirazina (II). Estructura química de pteridinas naturales: lumazinas y pterinas.	34
Figura 20	Estructura química general de pterinas aromáticas y reducidas.	34
Figura 21	Equilibrio ácido base de pterinas en solución acuosa para valores de pH entre 4 y 11.	35
Figura 22	Esquema del equilibrio tautomérico lactama-lactima	36
Figura 23	Espectros de absorción de pterinas aromáticas en solución acuosa.	37
Figura 24	Espectros de absorción de la forma ácida de las 7,8-dihidropterinas en solución acuosa a pH=7.	38

Figura 25	Oxidación de dihidropterinas por O_2 en soluciones aireadas a temperatura ambiente. 39
Figura 26	Biosíntesis de H_4 Bip 41
Figura 27	H_4 Bip como cofactor de las enzimas hidroxilasas. 43
Figura 28	Síntesis de novo, reciclado y regulación de la síntesis de H_4 Bip. 44
Figura 29	Mecanismo general de fotooxidación para Bip, Nep y Fop en soluciones acuosas equilibradas en aire bajo irradiación UV-A. 49
Figura 30	Mecanismo general de fotooxidación y fotodimerización para H_2 Bip y H_2 Nep en solución acuosa y bajo radiación UV-A. IS: intermedio 51
Figura 31	Estructura química de los productos de la oxidación fotosensibilizada de dAMP por Ptr, 8-oxo-dAMP y 8-P-dAMP tetracíclico. 52
Figura 32	Espectro de emisión de la lámpara RPR 3500 A 63
Figura 33	Estructura química de <i>Aberchrome 540</i> y espectros de absorción de los dos isómeros usando tolueno como solvente. 68
Figura 34	Evolución de los espectros de absorción de una solución de <i>Aberchrome 540</i> irradiada con una lámpara Rayonet RPR 3500 A; y la variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación. 69
Figura 35	Fotografía del equipo HPLC Shimadzu Prominence LC-20A. 73
Figura 36	Fotografía del espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon. 78
Figura 37	Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorómetro (FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon). 78
Figura 38	Esquema de TCSPC funcionando en modo reverso. 81
Figura 39	Dispositivo para las medidas de fosforescencia a 77 K. 83
Figura 40	Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro azul resalta la transición triplete- triplete que tiene lugar durante los experimentos de fotólisis de destello láser. 88
Figura 41	Evolución temporal de A observada en un experimento típico de fotólisis de destello conjuntamente con los parámetros más relevantes de la señal. 89
Figura 42	Esquema y fotografía del equipo de fotólisis de destello láser (LFP) utilizado. 89
Figura 43	Espectros LFP de pterinas oxidadas 99
Figura 44	Decaimientos de tripletes de pterinas oxidadas 100
Figura 45	Análisis global del espectro LFP de Ptr 102
Figura 46	Decaimiento de triplete de Fop en presencia de O_2 103
Figura 47	Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes por O_2 104
Figura 48	Espectros de emisión de fosforescencia a 77 K 105

- Figura 49 Decaimientos de emisión de fosforescencia a 77 K 107
- Figura 50 Evolución de los espectros de absorción con el tiempo de irradiación de una solución acuosa equilibrada con aire de dAMP y Bip. 110
- Figura 51 Cromatogramas a distintos tiempos de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con aire que contenían dAMP y Bip 111
- Figura 52 Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dAMP y Bip. 112
- Figura 53 Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dAMP utilizando Fop o Cap como sensibilizador. 113
- Figura 54 Evolución de la concentración de dAMP con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas con Ar utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 115
- Figura 55 Espectros de absorción de soluciones que contenían de dAMP y un sensibilizador, Bip o Fop, mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo. 116
- Figura 56 Espectros de absorción de soluciones de dAMP expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo. 117
- Figura 57 Evolución de la concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas en O₂. 118
- Figura 58 Evolución de la concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de KI, utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 120
- Figura 59 Fotodegradación Bip para soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip sin y con el agregado de dAMP. 121
- Figura 60 Espectros de absorción de soluciones saturadas en Ar para diferentes tiempos de irradiación. Soluciones de Bip con y sin agregado de dAMP. 122
- Figura 61 Aumento de la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación de soluciones saturadas con Ar a pH 5,5 de Bip en ausencia y en presencia de 300 M de dAMP. 123
- Figura 62 Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de pterinas oxidadas por dAMP. 125
- Figura 63 Evolución de la concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire con y sin agregado de SOD, utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 127
- Figura 64 Espectro de absorción diferencia de transiente registrado con una solución saturada en Ar de Ptr con y sin agregado de dAMP. 130

- Figura 65 Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical $dAMP^{\cdot-}$ y distribución de los residuos para el ajuste de la señal. 130
- Figura 66 Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical $dAMP^{\cdot-}$ para diferentes concentraciones de dAMP. 131
- Figura 67 Tiempo de formación del radical $dAMP^{\cdot-}$ para diferentes concentraciones de dAMP. 132
- Figura 68 Cromatogramas a distintos tiempos de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con aire que contenían dGMP y Bip. 136
- Figura 69 Evolución de la concentración de reactivos y productos en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP y Bip en función del tiempo de irradiación. 137
- Figura 70 Espectros de absorción de los productos de fotosensibilización de dGMP inducida por Bip. 138
- Figura 71 Cambios en la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial en soluciones acuosas saturadas en Ar y equilibradas con aire, utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 139
- Figura 72 Espectros de absorción de soluciones que contenían de dGMP y un sensibilizador, Bip o Fop, mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo. 141
- Figura 73 Espectros de absorción de soluciones de dGMP expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo. 142
- Figura 74 Evolución de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación para soluciones equilibradas con aire a pH 5,5. Fotodegradación mediada por diferentes derivados pterínicos. 142
- Figura 75 Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación para soluciones de Bip y dGMP equilibradas con aire preparadas en H_2O y D_2O . 145
- Figura 76 Evolución de la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con O_2 y equilibradas con aire, utilizando como sensibilizadores Bip y Fop. 147
- Figura 77 Evolución de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con y sin agregado de KI, utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 149
- Figura 78 Evolución de la concentración de reactivos y productos en soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip sin y con agregado de $800 \mu M$ de dGMP. 150
- Figura 79 Evolución de la concentración de Bip a diferentes tiempos de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de dGMP. 150

- Figura 80 Espectros de absorción a diferentes tiempos de irradiación de soluciones saturadas en Ar de Bip con y sin agregado de dGMP. 151
- Figura 81 Evolución de la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación de soluciones saturadas con Ar a pH 5,5 de Bip con y sin agregado de dGMP. 152
- Figura 82 Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de las pterinas oxidadas estudiadas por dGMP. 153
- Figura 83 Evolución de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con y sin agregado de 50 U ml^{-1} de SOD, utilizando como sensibilizador Bip y Fop. 156
- Figura 84 Espectro de absorción diferencia de transiente registrado con una solución saturada en Ar de Bip con y sin agregado de dGMP. 157
- Figura 85 Crecimiento de la señal del radical $dGMP^{\cdot-}$ registrado en soluciones saturadas con Ar que contenían Bip y concentraciones crecientes de dGMP. 158
- Figura 86 Tiempo de formación del radical $dGMP^{\cdot-}$ y tiempo de vida del triplete de Bip para diferentes concentraciones de dGMP. 159
- Figura 87 Evolución de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas que contienen Ptr y dGMP en diferentes condiciones experimentales. 162
- Figura 88 Evolución de la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial en soluciones de Ptr y dGMP equilibradas con aire preparadas en H_2O y D_2O . 163
- Figura 89 Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de Ptr por dGMP. 164
- Figura 90 Espectro de absorción diferencia de transiente registrado con una solución saturada en Ar de Ptr con y sin agregado de dGMP. 165
- Figura 91 Crecimiento de la señal de $dGMP^{\cdot-}$ en soluciones saturadas en Ar de Ptr y dGMP. 166
- Figura 92 Tiempo de formación del radical $dGMP^{\cdot-}$ y tiempo de vida del triplete de Ptr para diferentes concentraciones de dGMP. 167
- Figura 93 Formación del radical $dGMP^{\cdot-}$ registrado a diferentes concentraciones de O_2 y la gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de 3Ptr por O_2 en presencia de dGMP. 167
- Figura 94 Decaimiento del radical $dGMP^{\cdot-}$ en ausencia y en presencia de O_2 . 169
- Figura 95 Decaimiento del radical $dGMP^{\cdot-}$ registrado en soluciones libre de O_2 . Ajuste lineal de los datos según una cinética de orden 1 y de orden 2. 173

- Figura 96 Variación del $t_{1/2}$ del radical $dGMP \ H$ en soluciones libres de O_2 . 173
- Figura 97 Decaimiento del radical $dGMP \ H$ en una solución de Ptr y dGMP equilibrada con y sin agregado de SOD. 174
- Figura 98 Decaimiento del radical $dGMP \ H$ registrado en soluciones equilibradas con aire y con el agregado de SOD. Ajuste lineal de los datos según una cinética de orden 1 y de orden 2. 175
- Figura 99 Variación del $t_{1/2}$ del radical $dGMP \ H$ en soluciones equilibradas con aire y con el agregado de $50 \mu/ml$ de SOD. 176
- Figura 100 Decaimientos de la señal de fosforescencia de 1O_2 registrados en soluciones de Ptr y diferentes concentraciones dGMP. 178
- Figura 101 Gráficas de Stern-Volmer para el tiempo de vida del 1O_2 y para la concentración inicial del 1O_2 . 179
- Figura 102 Espectros de emisión de fosforescencia de 1O_2 registrados en soluciones de Ptr sin y con el agregado de diferentes concentraciones de dGMP. 182
- Figura 103 Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación del 1O_2 por dGMP para soluciones equilibradas en aire y saturadas con O_2 . 183
- Figura 104 Evolución de la concentración de dGMP con el tiempo de irradiación para soluciones de Ptr y dGMP. 185
- Figura 105 Cromatogramas registrados a diferentes tiempos de irradiación para soluciones equilibradas en aire de dGMP y de Ptr. 187
- Figura 106 Espectro de absorción del producto con $t_r = 3,4$ minutos. 188
- Figura 107 Espectros MS ESI de Ptr y dGMP. 189
- Figura 108 Espectros MS ESI de los productos de fotosensibilización en soluciones de dGMP y Ptr equilibradas con aire luego de 10 min de irradiación. 190
- Figura 109 Cromatogramas registrados con el detector MS de una solución equilibrada en aire de Ptr y dGMP luego de 10 min de irradiación. 191
- Figura 110 Espectros MS ESI y ESI del producto con $t_r = 3,4$ min para soluciones de dGMP y Ptr equilibradas con aire luego de 60 min de irradiación. 193
- Figura 111 Espectro MS/MS ESI de dGMP. 194
- Figura 112 Espectros MS/MS ESI de los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP por Ptr, registrados en una solución equilibrada con aire luego de 10 min de irradiación. 195
- Figura 113 Espectros MS/MS ESI de los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP por Ptr, registrados en una solución equilibrada con aire luego de 60 min de irradiación. 196

- Figura 114 Espectros MS/MS *ESI* de los correspondientes valores de m/z , registrado a partir de una solución equilibrada con aire de Ptr y dGMP luego de 60 min de irradiación. 198
- Figura 115 Espectros MS/MS *ESI* de los correspondientes valores de m/z , registrado a partir de una solución equilibrada con aire de Ptr y dGMP luego de 60 min de irradiación 199
- Figura 116 Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones saturadas con O_2 o equilibradas con aire. 201
- Figura 117 Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire preparadas en H_2O o D_2O 203
- Figura 118 Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire sin y con agregado de SOD. 204
- Figura 119 Evolución del área del producto de $t_r=3,4$ min con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire sin y con agregado de SOD. 205
- Figura 120 Mecanismo general de fotosensibilización de dGMP por pterinas oxidadas. 206
- Figura 121 Evolución de los cromatogramas con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dTMP y Ptr. 211
- Figura 122 Evolución de la concentración de dTMP y Ptr con el tiempo de irradiación. 212
- Figura 123 Evolución de la concentración de dTMP y Ptr en soluciones equilibradas en aire y saturadas con Ar. 213
- Figura 124 Espectros de absorción de soluciones de dTMP y Ptr mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo. 214
- Figura 125 Espectros de absorción de soluciones de dTMP equilibradas con aire expuestas a radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo 215
- Figura 126 Evolución de la concentración de Ptr con el tiempo de irradiación en soluciones de Ptr sin y con agregado de dTMP. 216
- Figura 127 Espectros de emisión de fluorescencia registrados en soluciones de Ptr en presencia de distintas concentraciones de dTMP. 217
- Figura 128 Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados en soluciones de Ptr en presencia de distintas concentraciones de dTMP. *Ptr* 15 M; pH = 5,5. 218
- Figura 129 Gráficos de Stern-Volmer para experimentos de estado estacionario y resuelto en el tiempo para la desactivación de emisión de fluorescencia de Ptr por dTMP a pH 5,5. 218
- Figura 130 Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los excitados excitados tripletes de Ptr por dTMP. 219

- Figura 131 Evolución de la concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas en O_2 . 220
- Figura 132 Evolución de la concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de KI. 221
- Figura 133 Evolución de la concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de SOD. 223
- Figura 134 Espectro de absorción diferencia de transiente registrado con una solución saturada en Ar de Ptr con y sin agregado de dTMP. 224
- Figura 135 Evolución temporal de la señal de A_{330} registrada en soluciones saturadas en Ar de Ptr sin y con el agregado de dTMP. 225
- Figura 136 Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical timidina y distribución de los residuos para el ajuste de la señal. 225
- Figura 137 Espectros EPR en soluciones acuosas de Ptr y DMPO sin irradiar y luego de 15 min de irradiación. 227
- Figura 138 Espectros EPR en soluciones acuosas de Ptr, dTMP y DMPO sin irradiar y luego de 15 min de irradiación. 228
- Figura 139 Cromatogramas registrados para una solución equilibradas en aire de Ptr y dTMP sin irradiar y luego de 3 horas de irradiación. $dTMP_0=1\text{ mM}$; $Ptr_0=150\text{ M}$; $pH=5,5$; $\lambda_{ana}=250\text{ nm}$. 230
- Figura 140 Espectros MS ESI de Ptr y dTMP. 231
- Figura 141 Espectros MS ESI de los productos de la reacción fotosensibilizada de dTMP por Ptr. 232
- Figura 142 Cromatogramas registrados con el detector MS fijo en el valor de m/z correspondiente a cada producto, en una solución equilibradas en aire de Ptr y dTMP luego de 3 horas de irradiación. 233
- Figura 143 Espectros MS/MS ESI de Ptr y dTMP. 234
- Figura 144 Espectros MS/MS ESI de los productos registrados a partir de una solución equilibrada con aire que contenía dTMP y Ptr luego de 3 horas de irradiación. 235
- Figura 145 Velocidad de consumo de dTMP y Ptr a pH 5,5 en Ar. 240
- Figura 146 Cromatogramas de soluciones de dTMP y Ptr saturadas con Ar, sin irradiar y luego de 2 horas de irradiación. 241
- Figura 147 Espectros de absorción de soluciones de dTMP saturadas con Ar expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo. 242

- Figura 148 Evolución de la concentración de Ptr en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con Ar sin y con el agregado de dTMP. 242
- Figura 149 Evolución de la concentración de dTMP y Ptr en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con Ar sin y con agregado de KI. 244
- Figura 150 Cromatogramas de soluciones de Ptr y dTMP saturadas en Ar sin irradiar y luego de 2 h de irradiación, registrados con un detector fotodetector de arreglo de diodos (PDA) y detector de fluorescencia (FL). 245
- Figura 151 Espectros de absorción de soluciones de dTMP y Ptr saturadas con Ar expuestas a radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo. 246
- Figura 152 Matrices de excitación-emisión registradas en soluciones sin irradiar y luego de 2 h de irradiación que contienen Ptr y dTMP saturadas con Ar. 247
- Figura 153 Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados entre 390 y 450 nm en una solución de dTMP y Ptr saturada con Ar expuesta a la radiación UV-A durante 2 horas. 248
- Figura 154 Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados a 450 nm en una solución de dTMP y Ptr saturada con Ar expuesta a la radiación UV-A durante 2 horas. 249
- Figura 155 Variación de las amplitudes de cada uno de los componentes con la $emir$ registrada en una solución de Ptr y dTMP saturada con Ar luego de 2 horas de irradiación. 249
- Figura 156 Espectro MS *ESI* del producto P_{483} con t_r 3,6 minutos. 250
- Figura 157 Espectro MS/MS *ESI* del producto P_{483} . 251
- Figura 158 Evolución del área del producto P_{483} con el tiempo de irradiación en soluciones de dTMP y Ptr saturadas con Ar, equilibradas con aire y saturadas con O_2 . 252
- Figura 159 Evolución de la concentración de reactivos y productos con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP y H_2Bip . 256
- Figura 160 Evolución de la concentración de reactivos y productos con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP, H_2Bip y Bip. 257
- Figura 161 Espectros de absorción de pterinas oxidadas y reducidas. 258
- Figura 162 Espectros de absorción a pH 7 y estructura química de H_2Fop y Sep. 259

Figura 163	Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 6,5 de H_2Fop y Sep excitando a 425 nm. 260
Figura 164	Decaimiento de la emisión fluorescente de soluciones equilibradas en aire a pH 6,5 de H_2Fop y Sep . 261
Figura 165	Espectro de absorción de H_2Xap en solución acuosa a pH 7. 262
Figura 166	Espectros TRES registrados en soluciones acuosas equilibradas en aire de H_2Bip y H_2Nep a pH 7, exc 341 nm. 263
Figura 167	Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados entre 380 y 450 nm en una solución de H_2Bip . 264
Figura 168	Decaimiento de la emisión fluorescente en soluciones equilibradas en aire a pH = 7 de H_2Bip , exc 341 nm. 265
Figura 169	Variación de factores pre-exponenciales normalizados registradas a 0,27 y 8,95 ns en una solución equilibrada en aire a pH 7 de H_2Bip , exc 341 nm. 265
Figura 170	Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 7 de dihidroderivados correspondientes al componente de largo (F_2), espectro extraído del análisis global de la solución de cada derivado oxidado. 267
Figura 171	Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 7 de dihidroderivados correspondientes al componente corto (F_1). 268

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estructura química de los componentes del ADN. 18
Tabla 2	Estructura química y nomenclatura de pterinas aromáticas y 7,8-dihidropterinas estudiadas. 35
Tabla 3	Valores de pK_a para el equilibrio amida-fenolato de diferentes pterinas aromáticas y 7,8-dihidropterinas. 36
Tabla 4	Longitud de onda del máximo de emisión (F), rendimiento cuántico de fluorescencia (F) tiempo de vida de fluorescencia(F), y rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 () de las formas ácidas y alcalinas de algunos derivados pterínicos aromáticos. 46
Tabla 5	Rendimiento cuántico de consumo (R) de pterinas aromáticas en soluciones equilibradas con aire. 48
Tabla 6	Rendimiento cuántico de consumo de reactivo (R) para la fotólisis de Bip y Nep a diferentes concentraciones de O_2 . 50

Tabla 7	Tiempos de vida de tripletes de pterinas oxidadas	101
Tabla 8	Valores de constante de desactivación total de los estados excitados tripletes por O_2 ($k_{tT}^{O_2}$) para soluciones acuosas de Bip, Fop, Cap y Ptr a pH 5,5, comparados con los valores reportados en la literatura medidos a pH 9.	103
Tabla 9	ϵ , ρ y $E_{0,0}^T$	106
Tabla 10	Constantes de desactivación total de 3Pt por dAMP a pH = 5,5 calculadas para las especies T_c y T_l .	124
Tabla 11	Fración de 3Pt desactivado por dAMP en presencia de O_2 (f_q^{dAMP}) a pH = 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c , utilizando Bip y Fop como sensibilizadores.	125
Tabla 12	Rendimiento cuántico de consumo de dGMP (ϕ_{dGMP}^{Pt}) a pH= 5,5 y rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (ϕ^{Pt}) a pD= 5,5; para diferentes derivados pterínicos.	143
Tabla 13	Velocidades iniciales de consumo de dGMP experimentales y calculadas, considerando la reacción entre 1O_2 y dGMP.	145
Tabla 14	Constantes de desactivación de 3Pt por dGMP a pH 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c .	153
Tabla 15	Fración de 3Pt desactivado por dGMP en presencia de O_2 (f_q^{dAGMP}) a pH 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c , utilizando Bip o Fop como sensibilizadores.	154
Tabla 16	Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP inducida por Ptr en presencia de O_2 .	191
Tabla 17	Valores de m/z para los fragmentos principales correspondientes a la base nitrogenada oxidada de los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP por Ptr y su asignación a compuestos reportados en la literatura.	197
Tabla 18	Porcentaje de las impurezas en soluciones de H_2Pt calculadas por HPLC	262
Tabla 19	Resultados del análisis global de los espectros TRES correspondiente al componente de λ_F largo para las soluciones de dihidroderivados.	266
Tabla 20	Resultados del análisis global de los espectros TRES registrados con soluciones de derivados oxidados.	266
Tabla 21	Longitud de onda máxima de fluorescencia (λ_F), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) y tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) para soluciones de H_2Pt calculadas a partir del análisis global.	268
Tabla 22	Tiempos de vida (τ_T) y constantes de desactivación total (k_{tT}) de los estados excitados tripletes por O_2 ($k_{tT}^{O_2}$) y por los nucleótidos dAMP (k_{tT}^{dAMP}), dGMP (k_{tT}^{dGMP}) y dTMP (k_{tT}^{dTMP}); en solución acuosa y a pH=5,5.	274

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ptr	pterina
HMdUrd	5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina
FordUrd	5-formil-2'-desoxiuridina
SI	sistema internacional
IR	intermediario rojo
PteGlu	ácido fólico
PABA	ácido paraaminobezóico
Lum	lumazina
IdZ	imidazolona
dZ	oxazolona
dD	guanidinodihidantoina
HdD	dihidroguanidinodihidantoina
Sp	espiroiminodihidantoina
Bip	biopterina
Nep	neopterina
Hmp	6-hidroximetilpterina
Fop	6-formilpterina
Cap	6-caboxipterina
Sep	sepiapterina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
Mep	6-metilpterina
dAMP	2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato
dGMP	2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato

dTMP	2'-desoxitimidina 5'-monofosfato
dCMP	2'-desoxicitosina 5'-monofosfato
8-oxo-dAMP	8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato
8-oxo-dGMP	8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
LFP	fotólisis de destello láser
MS	espectrometría de masas
ESI	ionización electrospray
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
ADN	ácido desoxiribonucléico
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
PDA	detector de arreglo de diodos
FL	detector de fluorescencia
PDA	fotodetector de arreglo de diodos
TRES	espectros de emisión con resolución temporal
TCSPC	recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente
EPR	resonancia paramagnética electrónica
TOF	tiempo de vuelo
SOD	superóxido dismutasa
KI	yoduro de potasio
NIR	infrarojo cercano
IC	conversión interna
ISC	cruce intersistema
VR	relajación vibracional
Sens	fotosensibilizador
BSA	albúmina
TYR	tirosinasa
ATMM	ancho total a mitad del máximo

NOMENCLATURA

- T rendimiento cuántico de producción de estados excitados tripletes
- τ_0 tiempo de vida de la especie emisora en ausencia de desactivador
- k_{tF} constante de velocidad de desactivación total de fluorescencia
- $\frac{dGMP}{dt}^{\text{calc}}_0$ velocidad inicial de consumo de dGMP calculada para la reacción química entre dGMP y el oxígeno singlete
- $\frac{dGMP}{dt}^{\text{exp}}_0$ velocidad inicial de consumo de dGMP calculada por HPLC
- A diferencia de absorbancia
- longitud de onda
- λ_{ana} longitud de onda de análisis
- λ_{emi} longitud de onda de emisión
- λ_{exc} longitud de onda de excitación
- λ_F longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia
- λ_P longitud de onda del máximo de emisión de fosforescencia
- m/z relación masa/carga
- rendimiento cuántico
- rendimiento cuántico
- R rendimiento cuántico de consumo de reactivo
- rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete
- η eficiencia cuántica de transferencia de energía
- F rendimiento cuántico de fluorescencia
- tiempo de vida del estado excitado
- tiempo de vida del oxígeno singlete
- F tiempo de vida de fluorescencia
- P tiempo de vida de emisión de fosforescencia

T	tiempo de vida del estado excitado triplete
H_2Bip	7,8-dihidrobiopterina
H_2Fop	6-formil-7,8-dihidropterina
H_2Hmp	6-hidroxietil-7,8-dihidropterina
H_2Nep	7,8-dihidroneopterina
H_2Xap	7,8-dihidrooxantopterina
H_4Bip	5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
	coeficiente de absorción molar
1O_2	oxígeno singlete
3Bip	estado excitado triplete de Bip
3Cap	estado excitado triplete de Cap
3Fop	estado excitado triplete de Fop
3Pt	estados excitados tripletes de pterinas oxidadas
3Ptr	estado excitado triplete de Ptr
I_F	intensidad de emisión de fluorescencia
I_p	intensidad de emisión de fosforescencia
k_q	constante bimolecular de desactivación física
k_q	constante de desactivación física
k_r	constante de reactividad química
K_{SV}	constante de Stern-Volmer
$k_{tT}^{O_2}$	constante de desactivación total del triplete por oxígeno
k_t	constante de velocidad de desactivación total
O_2	anión superóxido
q_p	flujo fotónico
q_p^V	densidad de flujo fotónico
S_1	estado excitado singlete
$Sens$	sensibilizador en un estado electrónicamente excitado

T_1	estado excitado triplete
$t_{1/2}$	tiempo de vida medio
T_c	estado excitado triplete de tiempo de vida corto
t_f	tiempo de formación
t_{irr}	tiempo de irradiación
T_l	estado excitado triplete de tiempo de vida largo
t_r	tiempo de retención

Parte I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN A LA FOTOQUÍMICA Y FOTSENSIBILIZACIÓN

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética se produce la excitación desde un estado cuántico de menor energía a otro de mayor energía. En este estado electrónico excitado, la molécula se encuentra en una situación muy inestable respecto de su estado basal, motivo por el cual puede perder el exceso de energía de diferentes modos. Si la molécula sufre una transformación química, entonces se denomina proceso fotoquímico. En cambio, si permanece químicamente inalterada y se desactiva mediante alguna forma física, el proceso es fotofísico.

En fotoquímica existen dos leyes fundamentales. La primera ley fue formulada por Grotthuss y Draper y establece 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 solamente una molécula”*. Esto indica que un solo fotón es responsable del cambio fotoquímico o fotofísico en una molécula.

1.1 PROCESOS FOTOFÍSICOS

1.1.1 *Procesos de desactivación unimolecular*

Existen muchos caminos de relajación física posibles y el más favorable dependerá del tipo de molécula, de la naturaleza de los estados electrónicos involucrados y de las propiedades del medio. Estas vías de desactivación suelen ser muy rápidas y pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Transiciones radiativas, en las cuales la molécula excitada emite radiación electromagnética para regresar al estado de menor energía. Esta energía emitida es menor que la utilizada para generar el estado excitado.
- Transiciones no radiativas, en las cuales un estado previamente excitado se convierte en otro de menor energía, sin emisión de radiación, por transferencia intramolecular de energía.
- Procesos de desactivación física que involucran la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras moléculas que se encuentran presentes en el medio.

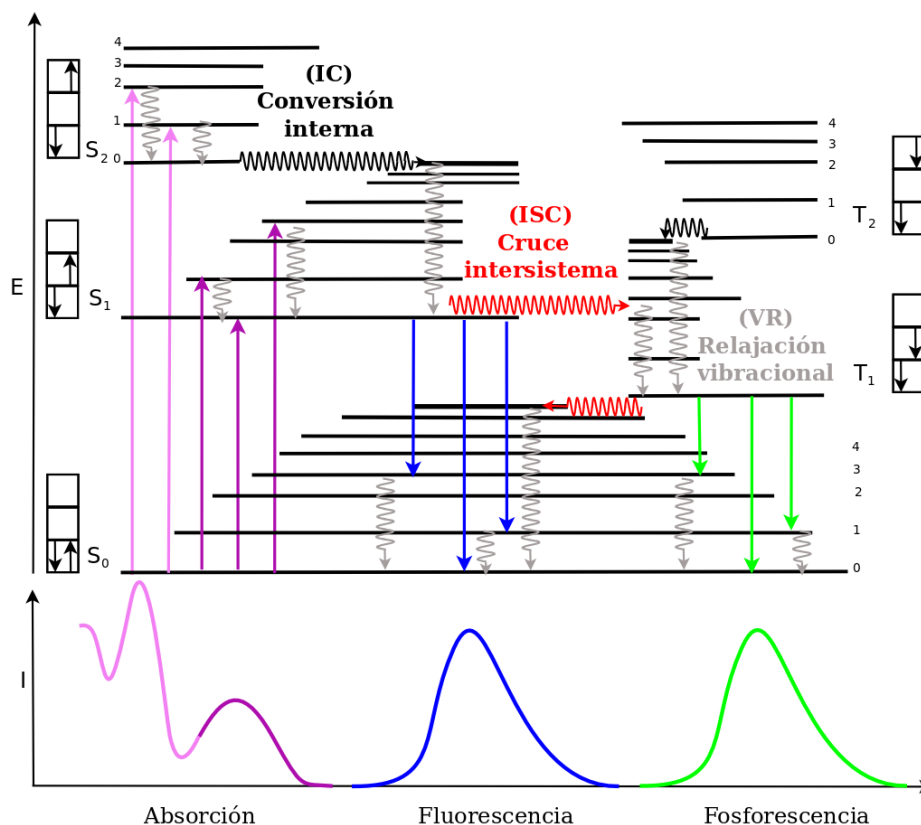


Figura 1: Diagrama de Jablonski modificado

Cada una de estas vías de desactivación física puede involucrar, a su vez, distintos procesos. En la [Figura 1](#) se muestra un diagrama de Jablonski modificado donde se representan las transiciones radiativas y no radiativas que puede sufrir una molécula. En este esquema simplificado de niveles de energía, las transiciones radiativas se representan con flechas de línea recta y las transiciones no radiativas con flechas de líneas onduladas. Los niveles vibro-rotacionales asociados a cada estado electrónico se representan con líneas horizontales.

Típicamente, las moléculas orgánicas se encuentran en un estado electrónico basal de tipo singlete (S_0). Cuando se produce la absorción de radiación electromagnética se promueve un electrón a un orbital de mayor energía. Si no hay cambio en la multiplicidad de spin, el estado electrónico excitado alcanzado continúa siendo singlete (S_1). En cambio, si ocurre un cambio en la multiplicidad de spin el estado electrónico alcanzado será de tipo triplete (T_1). Este último estado posee menor energía que el estado excitado S_1 . Cuando se produce un proceso de excitación electrónica siempre existe una preferencia sobre la conservación del spin, motivo por el cual las bandas de absorción más intensas en un espectro corresponden a transiciones del tipo $S_0 \rightarrow S_1$. En cambio, las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ están "prohibidas por spin", es decir, que tienen una probabilidad de ocurrencia extremadamente baja, lo que deriva en transiciones muy débiles. Usualmente, la excitación al primer estado excitado (S_1) es el proceso más favorable. Sin embargo, muchas moléculas

las pueden absorber radiación a un segundo estado excitado singlete de mayor energía presentando transiciones $S_0 \rightarrow S_2$.

Como se observa en el diagrama de Jablonski, las transiciones no radiativas pueden ocurrir entre estados de igual multiplicidad o entre estados de distinta multiplicidad. A los primeros se los denomina procesos de conversión interna (IC) (*internal conversion*) y a los últimos, cruce intersistema (ISC) (*intersystem crossing*). Las transiciones horizontales entre estados, por IC o ISC, dejan a la molécula con un exceso de energía vibro-rotacional. En solución esta energía es rápidamente removida por colisiones con moléculas del solvente, en un proceso denominado relajación vibracional (VR).

Los procesos radiativos que pueden ocurrir se denominan fluorescencia y fosforescencia. En ambos casos, la emisión de la radiación sucede a longitudes de onda mayores que la radiación absorbida inicialmente. Esta pérdida de energía, fenómeno conocido como corrimiento o desplazamiento de Stokes, se debe a una serie de fenómenos fisicoquímicos como: disipación de energía vibracional, redistribución de electrones en moléculas del solvente, tautomerización, reorientación de las moléculas de solvente e interacciones entre la molécula absorbente y las moléculas del solvente [2]. Si la transición ocurre desde un estado electrónico de igual multiplicidad de spin que el estado final, la emisión se denomina fluorescencia. La misma es una transición fuertemente permitida y muy rápida. La fosforescencia, en cambio, es una transición que involucra estados de diferente multiplicidad de spin, es decir, una transición prohibida en términos de la teoría de la mecánica cuántica. No obstante, esta puede ocurrir y, generalmente, es de menor intensidad y más lenta que la fluorescencia. Pueden evaluarse experimentalmente las propiedades de la radiación emitida para conocer detalles de la naturaleza y el comportamiento de los estados excitados.

Sobre la base de las dos leyes fundamentales de la fotoquímica puede definirse el término rendimiento cuántico (Φ). El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico, como la fluorescencia (Φ_F), puede expresarse, para un determinado compuesto, en términos del número de moléculas que fluorescen respecto de cada fotón absorbido (ecuación 1).

$$\Phi_F = \frac{N \text{ moléculas fluorescentes}}{N \text{ cuantos absorbidos}} \quad (1)$$

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (2)$$

Como el número de fotones absorbidos por una muestra es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida (I_A), y el número de fotones emitidos por la misma es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente (I_F), Φ_F puede definirse con la ecuación 2.

1.1.2 Procesos de desactivación bimolecular

Cuando se encuentra presente en el sistema o medio de reacción otra especie química capaz de interactuar con el estado excitado de la molécula que absorbió la radiación elec-

tromagnética existe otra vía de relajación del estado excitado. Esta consiste en el *quenching* o desactivación física por otra molécula.. Esta segunda molécula se conoce, usualmente, como desactivador o *quencher*. De esta manera, una molécula excitada puede interactuar con el desactivador dando lugar a la relajación sin emisión de radiación. En este proceso está involucrada la transferencia de energía de la molécula excitada a la otra molécula en una colisión. De esta manera, la intensidad de la radiación se reduce en una cantidad dependiente de la concentración del desactivador y de la eficiencia del proceso de desactivación. Además, la presencia del desactivador disminuye el tiempo de vida del estado excitado (τ). Por lo tanto, medidas de la intensidad de la emisión y su dependencia en el tiempo proveen información acerca de las velocidades de desactivación entre la molécula excitada y el desactivador [3].

En la ecuación 3 se representa la desactivación dinámica o por colisiones de una molécula "A" en un estado excitado (A^*) por una molécula desactivadora en el estado fundamental (Q), junto con la ecuación de velocidad de dicho proceso (ecuación 4), donde k_q es la constante bimolecular de desactivación física .



$$v = k_q A^* Q \quad (4)$$

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como desactivadores de un determinado compuesto. El ejemplo más representativo de desactivación por colisión está dado por el O_2 molecular. Esta es una de las razones por las cuales es necesario eliminar el O_2 disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de estados excitados, rendimiento cuántico de producción de estados excitados, etc. Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, anión bromato, anión yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas desactivadoras, se debe identificar aquéllas de interés para cada fluoróforo en particular.

Dado un proceso de desactivación dinámica, puede calcularse la constante de velocidad del proceso de desactivación analizando espectros de emisión del compuesto estudiado en presencia y ausencia de desactivador para ello se utiliza la ecuación de *Stern-Volmer* (5),

$$\frac{I_{em}^0}{I_{em}} = 1 + K_{SV} Q = 1 + k_q \tau^0 Q \quad (5)$$

donde I_{em}^0 e I_{em} son las intensidades de emisión en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente, K_{SV} es la constante de *Stern-Volmer*, Q es la concentración del desactivador y τ^0 es el tiempo de vida de la especie excitada en ausencia de desactivador. En general, en los experimentos de desactivación se suele agregar el superíndice "0" para diferenciarlo de los τ en presencia del desactivador. Bajo irradiación continua, esta ecuación se puede deducir planteando la hipótesis de estado estacionario para la especie excitada en presencia de un desactivador [2]. La molécula desactivadora puede ser cualquiera, pero

debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la concentración del estado excitado, y por consiguiente, de la emisión se deba a una única interacción entre la molécula emisora y ella.

El rendimiento cuántico de emisión en ausencia de desactivador (ϕ_{emi}^0) está dado por la ecuación 6.

$$\phi_{emi}^0 = \frac{k_{emi}^0}{k_{emi}^0 + k_i} = \frac{k_{emi}^0}{k_{emi}^0} \quad (6)$$

El rendimiento cuántico de emisión en presencia del desactivador (ϕ_{emi}) esta dada por la ecuación 7

$$\phi_{emi} = \frac{k_{emi}^0}{k_{emi}^0 + k_i + k_q Q} = \frac{k_{emi}^0}{k_{emi}^0 + k_q Q} \quad (7)$$

donde k_{emi} , definida como el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de A ($k_{emi} = k_{emi}^0 + k_i$), excepto k_q . Debe observarse que ϕ_{emi} disminuye en una cantidad proporcional a la concentración del desactivador. Se obtiene el valor máximo de ϕ_{emi}^0 en ausencia de desactivador. La relación $\phi_{emi}^0 / \phi_{emi}$ está dada por la ecuación 8.

$$\frac{\phi_{emi}^0}{\phi_{emi}} = \frac{k_{emi}^0 + k_i + k_q Q}{k_{emi}^0 + k_q Q} = 1 + \frac{k_i Q}{k_{emi}^0 + k_q Q} \quad (8)$$

Esta ecuación indica que la relación de los ϕ_{emi} es linealmente dependiente de la concentración del desactivador, siendo la ordenada al origen igual a 1. Esta relación se denomina relación de Stern-Volmer.

La determinación de ϕ_{emi} requiere del conocimiento de la intensidad de luz absorbida. Sin embargo, si se realizan medidas, por ejemplo, de intensidad de fluorescencia en función de la concentración del desactivador, bajo idénticas condiciones de geometría de irradiación, concentración de molécula fluorescente, intensidad de excitación, longitud de onda (λ) y sensibilidad de detector, entonces la luz absorbida es idéntica para cada medida. Bajo dichas condiciones, la relación $\phi_{emi}^0 / \phi_{emi}$ es igual a la relación de intensidades de emisión. Reemplazando en la ecuación 8, se obtiene la expresión dada por la ecuación 9.

$$\frac{I_{emi}^0}{I_{emi}} = 1 + \frac{k_i Q}{k_{emi}^0 + k_q Q} \quad (9)$$

Así una gráfica de I_{emi}^0 / I_{emi} en función de Q debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje "y". La pendiente de dicha gráfica es K_{SV} , y es igual a $k_i / (k_{emi}^0 + k_q Q)$.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite obtener información muy importante. Por ejemplo, la determinación de K_{SV} es un método indirecto para obtener el valor de ϕ_{emi}^0 si se conoce k_q , o por el contrario, puede determinarse k_q si se conocen los ϕ_{emi}^0 . 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 fluoróforos (entre otros mecanismos).

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

Se puede deducir rápidamente que, si la desactivación es de tipo dinámico el cociente de los tiempos de vida en ausencia y presencia de desactivador (τ^0/τ) es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de emisión (I_{emi}^0/I_{emi} o $\tau^0 k_{emi}^0/I_{emi}$).

$$\tau^0 = \frac{I_{emi}^0}{k_{emi}^0} \quad (10)$$

$$\tau = \frac{I_{emi}}{k_{emi}} \quad (11)$$

$$\frac{\tau^0}{\tau} = \frac{k_{emi}^0}{k_{emi}} = \frac{I_{emi}^0}{I_{emi}} \quad (12)$$

Por consiguiente, se puede utilizar la ecuación 13 para describir la dependencia de los τ y/o I_{emi} con la concentración de desactivador para evaluar el comportamiento de cualquier especie excitada.

$$\frac{\tau^0}{\tau} = \frac{I_{emi}^0}{I_{emi}} = 1 + k_q \tau^0 Q \quad (13)$$

1.2 PROCESOS FOTOQUÍMICOS

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética, la misma queda en un estado de mayor energía que aumenta las posibilidades de reacción respecto de la misma molécula en estado basal [4]. Este exceso de energía puede emplearse para promover una reacción química, se habla entonces de una reacción fotoquímica. Esto ocurre por distintos mecanismos: la energía puede ser utilizada para romper una unión química, para superar una energía de activación, etc. Queda claro que la reactividad química de una molécula en un estado excitado puede ser muy diferente a la reactividad química de esa misma molécula en su estado electrónico fundamental.

Según el tipo de transformación química las reacciones fotoquímicas pueden clasificarse en (Figura 2):

1. Reacciones de disociación: la energía de la radiación debe ser suficiente para producir la ruptura de un enlace, dando lugar a la fragmentación de la molécula excitada.
2. Procesos intramoleculares: en un estado excitado una parte de una molécula interacciona con otra parte de la misma molécula. Estos procesos conducen a cambios estructurales de la molécula y/o procesos de isomerización.

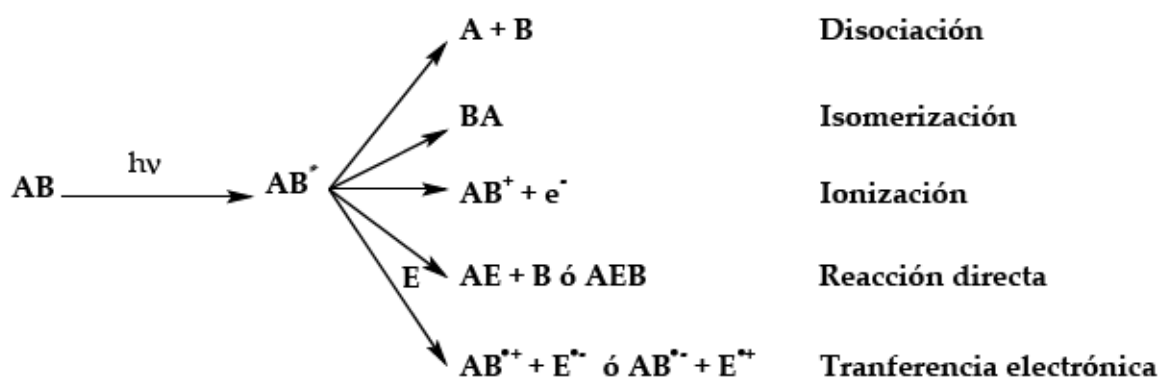


Figura 2: Vías de desactivación química del estado excitado de una molécula "AB" en presencia de otra molécula "E".

3. Procesos de ionización: la energía de la radiación produce la separación de un electrón y, por lo tanto, la ionización de la molécula excitada. La molécula ionizada posteriormente sufre una transformación química, por ejemplo, por reacción con otra molécula.
4. Reacciones o procesos intermoleculares: la excitación de una molécula favorece la reacción con una segunda molécula "E". Pueden ser reacciones directas entre la molécula excitada y E, o procesos de transferencia electrónica entre ambas moléculas generando especies radicales.

1.3 FOTSENSIBILIZACIÓN

La fotosensibilización abarca un conjunto especial de procesos fotoquímicos en los cuales, una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de radiación electromagnética por otra especie química que se denomina fotosensibilizador fotosensibilizador (*Sens*) o, simplemente, sensibilizador [5, 6]. Si bien ésta es una definición amplia, y existen otras más acotadas, es también la más aceptada en el campo de la fotoquímica aplicada a reacciones de compuestos orgánicos y procesos bioquímicos. Según el mecanismo, los procesos fotosensibilizados pueden ocurrir a través de transferencia de energía o transferencia electrónica.

1.3.1 *Transferencia de energía*

La fotosensibilización por transferencia de energía es un proceso en el cual una especie química electrónicamente excitada ("dador") se desactiva transfiriendo energía a una segunda especie química ("aceptor"). Como consecuencia, esa energía produce en el aceptor una transición electrónica poblando estados excitados (generalmente los de más baja energía, S_1 o T_1) que luego conduce a algún fenómeno químico o físico. En la [Figura 3](#)

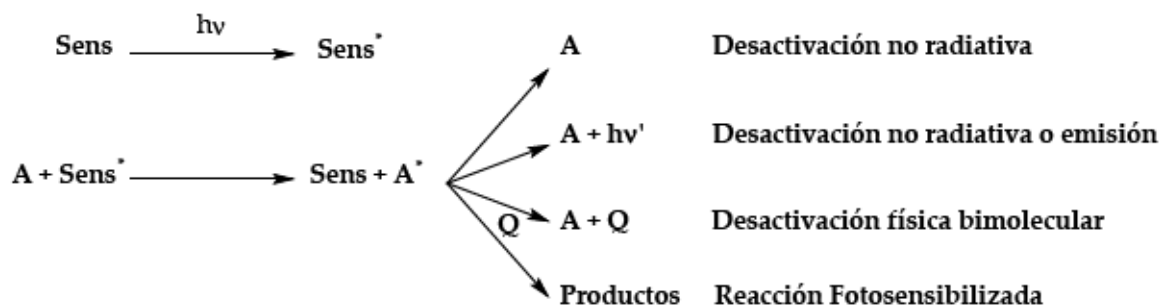


Figura 3: Proceso fotosensibilizado que ocurre a través de mecanismos de transferencia de energía.

se presenta la secuencia de reacciones involucradas en este mecanismo. Primero, el sensibilizador (*Sens*) obtiene la energía de excitación a partir de la absorción de un fotón generando un estado excitado (*Sens*^{*}). Luego, la energía se transfiere al aceptor (*A*) para generar *A* en un estado electrónicamente excitado (*A*^{*}), y la molécula *Sens*^{*} regresa al estado basal. Esta energía transferida es menor a la absorbida inicialmente debido a la relajación o pérdida de energía vibro-rotacional. Posteriormente, *A*^{*} puede volver a su estado fundamental desactivándose a través de cualquiera de las vías fotofísicas descritas en la Sección 1.1 o sufrir alguno de los cambios químicos presentados en la Sección 1.2. La transferencia de energía genera la excitación de la especie que no absorbe la radiación electromagnética, lo cual puede traducirse en cambios químicos sufridos por el aceptor que no ocurrirían en ausencia de radiación y del sensibilizador. Por otro lado, esta vía alternativa de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa y, por lo tanto, puede dar lugar a distintas reacciones químicas [7].

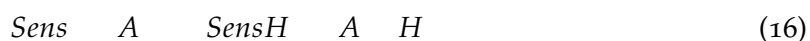
La transferencia de energía puede ocurrir, a su vez, a través de dos mecanismos distintos [8]:

- Transferencia de energía radiativa: la energía se transfiere por desactivación radiativa de *Sens*^{*} y absorción de la radiación emitida por *A* [6].
- Transferencia de energía no radiativa: requiere una interacción directa entre *Sens*^{*} y *A*.

La transferencia de energía triplete-triplete es el tipo más frecuente y más importante en fotoquímica orgánica. La misma es utilizada comúnmente para generar estados excitados tripletes de moléculas con bajos rendimientos cuánticos de producción de este tipo de estados excitados. Es decir, existen compuestos que no pueden generar estados tripletes por absorción directa de radiación pero que, sin embargo, pueden generarlos aceptando energía de un fotosensibilizador excitado. La eficiencia del proceso de transferencia de energía depende de las configuraciones de spin y de la energía relativa de los estados excitados del dador y del aceptor. Otro caso importante de transferencia de energía es la excitación fotosensibilizada del O_2 para generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), especie muy reactiva que participa en la generación de estrés oxidativo en sistemas biológicos (subsección 1.4.2).

1.3.2 *Transferencia electrónica*

En el estado excitado, las moléculas sufren cambios en sus propiedades fisicoquímicas respecto al estado basal, en particular su acidez y potencial redox. Cuando una especie química se oxida o reduce, por reacción con otra especie electrónicamente excitada, se dice que la transferencia electrónica es fotosensibilizada. Esta transferencia electrónica consiste en una reacción en la cual un electrón es cedido (o aceptado) por una molécula excitada hacia (o desde) un aceptor en su estado fundamental, de acuerdo con los respectivos potenciales redox de los dos estados involucrados. Este proceso se puede dar por una transferencia electrónica propiamente dicha, generando el radical anión y catión de las distintas especies (reacciones 14 y 15), o por una abstracción de un átomo de hidrógeno generando radicales neutros (reacciones 16 y 17).



Los radicales formados pueden posteriormente sufrir diferentes reacciones que dependerán de sus propiedades, de la presencia de otros compuestos en el medio y de diversas condiciones experimentales, como son la temperatura, el pH y las características del solvente.

1.4 OXIDACIONES FOTOSENSIBILIZADAS

Las fotooxidaciones son un conjunto de procesos fotoinducidos de gran importancia en sistemas biológicos. Si, además, la fotooxidación ocurre en una molécula como resultado de la absorción de radiación por otra (sensibilizador), el proceso es una oxidación fotosensibilizada. Estos procesos ocurren a través de un conjunto de mecanismos que pueden involucrar tanto fenómenos de transferencia de energía como electrónica. El oxígeno que participa en las oxidaciones puede estar en su estado triplete basal o en un estado excitado singlete [9]. La clasificación más aceptada de los mecanismos de las oxidaciones fotosensibilizadas es, muy probablemente, la propuesta por Foote [10] (Figura 4). El primer paso, como en todo proceso fotosensibilizado, implica la absorción de la radiación por Sens generando, de esta manera, *Sens*, el cual puede ser singlete o triplete. El sensibilizador electrónicamente excitado puede reaccionar con el sustrato o el solvente (mecanismos Tipo I) o con el O₂ (mecanismos Tipo II).

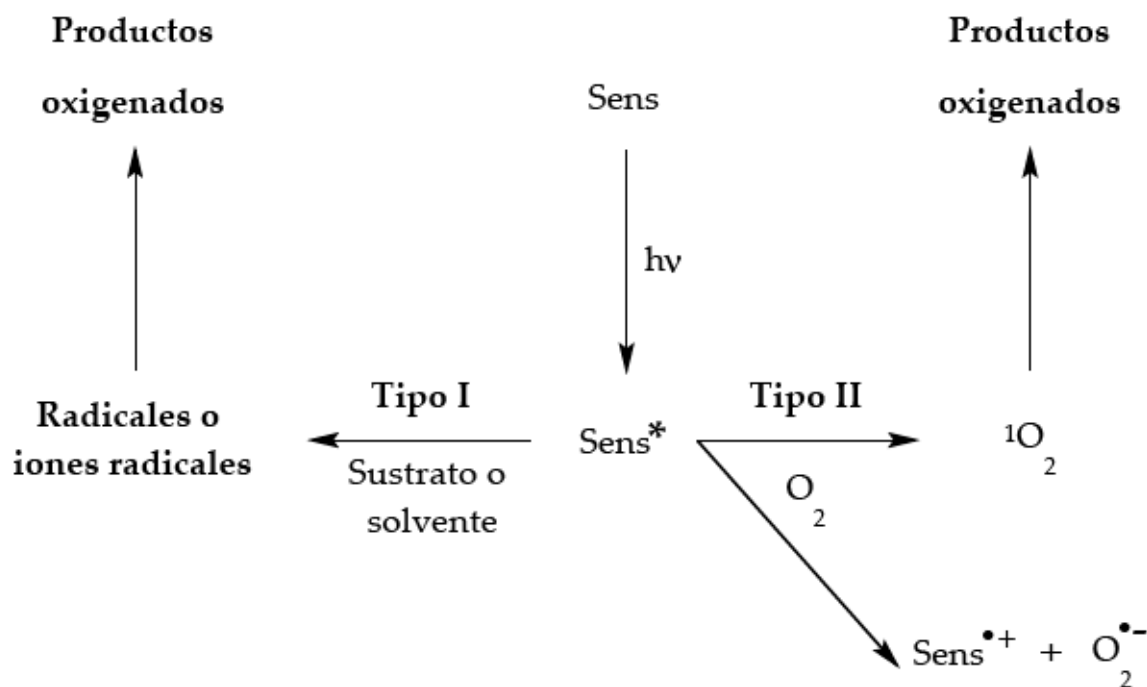
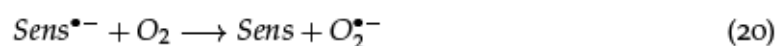
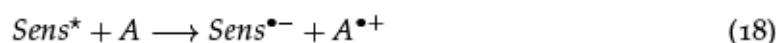


Figura 4: Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y Tipo II.

1.4.1 Mecanismos Tipo I

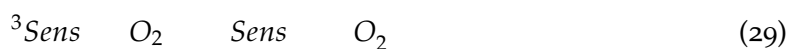
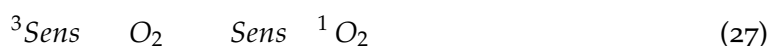
En los mecanismos Tipo I, el sensibilizador en estado excitado reacciona con el sustrato o el solvente a través de un proceso de transferencia electrónica. En los sistemas biológicos los sensibilizadores, en general, actúan como aceptores de electrones, mientras que los sustratos, como los nucleótidos y aminoácidos por ejemplo, tienden a ceder un electrón formándose los correspondientes radical anión y radical catión (reacción 18). Dependiendo del pH del medio y de las correspondientes constantes de disociación ácida, el radical catión puede perder un protón para formar el radical neutro (reacciones 18). El radical anión, por su parte, suele reaccionar con el O₂ disuelto produciendo el anión superóxido (O₂^{•-}) (reacción 20), el cual, posteriormente, puede reaccionar con el sustrato o con su radical neutro para formar productos oxigenados (A_(ox)) (reacciones 21 y 23), o puede desproporcionarse a H₂O₂ (reacción 22), quien, a su vez, puede participar en otras reacciones de oxidación. Por último, el radical neutro puede reaccionar con el O₂ (reacción 24) o bien con agua, si la reacción se lleva a cabo en medio acuoso (reacción 25), para dar productos oxigenados.





1.4.2 Mecanismos Tipo II

Los mecanismos Tipo II involucran la producción de 1O_2 por procesos de transferencia de energía. El O_2 en estado basal triplete interacciona con el estado triplete excitado del sensibilizador dando lugar a la desactivación de *Sens* y la formación de 1O_2 (reacción 27). Luego, esta última especie, altamente reactiva, oxida al sustrato (A) generando productos oxigenados (A_{ox}) (reacción 28). Sin embargo, también puede existir una transferencia electrónica desde el sensibilizador hacia el O_2 , formando el radical *Sens* y O_2^- . Esta especie reactiva puede, posteriormente, oxidar al sustrato (reacciones 29 y 30). Si bien en este mecanismo la oxidación del sustrato se produce por reacción con O_2^- , al igual que en las reacciones 21 y 23 de los mecanismos Tipo I, el mismo entra en la categoría de mecanismos de Tipo II, de acuerdo a la clasificación de Foote (Figura 4), debido a que el sensibilizador excitado reacciona directamente con el O_2 .



EFFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE EL ADN Y SUS COMPONENTES

Este capítulo pretende exponer brevemente algunos fenómenos o procesos desencadenados por la radiación que, potencialmente, tienen lugar en los sistemas vivos. En este sentido, en primer lugar se describirán las características, en términos energéticos, de la radiación solar que incide sobre la superficie terrestre, haciendo hincapié en la radiación UV-visible. A continuación, se describirá la composición química de una de las biomoléculas de mayor relevancia en los sistemas biológicos (el ácido desoxiribonucleico (ADN) y sus componentes monoméricos, los nucleótidos). Por último, se describirán las principales reacciones, y los mecanismos en los que participan estas biomoléculas cuando son expuestas a la radiación UV.

2.1 RADIACIÓN SOLAR QUE ALCANZA LA SUPERFICIE TERRESTRE

La radiación electromagnética emitida por el sol abarca radiaciones que van desde los rayos gama (< 10 pm) hasta las ondas de radiofrecuencia (> 10 km) [11]. Sin embargo, sólo una porción de la radiación emitida por este cuerpo celeste alcanza la superficie terrestre. Este fenómeno se debe a la presencia de moléculas, que se interponen entre el sol y la Tierra, capaces de absorber parte de esta radiación.

La radiación solar se distribuye de manera no homogénea sobre la superficie de la Tierra, dependiendo de numerosos factores, tales como: la época del año (posición respecto al sol), composición de la atmósfera (aerosoles, ozono, nubosidad), la posición geográfica (latitud, longitud y altura sobre el nivel del mar) y del tipo de suelo (nieve, arena, césped, asfalto), entre otros. Por lo tanto, la radiación solar que llega a la superficie terrestre varía en cada punto del planeta. En la [Figura 5](#) se muestra como ejemplo una gráfica de la irradiancia solar espectral registrada al mediodía en la ciudad de La Plata, Buenos Aires. Del total de la energía solar que alcanza la superficie terrestre, menos del 15 % pertenece a radiación ultravioleta (UV) (200-400 nm), un 60 % a la radiación visible (400-700 nm) y el 25 % remanente a radiación infrarroja.

Ciertamente, la radiación UV no representa el tipo mayoritario de radiación solar incidente sobre la superficie terrestre. Sin embargo, por ser la radiación más energética es, potencialmente, la más nociva para los diferentes sistemas biológicos. La radiación UV se divide en tres regiones.

- Región UV-C: comprende las longitudes de onda que van desde los 200 nm hasta alrededor de 280 nm. Esta región del espectro solar es absorbida, principalmente,

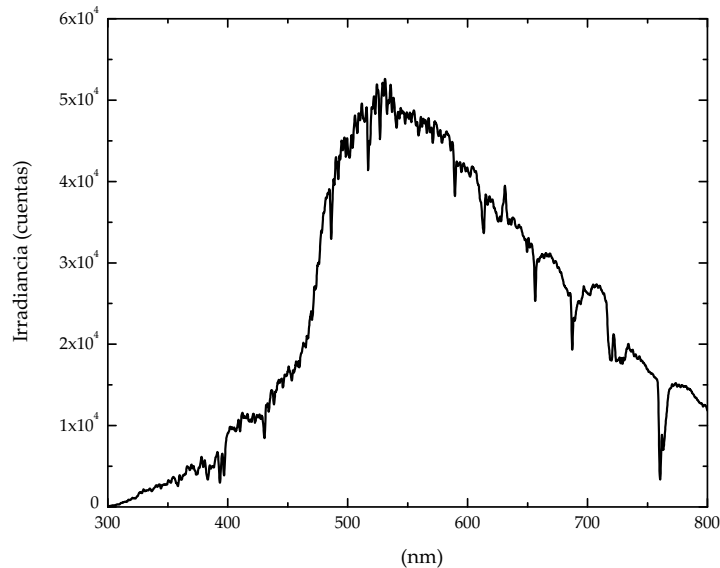


Figura 5: Irradiancia solar espectral en función de la longitud de onda. Medición para el día 8 de octubre con cielo despejado en la ciudad de La Plata, Argentina.

por el ozono (O_3) presente en la atmósfera y por lo tanto no alcanza la superficie terrestre [12].

- Región UV-B: se extiende, aproximadamente, desde los 280 nm hasta alrededor de los 320 nm. Ciertamente, una porción importante de esta zona del espectro no alcanza la superficie de la Tierra por ser absorbida parcialmente por O_3 . La longitud de onda más corta detectable a nivel del mar es aproximadamente 290 nm. Sin embargo, ese punto de corte es altamente dependiente de la concentración de O_3 atmosférico y una disminución de la capa del mismo permite el ingreso de radiación de longitudes de onda más cortas al ambiente terrestre.
- Región UV-A: abarca la zona del espectro electromagnético comprendida entre los 320 nm y los 400 nm. Como puede apreciarse en la Figura 5, la radiación UV-A constituye la mayor parte de la radiación solar UV que alcanza la superficie terrestre, además atraviesa más fácilmente nubes.

2.2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO Y SUS COMPONENTES

Los nucleótidos, son un grupo de compuestos heterocíclicos presentes en todos los sistemas biológicos y son esenciales para la vida. Por un lado, representan la estructura química/molecular a través de la cual se almacena la información genética de los sistemas vivos, dado que son los constituyentes primarios del ácido desoxirribonucleico (ADN). Asimismo, participan de diversas funciones en el metabolismo celular: 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.

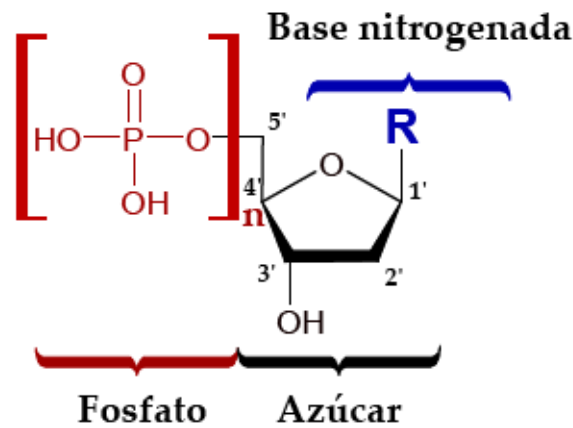


Figura 6: Estructura química de un desoxirribonucleótido.

2.2.1 Estructura química

Los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una base nitrogenada, un monosacárido de cinco carbonos y uno o más grupos fosfatos (Figura 6). Los nucleótidos se clasifican según el tipo de monosacárido en dos grandes grupos: los ribonucleótidos, en los cuales el azúcar es la ribosa, y los desoxirribonucleótidos, donde el azúcar es la 2'-desoxirribosa. El prefijo desoxi significa que este azúcar carece de un átomo de oxígeno, en la posición 2', respecto de la ribosa.

La base nitrogenada de los desoxirribonucleótidos puede ser una purina o una pirimidina. Las estructuras químicas de estos compuestos, junto con sus nomenclaturas abreviadas, pueden apreciarse en la columna (a) de la Tabla 1. En un desoxirribonucleótido el átomo de carbono ubicado en la posición 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 β . El signo prima (') se usa para diferenciar posiciones sobre el azúcar de posiciones sobre las bases. Una base unida a la desoxirribosa es un nucleósido (Tabla 1 (b)), mientras que al derivado éster fosfórico de un nucleósido se lo denomina 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 Tabla 1 (c) se muestran las estructuras químicas de los nucleótidos presentes en el ADN, junto a su nomenclatura.

Los nucleótidos 5'-monofosfato (dNMP) son especies químicas que, en medio acuoso, poseen diversos grupos ionizables ubicados tanto en el grupo fosfato, como así también en la base nitrogenada. Por consiguiente, en este tipo de solventes, la carga neta de estas moléculas dependerá del valor de pH del medio. El primer protón que se pierde en los dNMP es el correspondiente al grupo fosfato unido al azúcar, la pérdida de este protón ocurre a un valor de $\text{pH} < 1$ para nucleótidos púricos y a $\text{pH} < 2$ para nucleótidos pirimidínicos. Por lo tanto, este equilibrio no es importante a pH fisiológico. Nótese que los nucleótidos con guanina como base, presentan un equilibrio ácido-base que involucra al

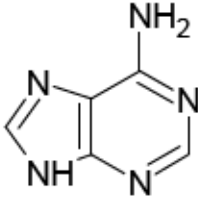
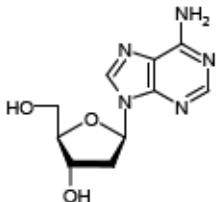
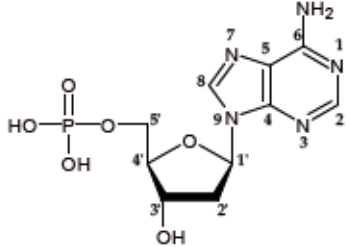
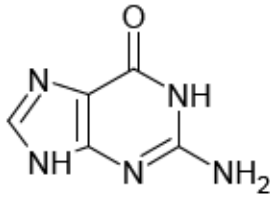
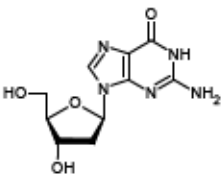
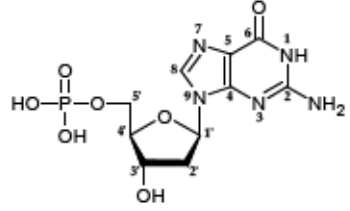
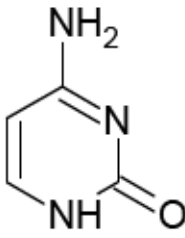
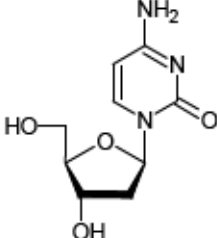
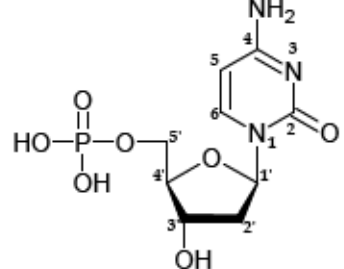
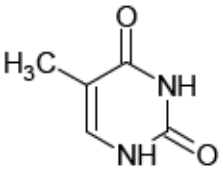
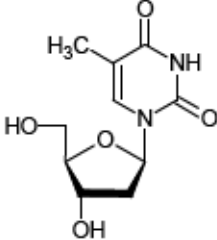
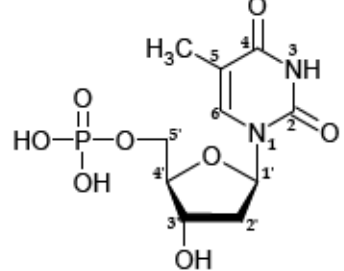
(a) BASE NITROGENADA	(b) 2'-Desoxi NUCLEÓSIDO	(c) dN-5'-monofosfato NUCLEÓTIDO
 <p>Adenina (Ade)</p>	 <p>2'-Desoxiadenosina (dAdo)</p>	 <p>2'-Desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP)</p>
 <p>Guanina (Gua)</p>	 <p>2'-Desoxiguanosina (dGuo)</p>	 <p>2'-Desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP)</p>
 <p>Citosina (Cyt)</p>	 <p>2'-Desoxicitidina (dCyd)</p>	 <p>2'-Desoxicitidina-5'-monofosfato (dCMP)</p>
 <p>Timina (Thy)</p>	 <p>2'-Desoxitimidina (dThd)</p>	 <p>2'-Desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP)</p>

Tabla 1: Estructura química de los componentes del ADN.

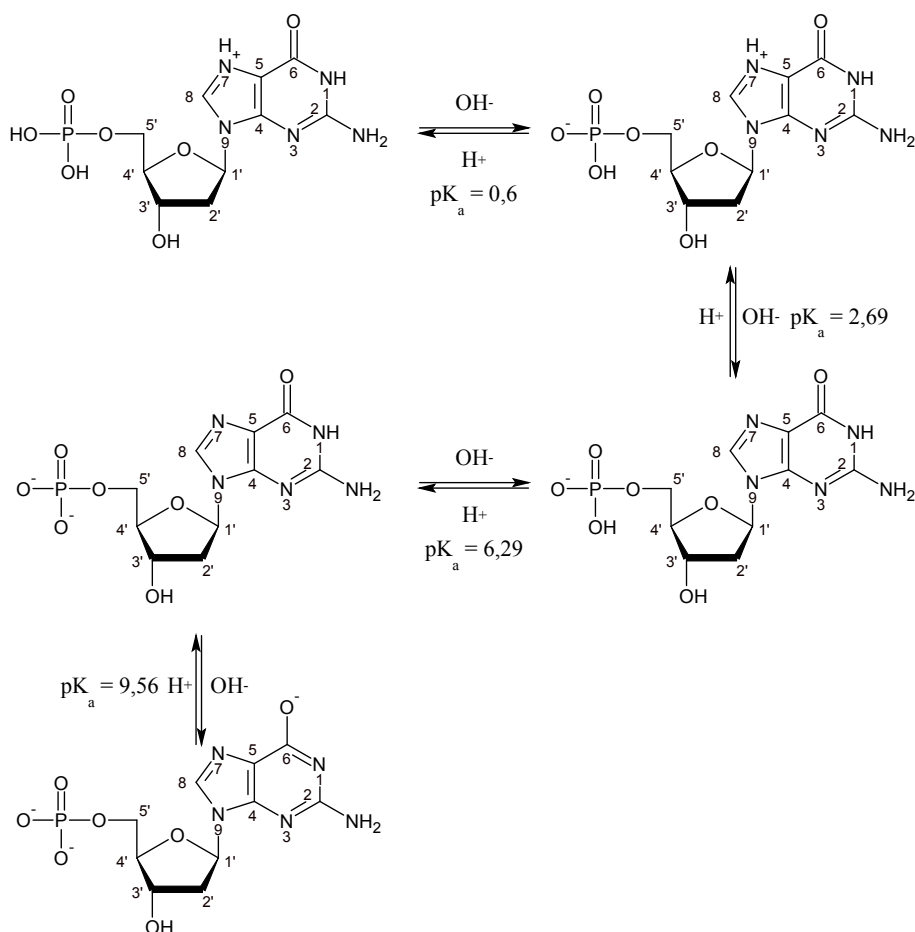


Figura 7: Equilibrios ácido-base que presenta la molécula de dGMP en solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 0 y 14.

átomo de nitrógeno ubicado en la posición 7 (N_7), lo cual implica la protonación de la purina; mientras que el correspondiente a N_1 consiste en una deprotonación con la consiguiente generación de una carga negativa neta localizada en el átomo de oxígeno unido al C_6 . Estos equilibrios se muestran para 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) en la Figura 7. En el caso de AMP sólo se produce la protonación, pero en este caso en N_1 de la base, a diferencia de lo que ocurre en la guanina. Por su parte, los nucleótidos pirimídnicos pierden un protón de la base nitrogenada en el N_3 , a pH alcalino en el caso de timina. La pérdida del segundo protón del grupo fosfato que ocurre a valores de pH > 9 . Por último, la deprotonación del azúcar de los nucleósidos se da a pH > 12 , por lo tanto esta reacción tampoco es relevante a pH fisiológico.

2.2.2 Espectros de absorción

En la Figura 8 se muestran los espectros de absorción registrados para los cuatro nucleótidos (dGMP, 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP), 2'-desoxicitosina 5'-monofosfato (dCMP) y 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP)) en solución acuosa. Como es lógico,

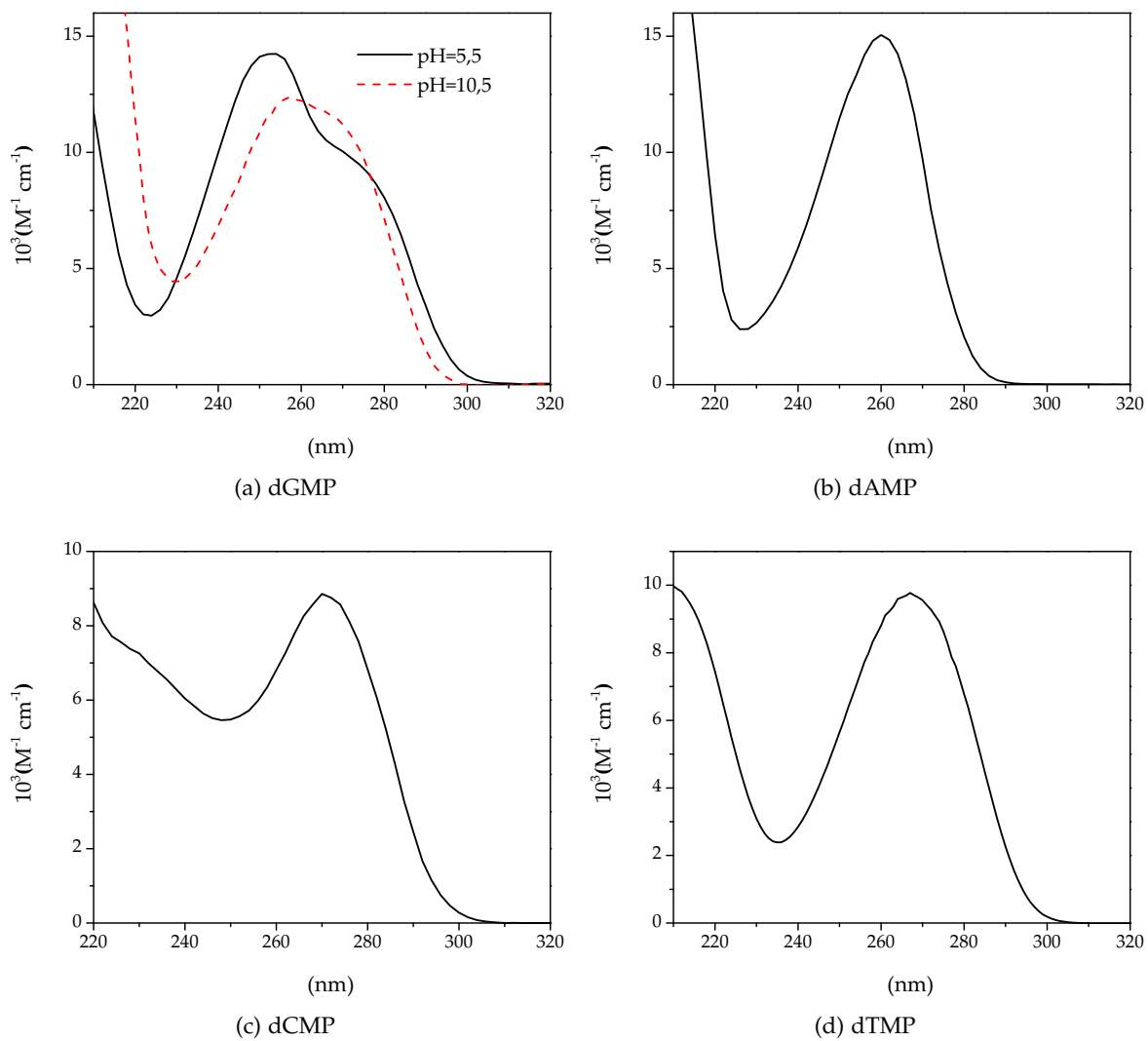


Figura 8: Espectros de absorción de nucleótidos en solución acuosa a pH= 7. Para dGMP los espectros se registraron en dos condiciones de pH (i.e., 5,5 y 10,5).

los equilibrios ácido-base que involucran al grupo fosfato no afectan a los espectros. Sin embargo, si se ioniza la porción cromofórica de la molécula (base nitrogenada), el espectro del nucleótido cambia considerablemente. El único nucleótido que presenta cambios en los espectros de absorción en un rango de pH utilizado cercano a valores fisiológicos, es dGMP. En la Figura 8 (a) se aprecia que el espectro de absorción de la forma aniónica de dGMP es marcadamente diferente al de la correspondiente forma ácida. Por otra parte, los tres nucleótidos restantes no presentan dependencia alguna del espectro de absorción con el pH, dentro del rango de pH entre 5 y 10, dado que solo presentan equilibrios ácido-base que involucran la protonación o desprotonación del grupo fosfato.

2.2.3 *Ácido desoxirribonucleico*

El ADN es un polímero de desoxirribonucleótidos. Esta macromolécula contiene toda la información genética de los seres vivos. La estructura de todas las proteínas de una célula es producto de la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN [13]. Cada molécula de ADN se divide en porciones, los genes, que contienen la información para cada proteína. El ADN está formado por cuatro nucleótidos. La estructura del ADN fue propuesta por Watson y Crick en 1953 [14], sobre la base de datos de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin. Esta macromolécula está compuesta por dos cadenas helicoidales de nucleótidos con giro a la derecha que forman una doble hélice alrededor de un eje central. Los nucleótidos sucesivos están unidos covalentemente por uniones fosfatos. El grupo hidroxilo en 5' de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo en 3' del siguiente nucleótido por un enlace fosfodiéster. Así, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en unidades alternativas de grupos fosfatos y residuos de pentosa, mientras que las bases son grupos laterales unidos al esqueleto en intervalos regulares (Figura 9). 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: guanina se une con citosina, mientras que adenina lo hace con timina. Estas uniones comparten a razón de tres y dos puentes de hidrógeno, respectivamente. La cadena lineal de ADN tiene una polaridad específica, por lo tanto pueden definirse los extremos 5' y 3'. Esta numeración está referida a la ribosa; en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos hay un grupo fosfato libre unido al C₅ de la ribosa, mientras que en el extremo 3' de la secuencia hay un grupo OH unido al C₃ de la ribosa.

2.3 CAUSAS Y CONSECUENCIAS DEL DAÑO AL ADN POR RADIACIÓN

2.3.1 *Implicancias biológicas*

La radiación electromagnética, a través de diversos mecanismos que se explicarán en las siguientes secciones, produce modificaciones químicas en la molécula de ADN; las cuales, a su vez, pueden generar una serie de alteraciones a nivel celular [15]. Si el daño

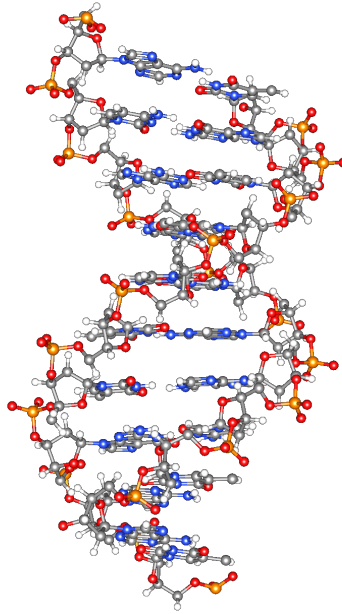


Figura 9: Representación de la estructura química del ADN.

en el material genético de una célula es importante, y no puede ser revertido por los mecanismos de reparación celular, dicha célula indefectiblemente morirá. En términos generales, la muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: apoptosis o necrosis. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado que evita el derrame del contenido de la célula y, por lo tanto, no daña el entorno. Por otro lado, la necrosis es la muerte patológica de una célula o tejido. Si el daño en el material genético es menor al necesario para provocar la muerte, las consecuencias para la célula dependerán del tipo y magnitud de las lesiones.

Antes de que una célula se divida, su material genético debe duplicarse. Si el ADN que se utilizará como molde posee alguna base modificada químicamente (por ejemplo, por exposición a radiación UV) es posible que durante la replicación del ADN se genere una mutación, a pesar de los múltiples sistemas de reparación que poseen las células. Una mutación es un cambio permanente en la secuencia de bases. Las mutaciones pueden ir desde la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución), a la adición o la eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones de inserción o deleción). Las mutaciones pueden tener un efecto insignificante en la función de un gen (silenciosas), conferir alguna ventaja a la célula o ser nocivas. Las mutaciones favorables que confieren alguna ventaja a la célula en la que tienen lugar son raras, pero la frecuencia es suficiente para conferir la variación necesaria hacia la selección natural y, por lo tanto, la evolución. No obstante, la mayoría de las mutaciones son desfavorables para las células [13].

La radiación UV produce mutaciones y a consecuencia de las mismas genera procesos neoplásicos en mamíferos. La carcinogénesis por radiación UV a menudo involucra la inactivación de un gen supresor de tumores (por ejemplo, el gen *p53*) o la sobreexpresión de protooncogenes (entre ellos, el gen *ras*). La función de la proteína *p53* es proteger a la

célula del estrés producido por la irradiación UV u otros factores, o producir la apoptosis cuando el daño sobre el ADN es severo. Por otro lado, se han detectado formas mutantes de los oncogenes ras y en el gen *p53*, tanto en cánceres de piel en humanos, en zonas expuestas a radiación solar, como en cánceres inducidos por UV-B en ratones [16].

Por otro lado, los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN son más eficientes frente a lesiones originadas por radiación UV-B que UV-A [17]. En respuesta a la exposición solar, la piel por un lado se pigmenta (se broncea), y por otro incrementa su espesor. Estos mecanismos le confieren cierta protección a la piel frente a nuevas exposiciones a la radiación UV [18]. Es por ello que personas de piel muy clara, que no se broncean apreciablemente, tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer de piel. En el ser humano, los efectos biológicos provocados por la exposición solar están determinados por la naturaleza física de los fotones solares incidentes y la estructura química de los cromóforos presentes en la piel [19].

2.3.2 Mecanismos de daño al ADN por radiación electromagnética

Se han realizado numerosos estudios sobre la dependencia de diversos efectos derivados del daño al ADN en función de la longitud de onda (λ) de la radiación incidente. Por ejemplo, algunos estudios con animales de laboratorio muestran que la luz UV-B es más efectiva en producir cáncer de piel que la UV-A [20]. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado en las últimas décadas que la radiación UV-A también es mutagénica y carcinogénica [21].

En estudios realizados por Coohill y colaboradores se determinaron los espectros de acción, es decir, curvas de diferentes respuestas celulares inducidas por la radiación incidente en función de λ , para evaluar el efecto producido por las distintas λ sobre el ADN, se analizó la capacidad de inducir mutaciones, producir muerte celular, producir cortes en el ADN y también entrecruzamiento (o *crosslinking*) de ADN con proteínas en células humanas P3. Allí se determinó que el espectro de acción para inducción de mutación y tumorigénesis no coincide con el espectro de absorción de ADN en la región UV-A (Figura 10). Este hecho se observó en otros estudios similares realizados sobre otros sistemas biológicos [20].

La radiación absorbida por las bases nitrogenadas del ADN (hasta 320 nm aproximadamente) (Sección 2.2.2) produce la respuesta máxima comparada con otras λ , tanto para letalidad, mutagenicidad y *crosslinking*, como para la ruptura del ADN (Figura 10). Más aún, los máximos de los espectros de acción se corresponden bastante bien con el máximo del espectro de absorción del ADN. Por consiguiente, el efecto de la radiación UV-B y UV-C se explica fácilmente teniendo en cuenta que el ADN absorbe este tipo de radiación y, consecuentemente, sufre fotólisis directa. Sin embargo, λ mayores a 320 nm (radiación UV-A y visible) produjeron las mismas respuestas, aunque con menor eficiencia. Incluso, tanto para mutagenicidad como para ruptura del ADN se observan máximos secundarios en la región UV-A.

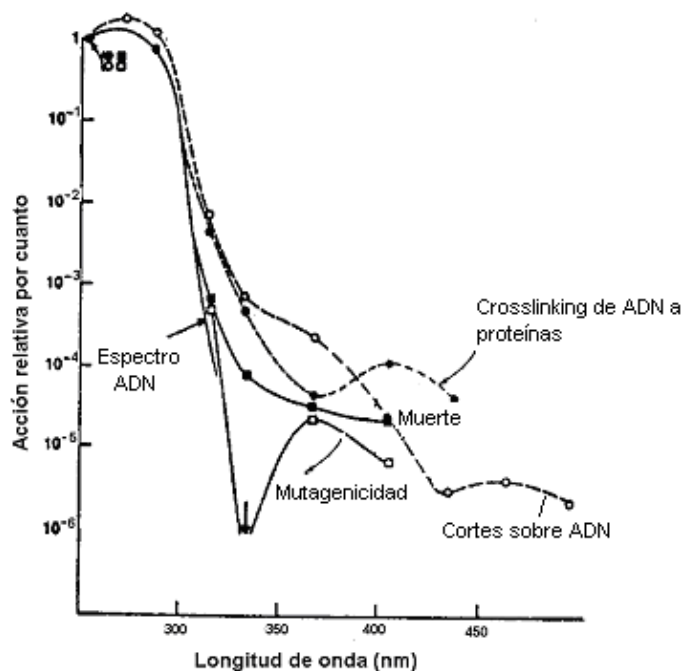


Figura 10: Espectros de acción donde se monitorea letalidad, mutagenicidad y otros efectos de la radiación sobre células. Con fines comparativos todos los espectros se normalizaron a 254 nm y se agregó el espectro de absorción del ADN (figura extraída de la referencia).

Por consiguiente, del análisis de estos experimentos se deduce que existen dos tipos de mecanismos por los cuales el ADN puede ser dañado. Por un lado, la absorción de radiación por las bases genera estados excitados que vuelven reactiva a la molécula de ADN, lo que produce su modificación o alteración química. A este tipo de proceso se lo denomina genéricamente daño directo. Por otro lado, la absorción de la radiación incidente por parte de otro cromóforo generará especies químicas que reaccionan con el ADN modificándolo. En este caso se está en presencia de un proceso fotosensibilizado (Sección 1.3) y se habla de daño indirecto al ADN.

2.3.3 Daño directo al ADN

Los estados excitados generados por absorción directa de radiación producen distintos tipos de reacciones, siendo las más comunes las que involucran a bases pirimidínicas. Las bases púricas también sufren reacciones fotoquímicas cuando absorben radiación aunque en menor medida [15]. Los dos tipos de fotoproductos principales que se generan por irradiación UV-B del ADN, son los denominados, dímeros ciclobutil pirimidinas y los aductos pirimidina(6,4)pirimidona o, simplemente, 6,4-fotoaductos.

Los dímeros ciclobutil pirimidinas constituyen los fotoproductos más abundantes. Se forman por cicloadición [2+2] del doble enlace C(5)-C(6) de bases de pirimidina adyacentes (Figura 11). Pueden encontrarse dímeros T<>T, C<>T, T<>C y C<>C. Si la radiación incidente es de tipo UV-C, el daño puede revertirse por un proceso de monomerización,

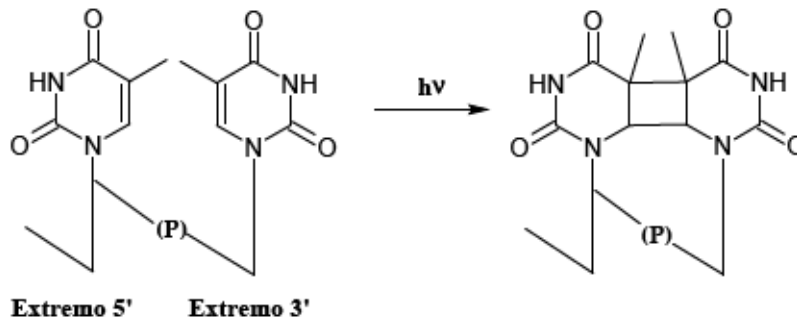


Figura 11: Formación de dímeros de timina ciclobutano (T\leftrightarrowT)

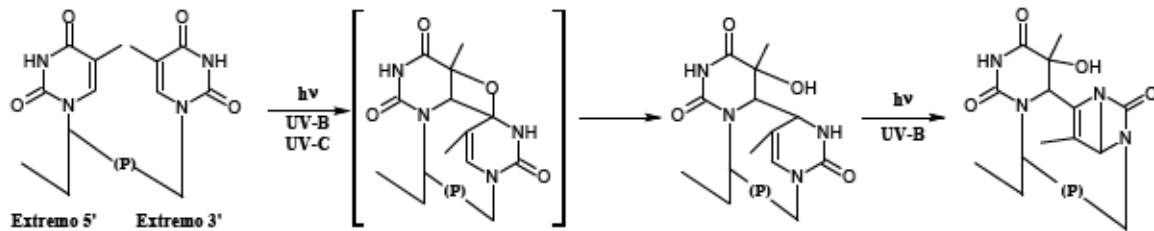


Figura 12: Formación y fotoisomerización del fotoproducto (6,4) de la timina.

debido a que los dímeros absorben radiación en esa región del espectro electromagnético. Sin embargo, pueden sufrir también procesos de deaminación, generando así un nuevo producto. Se cree que la formación de dímeros ciclobutil pirimidinas ocurre por fotoexcitación de una pirimidina a un estado singlete, seguido de entrecruzamiento intersistema y de la posterior reacción de ese triplete con una segunda molécula adyacente en estado fundamental [22].

En contraste, la formación de aductos pirimidina(6,4)pirimidona involucra reacciones de estados singletes excitados. Son la segunda clase de fotoproductos de pirimidinas más abundantes. Este proceso, a diferencia del anterior, no es reversible. Estos fotoproductos provienen de una cicloadición [2+2] entre el doble enlace del C(5)-C(6) de la pirimidina 5' terminal y del grupo carbonilo C(4) de la timina 3' terminal. Así se genera un oxetano inestable (Figura 12). Si la base 3' es una citosina, se genera un intermediario azetidina a través de una ciclo adición de la función 4-imino de la última base pirimidina. El oxetano o la azetidina pueden reconvertirse espontáneamente dando lugar al aducto pirimidina(6,4)pirimidona. Dado que estos aductos absorben aproximadamente a 320 nm, por irradiación UV-B, fotoisomerizan generando un Isómero de valencia Dewar (Figura 12) [15].

Las bases púricas por absorción de radiación UV-B también pueden generar dímeros, entre ellos, dímeros de adenina [23] y aductos adenina-timina [24]. Por otro lado, la oxidación de guanina por exposición de ADN aislado a UV-B o UV-C también es posible [25].

Las células tienen dos mecanismos principales para defenderse de los dímeros que se producen en el ADN. Uno de ellos consiste en la acción de un elaborado conjunto de

enzimas que efectúan la denominada "reparación por corte de nucleótido". Estas enzimas cortan la cadena dañada en la zona donde se encuentran los dímeros de pirimidina, remueven los nucleótidos y vuelven a sintetizar una cadena nueva. El otro mecanismo se denomina fotorreactivación [26], el cual es realizado por un tipo de enzimas denominadas fotoliasas. Se conocen dos clases de fotoliasas, unas reparan dímeros de pirimidina mientras que otras reparan los fotoproductos (6,4). Las fotoliasas son activadas por la luz azul (350-450 nm) que es absorbida por sus cromóforos. Estas enzimas contienen dos cromóforos, uno de los cuales es siempre flavina adenina dinucleótido (FAD) y el otro puede ser un derivado pterínico (meteniltetrahidrofolato o MTHF) o una deazarriboflavina [26].

2.4 DAÑO AL ADN MEDIANTE PROCESOS FOTOSENSIBILIZADOS

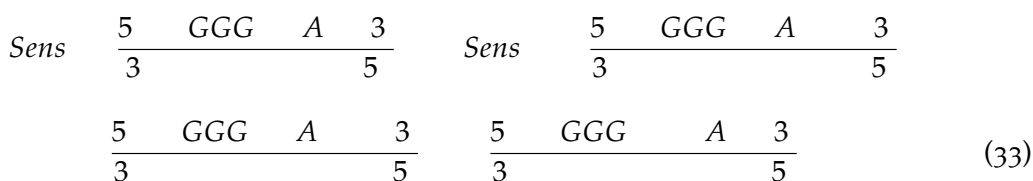
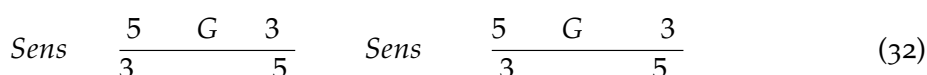
Como se discutió anteriormente, la radiación no sólo modifica al ADN generando estados excitados de sus bases por absorción directa, sino también a través de procesos fotosensibilizados. Debido a que esta tesis trata sobre fotosensibilización, a los los procesos de este tipo que afectan al ADN se les dedicará esta sección y se describirán con cierto detalle. Los procesos implicados son variados y muchas veces un sensibilizador actúa simultáneamente a través de varios mecanismos. Pueden distinguirse tres grandes grupos de mecanismos que se describirán a continuación.

2.4.1 *Transferencia de energía de un sensibilizador al ADN*

La radiación UV-A induce la formación de dímeros ciclobutil pirimidina en ADN, aunque con menor eficiencia que la UV-B y por un mecanismo diferente. La fotoexcitación UV-A de un fotosensibilizador apropiado (por ejemplo, benzofenona) [27] puede formar estados excitados capaces de participar en reacciones de transferencia de energía triplete-triplete con ciertas bases del ADN, produciendo dímeros de ciclobutil pirimidina. Para que este proceso de transferencia de energía tenga lugar, el fotosensibilizador debe estar localizado suficientemente próximo al ADN. En distintos experimentos realizados con bacterias y células eucariotas (particularmente en células de piel) [19], bajo irradiación UV-A, y sin el agregado de fotosensibilizadores exógenos se encontró que los dímeros ciclobutil pirimidina son los productos predominantes del daño fotoinducido por radiación UV-A [17]. Sin embargo, en experimentos realizados con levaduras se encontró que el mecanismo de transferencia de energía no es el mayoritario. Por el contrario, se encontró una mayor proporción de productos de fotooxidación (ver más adelante). Estos resultados indican que el tipo de célula y su entorno juegan un rol muy importante en el tipo de proceso fotoinducido que afecta al ADN.

2.4.2 Oxidaciones fotosensibilizadas Tipo I

Las bases son los sustratos preferenciales dentro del ADN para este tipo de reacciones (Sección 1.4). Entre ellas, la guanina, la cual posee el menor potencial de ionización [28, 29] es la más reactiva comparada a adenina, timina y citosina [15]. El radical catión 2'-desoxiguanosina ($dGuo^+$) generado en el ADN en presencia de un sensibilizador que actúa mediante un mecanismo Tipo I, puede provenir de la abstracción inicial de un electrón de un residuo de guanina o a través de una transferencia de huecos (*hole transfer*) desde otra base relativamente lejana. La transferencia de huecos ocurre a través del ADN de doble cadena, principalmente desde cationes radicales adenina hacia la guanina (Reacciones 31, 32 y 33) [30, 31][32]. Por lo tanto, la cantidad de radical catión $dGuo^+$ producido es mayor que el generado por transferencia de un electrón al sensibilizador y muchísimo mayor a los generados en otras bases.



El radical catión $dGuo^+$ una vez formado puede sufrir hidratación o deprotonación (Figura 13). La hidratación del radical catión $dGuo^+$, da lugar al radical 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanil. Este radical puede participar de dos reacciones competitivas, ser reducido a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapydGuo) u oxidado (por O_2) dando lugar a la formación de 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Por otro lado, si el radical catión $dGuo^+$ pierde un protón, genera un radical neutro $dGuo^{\cdot}$. Esta reacción ocurre rápidamente en soluciones acuosas neutras (con una constante de velocidad de $2 \cdot 10^6 s^{-1}$) dado que el pK_a del radical catión guanina libre G^+ , generado a partir de dGuo o de dGMP, es 3,9 [33]. La reactividad entre $dGuo^{\cdot}$ y el O_2 es muy baja ($k = 10^3 M^{-1} s^{-1}$), y los productos de reacción aún no han sido caracterizados [34]. Mientras que la reactividad entre $dGuo^{\cdot}$ y el O_2 es mucho mayor ($k = 1,3 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$), generando como productos 2,2-diamino-5-[2-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)amino]-5(2H)-oxazolona (oxazolona, dZ) a partir de la hidrólisis de su precursor 2-amino-5-[2-desoxi- β -D-eritropentofuranosil)amino]-4H-imidazol-4-ona (imidazolona, dIz) [35][36]. Se cree que la baja reactividad de $dGuo^{\cdot}$ con el O_2 se debe a su estructura altamente resonante [37].

Cuando se provoca la ionización de Gua a través de un mecanismo Tipo I, la distribución de productos varía de acuerdo al sustrato utilizado (base libre o fragmento de ADN doble cadena). Cuando se irradia la base libre o fragmentos de ADN de cadena

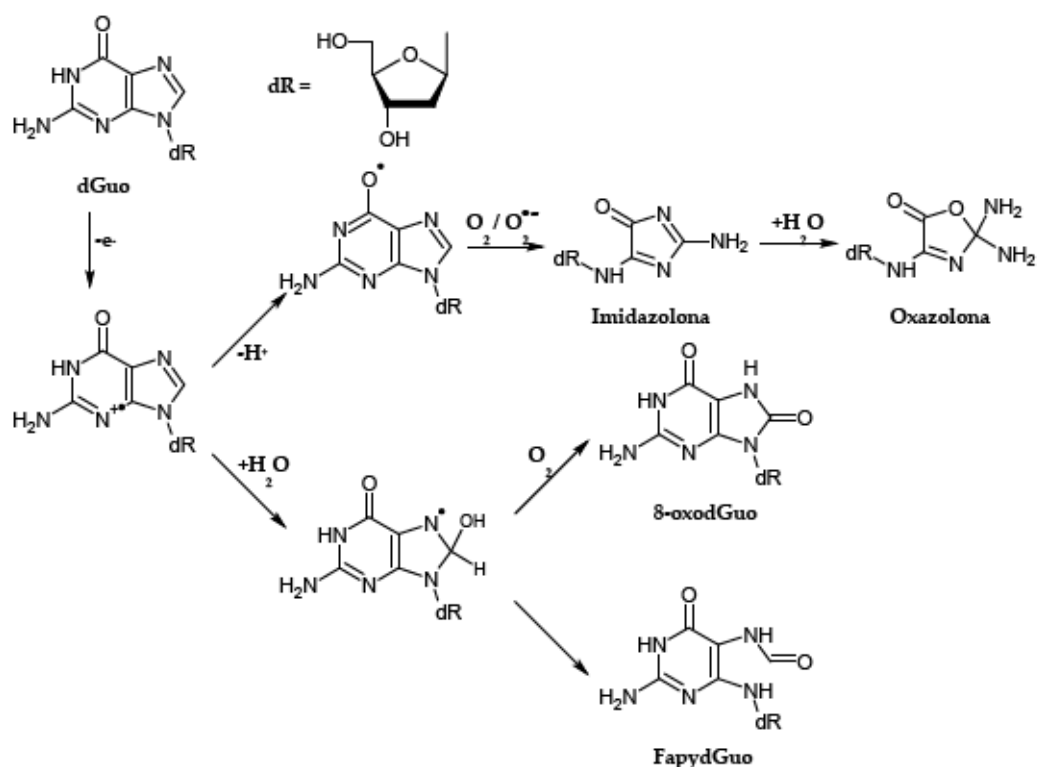


Figura 13: Productos de degradación de 2'-desoxiguanosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

simple, la producción de 8-oxodGuo es minoritaria [38]. Debido al pK_a del catión radical guanina, a pH neutro, la vía predominante es la deprotonación y en consecuencia no se detecta 8-oxodGuo. Por otro lado, en el ADN doble cadena, la hidratación del catión radical guanina es el proceso predominante, ya que se ve estabilizado por apilamiento y apareamiento de bases, generando mayoritariamente 8-oxodGuo y en menor proporción FapydGuo.

La 8-oxodGuo es un marcador bioquímico de estrés oxidativo que puede ser generado por distintos agentes, incluyendo peroxinitrito, radical $OH\cdot$ y 1O_2 . Es un agente genotóxico y si no es reparado conduce a mutaciones [39]. La 8-oxodGuo tiene un potencial de oxidación menor que dGuo (aproximadamente 0,5 eV menor) [40] y por lo tanto, es susceptible de sufrir fotooxidaciones Tipo I, generando diversos productos de los cuales el principal a pH < 7 es la guanidinodihidantoina. (Figura 14).

La adenina a pesar de tener un potencial de ionización mayor que la guanina, también puede ser oxidada a través de un mecanismo Tipo I (Figura 15). El radical cation 2'-desoxiadenosina ($dAdo^{\cdot+}$) es preferentemente deprotonado en el grupo amino exocíclico generando, en soluciones acuosas aireadas, el radical neutro 2'-desoxiadenosina ($dAdo(-H)\cdot$) [41]. Aunque, en menor medida, la hidratación del radical cation $dAdo^{\cdot+}$ también ocurre, produciendo el radical 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosil. Este radical es precursor de 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapydAdo) bajo condiciones reductoras y de 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina (8-oxodAdo) en presencia de O_2 [15, 42].

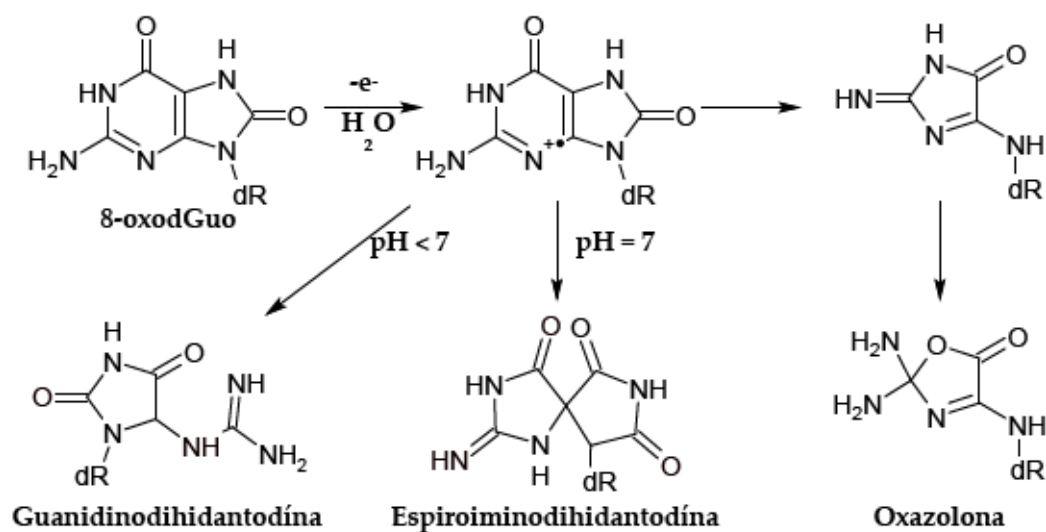


Figura 14: Productos de degradación de 8-oxodGuo mediante mecanismo Tipo I.

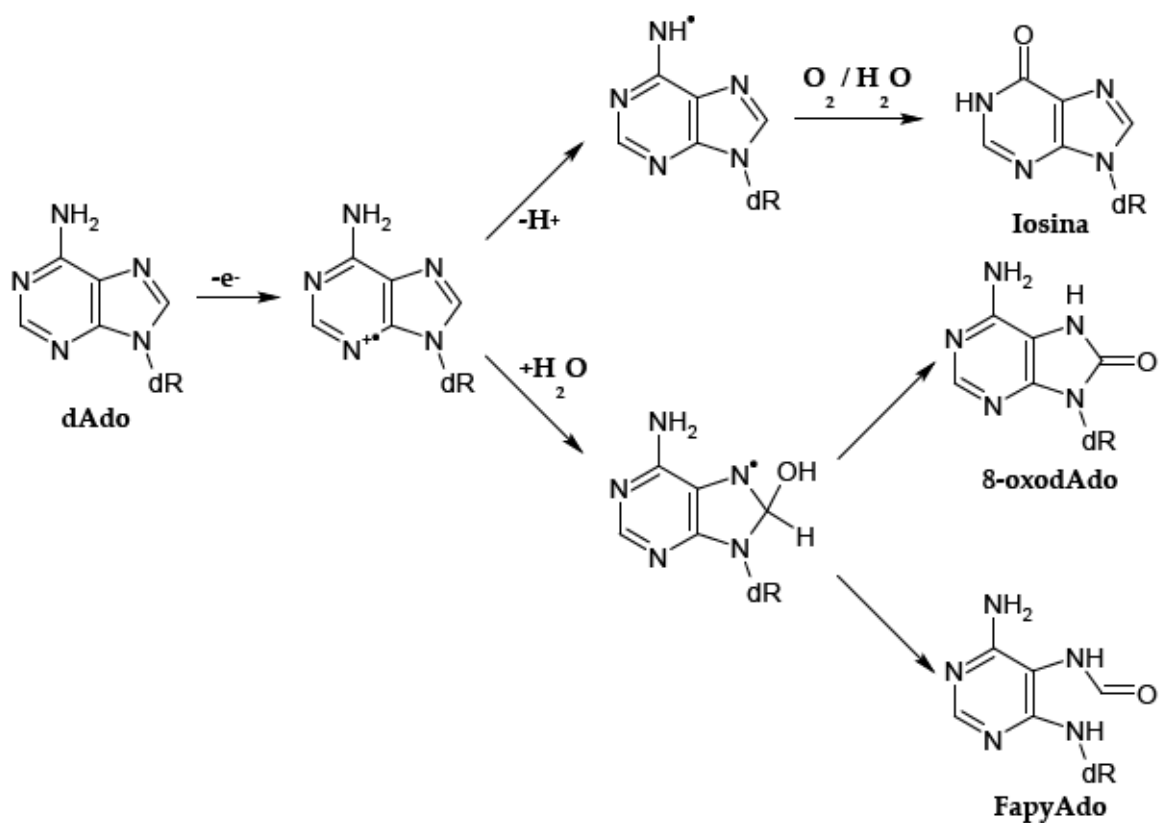


Figura 15: Productos de degradación de 2'-desoxiadenosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

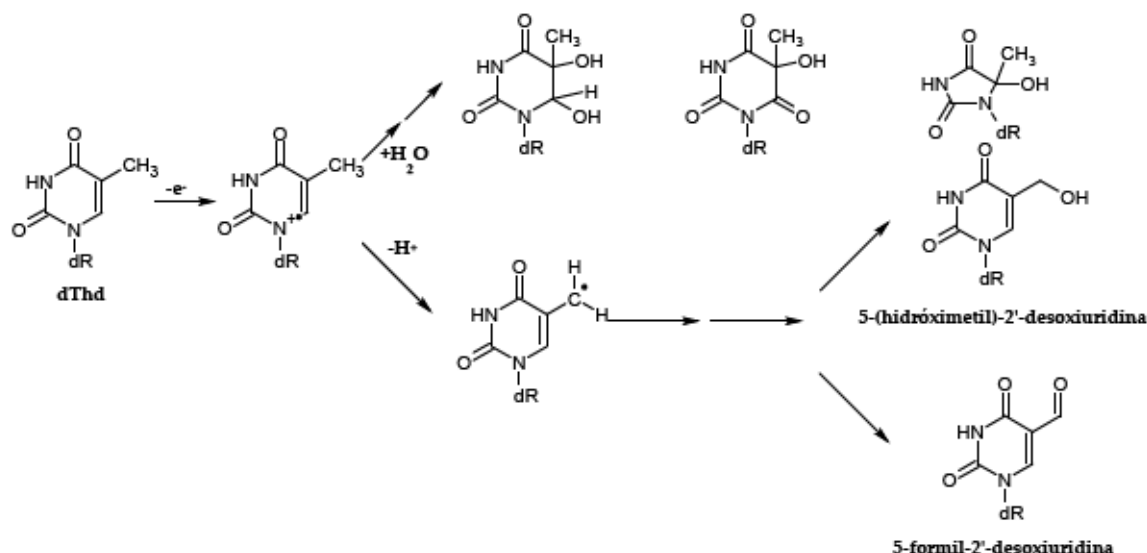


Figura 16: Productos de degradación de 2'-desoxitimidina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

En el caso de las bases pirimídicas, las cuales son mucho menos susceptibles a la oxidación que las púricas, el principal camino de descomposición del radical catión pirimidina es la hidratación en posición C(6), tanto para timina como para citosina. Sin embargo, la deprotonación también es posible generando el radical neutro $dThd(-H)^{\bullet}$, que en reacciones posteriores genera dos productos de oxidación, 5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina (HMdUrd) y 5-formil-2'-desoxiuridina (FordUrd) (Figura 16) [15, 42].

2.4.3 Oxidaciones fotosensibilizadas Tipo II

Como se explicó en la Sección 1.4, en las reacciones de fotooxidación Tipo II hay una interacción directa entre el sensibilizador en el estado excitado y el oxígeno, que por transferencia de energía genera 1O_2 , o bien por transferencia electrónica puede generar $O_2^{\bullet-}$, siendo la vía del 1O_2 la más importante en sistemas biológicos. La guanina es el único componente del ADN que reacciona significativamente con 1O_2 (a pH neutro) [43]. Se cree que la oxidación de guanina por 1O_2 involucra la formación de un endoperóxido inestable como resultado de una cicloadición [4+2] Diels Alder [44]. En un principio se consideró a los dos diastómeros ($4R^*$ y $4S^*$) de 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (4-OH-8-oxo-dGuo) como los productos estables de descomposición de los endoperóxidos [45]. Posteriormente, se demostró que esos diastómeros se reordenan para dar nucleósidos de espiroiminodihidantoina (Sp) [46]. Sin embargo, esos productos no fueron detectados en la reacción del 1O_2 con el ADN doble cadena. En esta reacción se encontró 8-oxodGuo como producto mayoritario. La formación de 8-oxodGuo se debería a un reordenamiento del 4,8-endoperóxido en 8-hidroperóxil-2'-desoxiguanosina, seguido de una reducción (Figura 17).

En la Figura 18 se muestran los principales productos de oxidación de la 8-oxodGuo

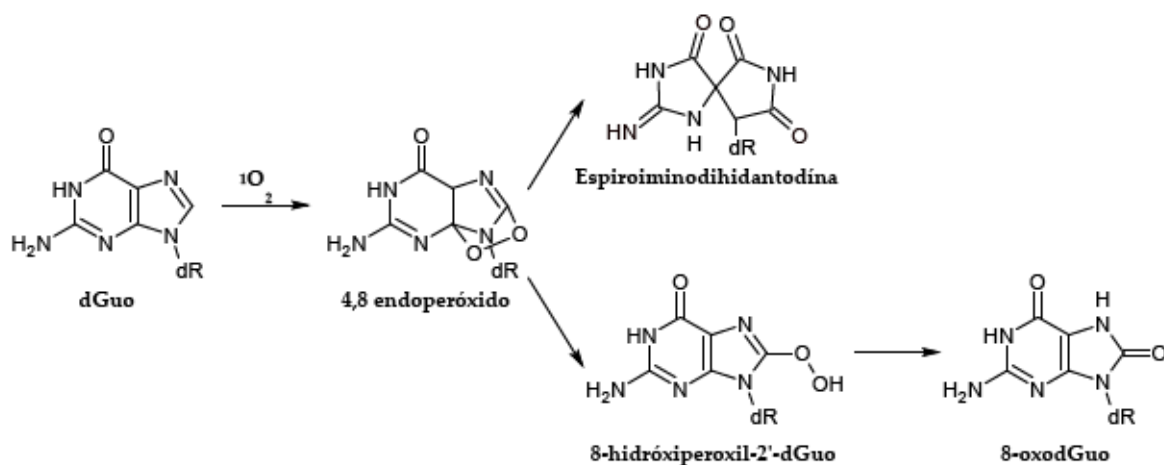


Figura 17: Productos de degradación de 2'-deoxiguanosina mediante mecanismo Tipo II.

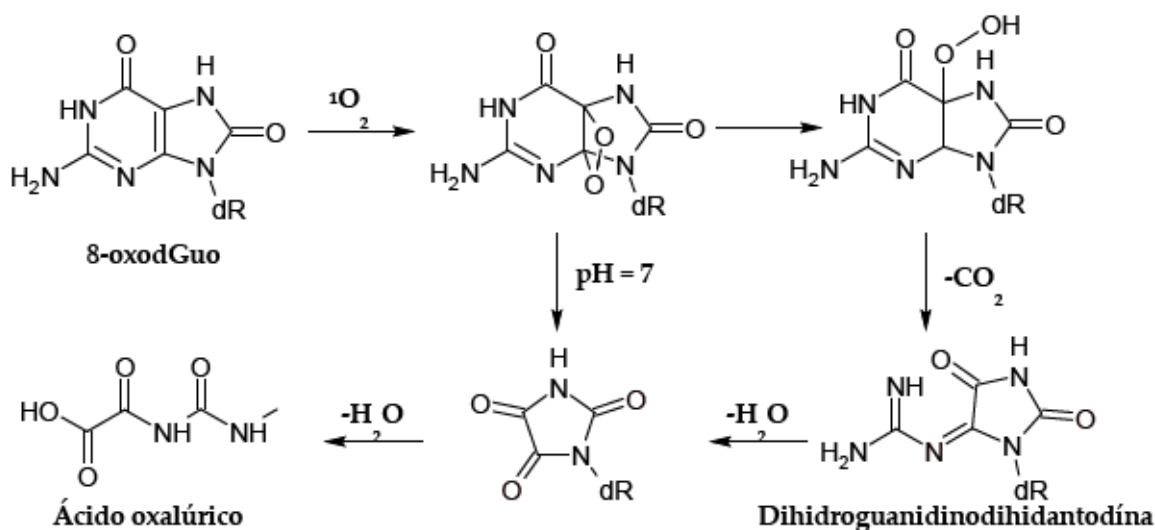


Figura 18: Productos de degradación de 8-oxodGuo mediante mecanismo Tipo II.

mediante un mecanismo Tipo II. La 8-oxodGuo tiene una constante de reacción con 1O_2 respecto a dGuo dos órdenes de magnitud mayor [47]. Por lo tanto, es un excelente sustrato tanto para reacciones de fotooxidación Tipo II dando como producto dihidroguanidinodihidantodina [48].

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos presentes en la naturaleza que se encuentran en muy pequeñas cantidades en los seres vivos, desempeñando en los mamíferos diversas funciones esenciales. Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se llevaron a cabo en el año 1889. En estos trabajos, se manifiestan los primeros intentos por aislar algunos pigmentos de diferentes clases de mariposas [49, 50, 51]. Más tarde, se elucidó la estructura molecular de estos pigmentos, planteándolos como derivados del heterociclo pirazina [2,3-d] pirimidina [52, 53] al que, posteriormente, se lo denominó pteridina [54].

3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Desde el punto de vista estructural, las pteridinas son moléculas que poseen un doble anillo de diez átomos, cuatro de los cuales son átomos de nitrógeno. Por tal motivo, pueden definirse como tetra-azo-naftalenos. En la [Figura 19](#) se observa la estructura heterocíclica común a todas las pteridinas con la correspondiente numeración. El anillo I corresponde a la estructura de la pirimidina, mientras que el anillo II a la pirazina. Asimismo, en la [Figura 19](#) se muestran las dos estructuras químicas de las cuales se derivan las “pteridinas naturales” presentes en los seres vivos: 2-aminopteridin-4(3H)-ona o pterina (**Ptr**) y pteridin-2,4(1H,3H)-diona o lumazina (**Lum**).

Los derivados pterínicos se encuentran normalmente sustituidos en la posición 6 del anillo de pirazina. Según la estructura de este sustituyente las pterinas pueden dividirse en dos grupos:

- pterinas **no conjugadas**, cuyos sustituyentes poseen una corta cadena hidrocarbonada o un solo átomo de carbono,
- pterinas **conjugadas**, cuyos sustituyentes son de mayor peso molecular e incluyen una molécula de ácido paraaminobezóico (**PABA**); un ejemplo es el ácido fólico (**PteGlu**) que además de PABA posee una o más moléculas de ácido glutámico unidas por una unión peptídica.

En la naturaleza las pterinas pueden encontrarse en diferentes estados de oxidación, donde el anillo pirazina es el que está parcial o totalmente reducido. Las pterinas reducidas más comúnmente encontradas en sistemas biológicos son las 7,8-dihidropterinas y las 5,6,7,8-tetrahidropterinas ([Figura 20](#)).

En este trabajo de tesis se estudiaron las propiedades fotosensibilizadoras de cuatro pterinas oxidadas, biopterina (**Bip**), 6-formilpterina (**Fop**), 6-caboxipterina (**Cap**) y **Ptr** ([Tabla 2](#)).

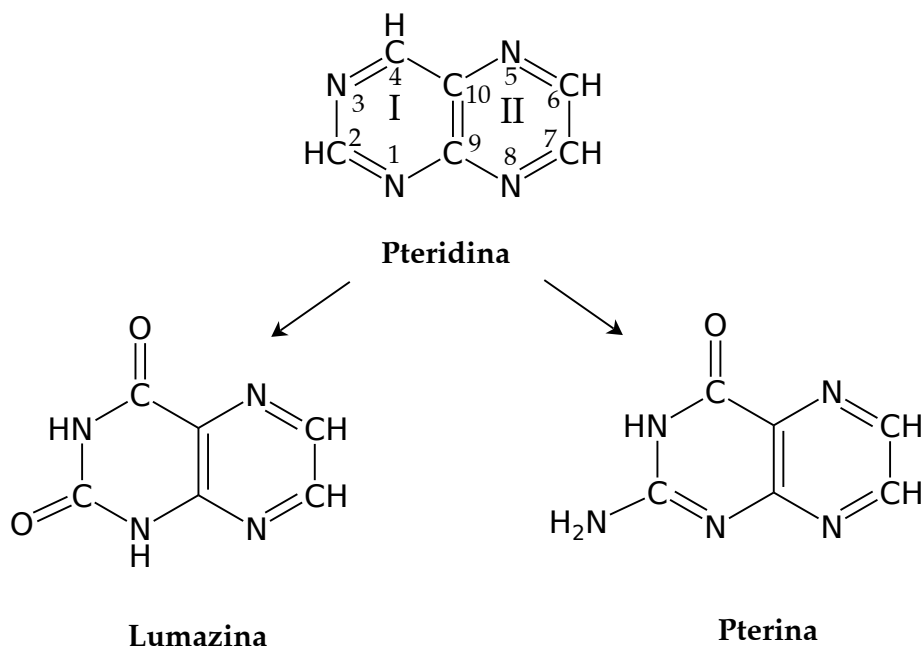


Figura 19: Estructura química básica de pteridinas. Anillo de pirimidina (I) y pirazina (II). Estructura química de pteridinas naturales: lumazinas y pterinas.

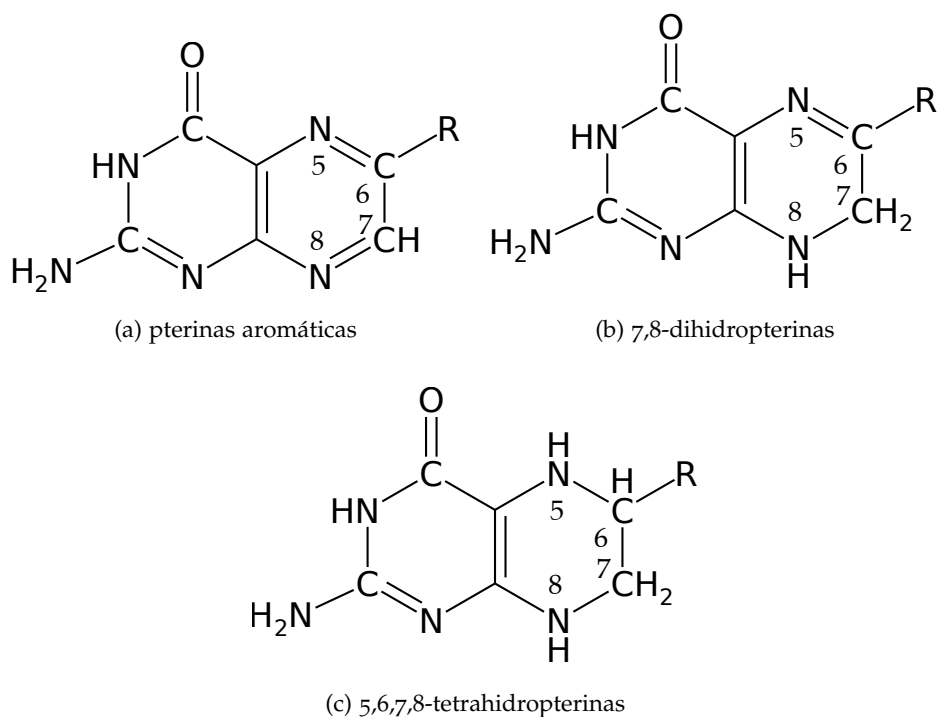


Figura 20: Estructura química general de pterinas aromáticas, 7,8-dihidropterinas y 5,6,7,8-tetrahidropterinas.

R	PTERINAS OXIDADAS		PTERINAS REDUCIDAS	
CHOH ₂ CH ₃	biopterina	(Bip)	7,8-dihidrobiopterina	(H ₂ Bip)
CHO	6-formilpterina	(Fop)	6-formil-7,8-dihidropterina	(H ₂ Fop)
COOH	6-carboxipterina	(Cap)	-	
H	pterina	(Ptr)	-	
CHOH ₂ CH ₂ OH	neopterina	(Nep)	7,8-dihidroneopterina	(H ₂ Nep)
CH ₂ OH	6-hidroximetilpterina	(Hmp)	6-hidroximetil-7,8-dihidropterina	(H ₂ Hmp)
OH	xantopterina	(Xap)	7,8-dihidroxantopterina	(H ₂ Xap)
CO CHOH CH ₃	-		sepiapterina	(Sep)

Tabla 2: Estructura química y nomenclatura de pterinas aromáticas y 7,8-dihidropterinas estudiadas.

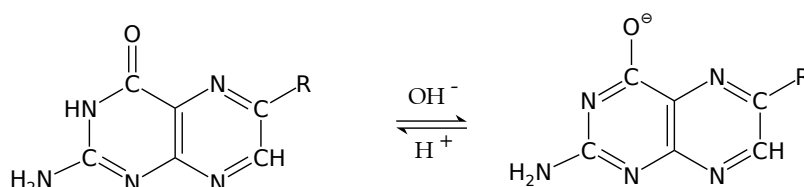


Figura 21: Equilibrio ácido base de pterinas en solución acuosa para valores de pH entre 4 y 11.

También se estudiaron las propiedades fotofísicas de algunos dihidroderivados, por ejemplo, 7,8-dihidrobiopterina (*H₂Bip*), 6-formil-7,8-dihidropterina (*H₂Fop*), 7,8-dihidroneopterina (*H₂Nep*), 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina (*H₂Hmp*), y sepiapterina (*Sep*); cuya estructura se presentan en la Tabla 2.

3.2 PROPIEDADES ÁCIDO-BASE Y EQUILIBRIO TAUTOMÉRICO

En la Figura 21 se muestra el equilibrio ácido-base más importante de las pterinas en solución acuosa, considerando los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida (amida) de este equilibrio corresponde a la forma neutra, mientras que la forma alcalina (fenolato) posee una carga negativa. Este equilibrio ya ha sido estudiado en solución acuosa, habiéndose publicado valores de pK_a de alrededor de 8 para las pterinas oxidadas [55, 56, 57, 58, 59], y de alrededor de 10 para las dihidropterinas [60, 61, 62, 63]. Este comportamiento general está afectado por la presencia de sustituyentes adicionales en el doble anillo pterínico, los cuales modifican, en mayor o menor medida, los valores de pK_a y la carga neta de las moléculas. Los valores de pK_a de los compuestos utilizados en este trabajo de tesis y otros se presentan en la Tabla 3.

Existen otros equilibrios ácido-base en los que participan otros grupos funcionales de la estructura pterínica, como son los nitrógenos anulares o el grupo amino de la posi-

COMPUESTO	pK_a	REF.	COMPUESTO	pK_a	REF.
Bip	8,1	[57]	H ₂ Bip	10,85	[62]
Fop	7,3	[59]	H ₂ Fop	9,68	[64]
Cap	7,9	[65]	H ₂ Nep	10,62	[64]
Ptr	7,9	[56]			
Hmp	8,1	[66]			
Nep	8,0	[57]			

Tabla 3: Valores de pK_a para el equilibrio amida-fenolato de diferentes pterinas aromáticas y 7,8-dihidropterinas.

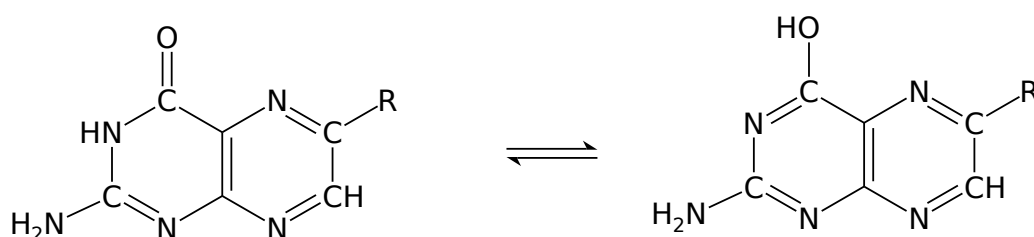


Figura 22: Esquema del equilibrio tautomérico lactama-lactima

ción 2 del anillo. A medida que disminuye el pH, estos grupos comienzan a protonarse, apareciendo las correspondientes formas catiónicas con carga +1, +2 y +3. Todos estos equilibrios presentan valores de pK_a inferiores a 4 [55].

En soluciones acuosas a $\text{pH} < pK_a$ estos compuestos se encuentran en su forma protonada. La forma neutra de las pterinas presenta un equilibrio tautomérico (Figura 22) que consiste en una transferencia de protón muy rápida, desde el nitrógeno en posición 3 (lactama) al oxígeno en posición 4 (lactima). En solución acuosa este equilibrio se encuentra desplazado hacia la forma ceto o lactama.

3.3 ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Las características espectrales de los derivados pterínicos dependen de diferentes factores, tales como el estado de oxidación del anillo pirazina, la naturaleza química de los sustituyentes unidos al doble anillo pterínico y las condiciones de pH del medio. El espectro de absorción de la mayoría de la pterinas aromáticas no conjugadas presenta dos bandas principales de absorción [67, 68]. La banda correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_2$ de la forma ácida presenta un máximo de absorción a 280 nm aproximadamente, mientras que para la forma alcalina se encuentra en 255 nm. La intensidad de ambas transiciones es menor para la forma ácida que para la alcalina. Por otra parte, la banda de menor energía correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ de la forma ácida presenta un corrimiento hacia

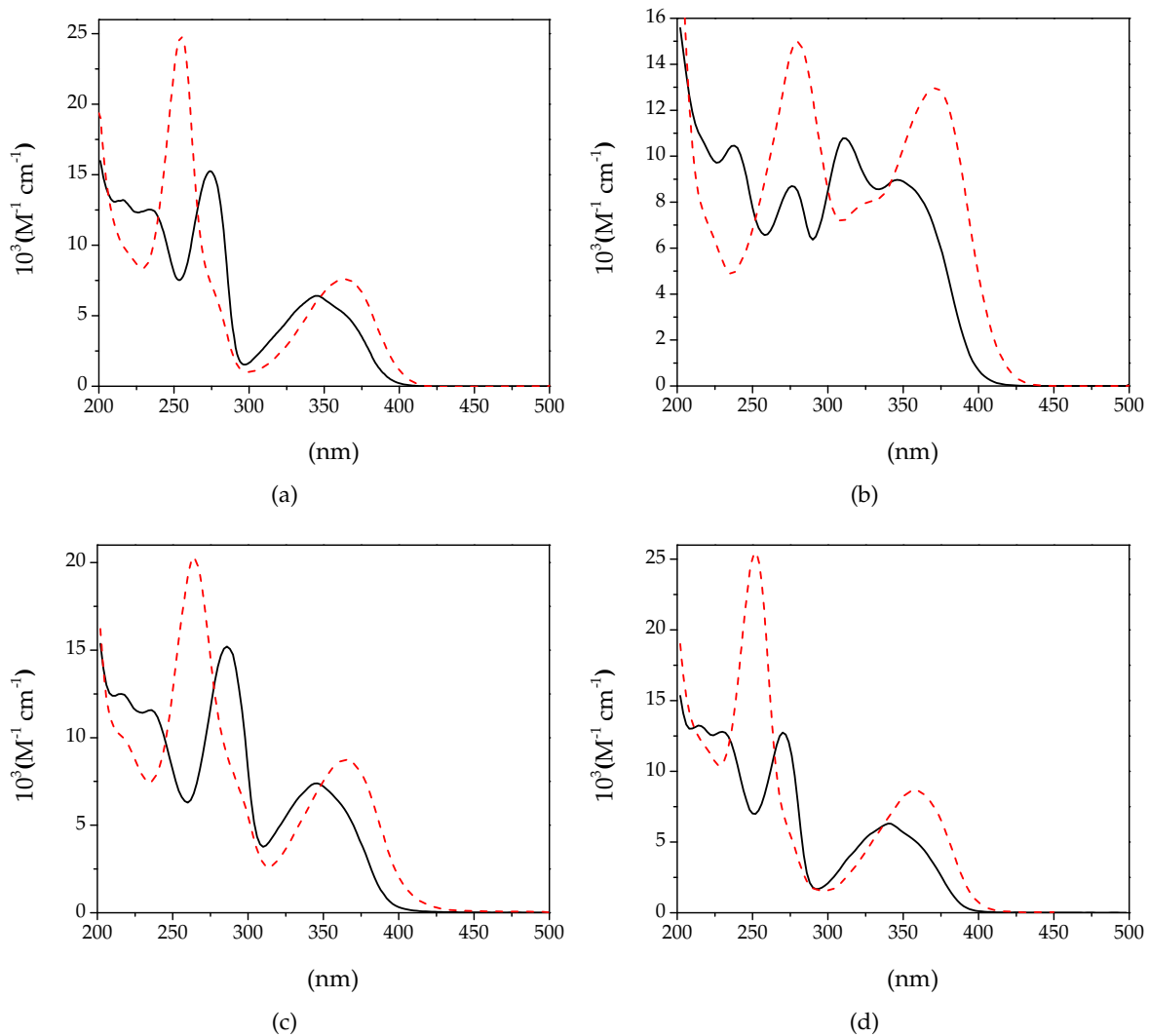


Figura 23: Espectros de absorción de pterinas aromáticas en solución acuosa. Formas ácida (línea continua, negra) y alcalina (línea punteada, roja). (a) Bip, (b) Fop, (c) Cap y (d) Ptr.

el azul (λ_{max} 340-350 nm) si se la compara con la forma básica (λ_{max} 350-360 nm). En la [Figura 23](#) se presentan los espectros de absorción en solución acuosa de las formas ácidas y básicas de las cuatro pterinas oxidadas que aparecerán con mayor frecuencia a lo largo de este trabajo de tesis: Bip, Fop, Cap y Ptr. Cabe destacar que el espectro de Fop posee una forma particular, y distinta a la de los otros derivados pterínicos. Esto se debe a que tiene como sustituyente en el C6, un grupo carbonilo cuyo enlace modifica los niveles de energía del doble anillo y genera la aparición de una tercera banda entre las dos descritas anteriormente.

Con respecto a los espectros de absorción de las 7,8-dihidropterinas, estos son muy variables y dependientes de la naturaleza química del sustituyente en el C6. En general, poseen tres bandas: la banda correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_3$ con un λ_{max} 230 nm, la banda correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_2$ con un λ_{max} entre 270 y 280 nm, y la banda de menor energía, con un λ_{max} entre 310 y 330 nm. Aquellos derivados que

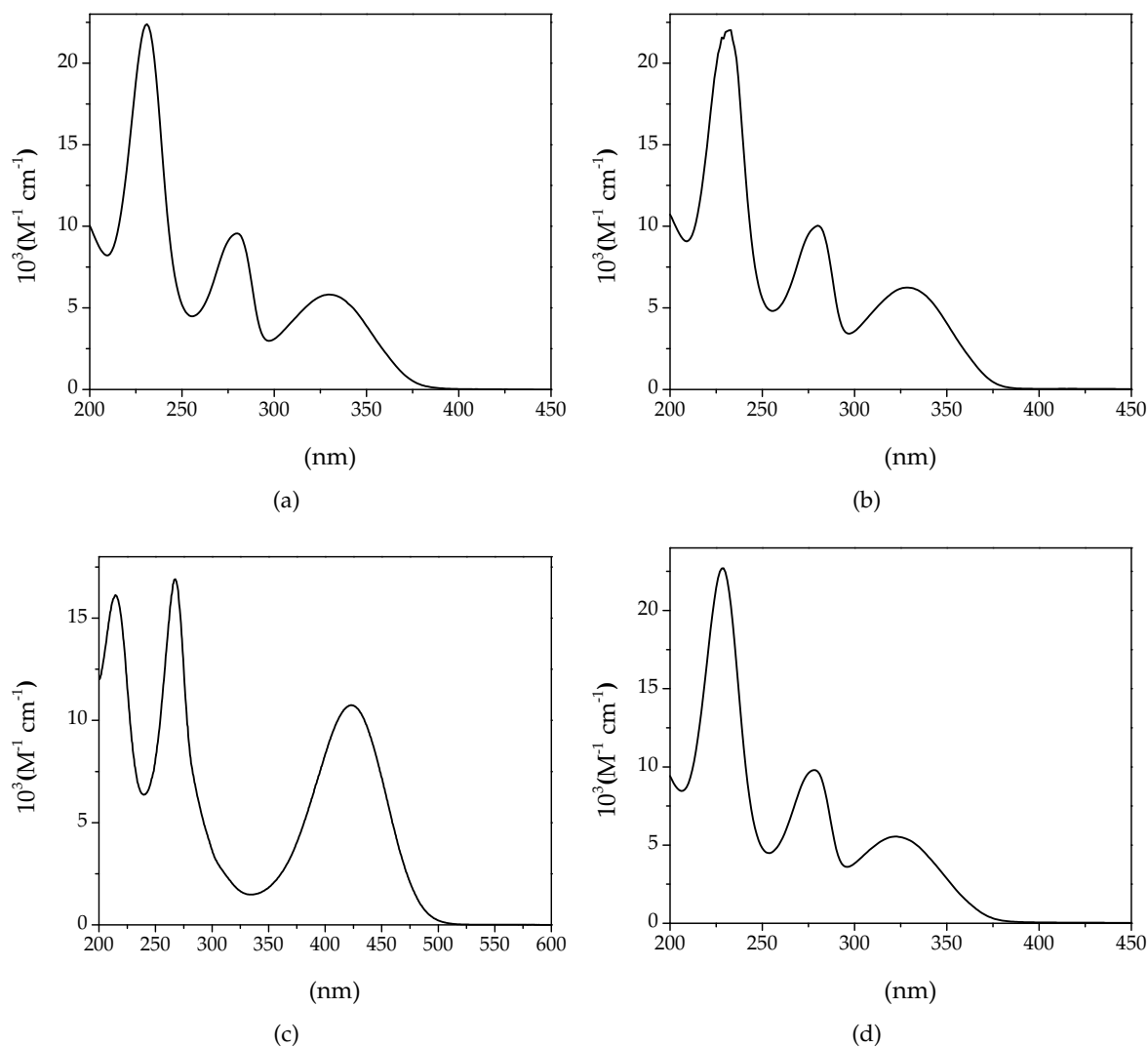


Figura 24: Espectros de absorción de la forma ácida de las 7,8-dihidropterinas en solución acuosa a pH=7. (a) H₂Bip, (b) H₂Nep, (c) H₂Fop y (d) H₂Hmp.

poseen en el C del sustituyente de la posición 6, un grupo carbonilo, como por ejemplo la 7,8 dihidroformilpterina, presentan una banda de gran intensidad en la región visible del espectro. Esto se atribuye a una interacción mesomérica entre el grupo amino de posición 2 que actúa como dador de electrones y el grupo carbonilo del sustituyente de posición 6, quien actúa como aceptor de electrones. En la [Figura 24](#) se presentan los espectros de absorción de cuatro pterinas reducidas. Éstos presentan espectros muy similares entre si.

3.4 REACTIVIDAD QUÍMICA DE PTERINAS

En general, las soluciones acuosas de las pterinas aromáticas son estables al aire, aunque esta propiedad varía ligeramente con el sustituyente presente en la posición 6. Por ejemplo, las soluciones de Ptr y Cap duran varias semanas sin descomponerse, mientras que las

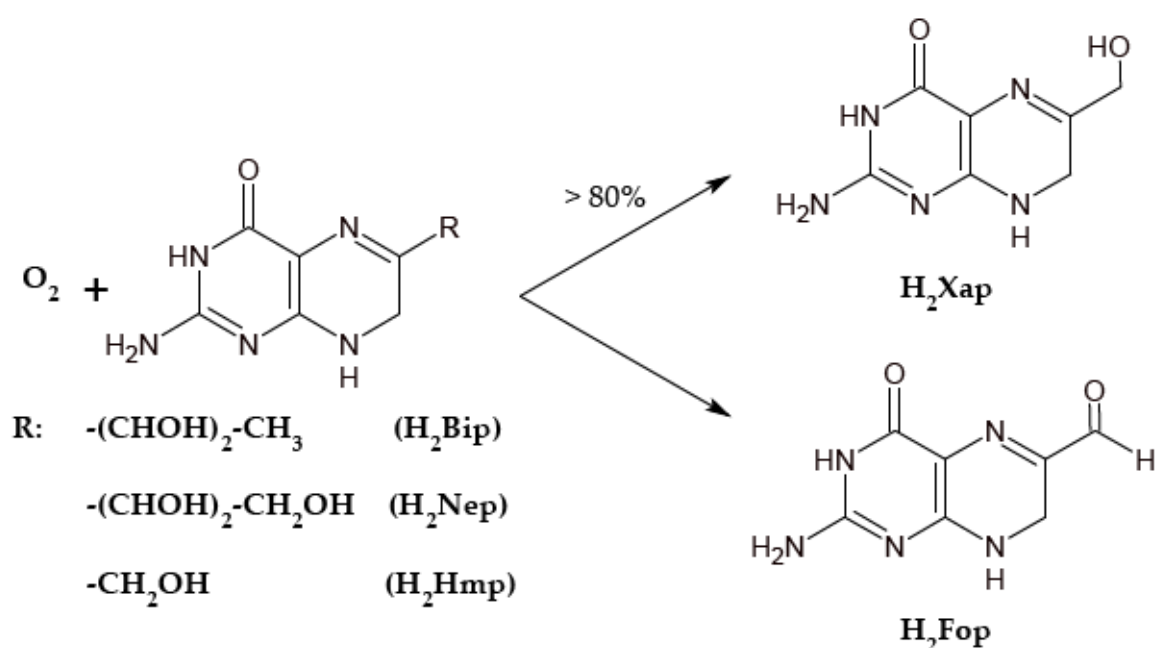


Figura 25: Oxidación de dihidropterinas por O_2 en soluciones aireadas a temperatura ambiente.

soluciones de Bip y Fop, duran solo algunos días. Por el contrario, las soluciones de las dihidropterinas presentan una inestabilidad significativa habiéndose realizado numerosos estudios para investigar la oxidación que sufren en presencia de O_2 , denominada, muchas veces, autooxidación. En el caso de los dihidroderivados estudiados en este trabajo de tesis, su reacción con O_2 lleva a la formación de 7,8-dihidrooxantopterina (H_2Xap) como principal producto de oxidación (>80%) y H_2Fop como producto minoritario (Figura 25). Estos compuestos poseen una constante aparente de velocidad de reacción con O_2 (k_{ap}) en soluciones equilibradas con aire a 25 °C de $4 \pm 2 \times 10^{-4}$ y $1,2 \pm 0,3 \times 10^{-2} h^{-1}$ para H_2Bip y H_2Nep , respectivamente [64]. Teniendo en cuenta los correspondientes tiempos de vida media ($t_{1/2} = 1700$ y 60 h para H_2Bip y H_2Nep , respectivamente), se pudo trabajar sin problemas con las soluciones preparadas en el día.

Los 7,8-dihidroderivados frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sufren una oxidación en el átomo de carbono 6 para dar H_2Xap (>90%). Ésta es la ruta principal en la reacción de H_2Nep , H_2Bip y H_2Fop con H_2O_2 [69]. Por su parte las pterinas oxidadas no reaccionan con H_2O_2 .

Dependiendo del estado de oxidación del anillo de pirazina, las pterinas tienen una reactividad muy diferente frente al 1O_2 . Mientras que los 7,8- dihidroderivados son desactivadores muy eficientes de esta especie [70], la reactividad química de las pterinas aromáticas es muy baja [71]. En trabajos recientes se estudió la capacidad que tienen las pterinas aromáticas para desactivar el 1O_2 , allí se determinó la constante de velocidad de desactivación total (k_t) y la constante de reactividad química (k_r) entre el 1O_2 y las pterinas aromáticas no conjugadas. Los valores de k_r para Ptr, 6-metilpterina (Mep) y 6,7-dimetilpterina (Dmp) ($0,25 \cdot 10^6$; $4,9 \cdot 10^6$ y $10 \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$) son mucho más bajos que

el correspondiente valor de k_t ($2,9 \cdot 10^6$; $8,0 \cdot 10^6$ y $31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) indicando que la desactivación de $^1\text{O}_2$ por estas moléculas es principalmente una desactivación física [71]. En la reacción química del $^1\text{O}_2$ con Ptr la ruptura del anillo para dar productos no pterínicos. En contraste con el valor de k_r , la constante de desactivación física (k_q), en general, no depende del sustituyente unido al anillo. En el caso de los 7,8-dihidroderivados los valores de k_t ($1,9 \cdot 10^8$ - $6,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) son, en general, mucho mayores a los de los correspondientes compuestos oxidados, indicando que el anillo de pirazina reducido desactiva de forma mucho más eficiente al $^1\text{O}_2$ que la forma aromática. En este tipo de compuestos los valores de k_r reportados también resultan mucho mayores ($3,0 \cdot 10^8$ - $7,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que para los derivados oxidados. Dado que los valores de k_r son similares a los de k_t se puede inferir que la desactivación del $^1\text{O}_2$ por los dihidroderivados es principalmente un proceso químico, a diferencia de lo observado para las pterinas aromáticas donde la desactivación es predominantemente física [70].

3.5 BIOQUÍMICA DE BIOPTERINA Y SUS DERIVADOS REDUCIDOS

Aunque las pterinas se encuentran en muy pequeñas cantidades en los organismos vivos, participan en importantes reacciones bioquímicas. Por ejemplo, la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (H_4Bip , Figura 20) es una molécula que actúa como cofactor de varias enzimas relevantes para el metabolismo celular, tales como funciones del sistema nervioso [72, 73], proliferación celular y homeostasis vascular [74, 75].

La Figura 26 muestra las vías de la síntesis de novo y de recuperación de H_4Bip . La enzima GTP ciclohidroxilasa I (GTP-CH I) catalizada la primera reacción de la biosíntesis para dar H_2Nep trifosfato, el cual luego pierde el grupo trifosfato y en una reacción catalizada por 6-piruviloil tetrahidropterina sintasa (PTPS) se genera 6-piruviloil-tetrahidropterina, que finalmente en una serie de reacciones de reducción se genera H_4Bip . A su vez, H_4Bip se puede generar a partir de una vía de recuperación en la cual Sep, que se forma por vía no enzimática a partir de 6-lactoil tetrahidropterina, que pasa a H_2Bip , en una reacción catalizada por la sepiapterina reductasa (SR). Luego, H_2Bip se reduce a H_4Bip en una reacción catalizada por la dihidrofolato reductasa (DFHR) [76].

Por un lado, H_4Bip es cofactor de las tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima cataliza la formación de óxido nítrico (NO) a partir de la oxidación de arginina. Además de funcionar como dador de electrones, H_4Bip estabiliza la estructura dimérica de las NOSs, que es la forma catalíticamente activa [75, 77], aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato [78] y aumenta la velocidad de consumo de NADPH [79], entre otras funciones. El NO formado participa como intermediario en diversos procesos, como la vasodilatación y la regulación del tono vascular normal, la inhibición de la agregación plaquetaria, transmisión neuronal y citostasis [80].

Asimismo, este tetrahidroderivado actúa como cofactor de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos. Existen tres tipos de hidroxilasas: i) fenilalanina hidroxilasa (PAH); ii) tirosina hidroxilasa (TH) y iii) triptofano hidroxilasa (TPH). Estas tres enzimas son estruc-

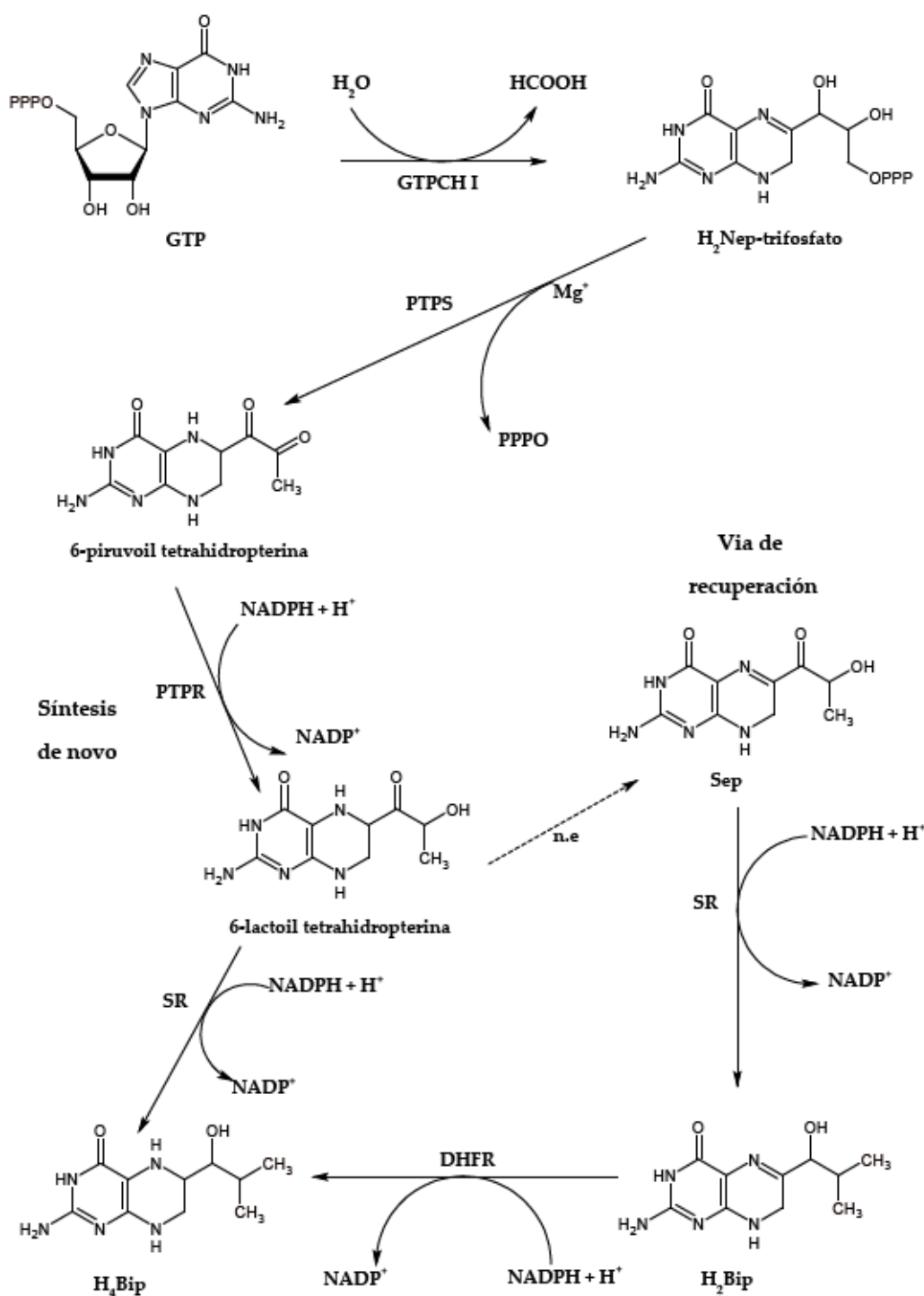


Figura 26: Biosíntesis de H_4Bip : síntesis de novo (izquierda) y vía de recuperación (derecha). GTPCHI: GTP ciclohoxilasa I; PTPS: 6-piruvoil tetrahidropterina sintasa; PTPR: 6-piruvoil tetrahidropterina 2'-reductasa; SR: sepiapterina reductasa; DHFR: dihidrofolato reductasa.

turalmente muy similares entre sí. Para catalizar la reacción requieren H_4Bip , O_2 y hierro (Fe). El sustrato se hidroxila y el O_2 se reduce a H_2O . La H_4Bip proporciona los electrones para reducir al O_2 y forma un intermediario peroxi- H_4Bip , el cual cede un átomo de oxígeno a la molécula que se hidroxilará mientras que el átomo de oxígeno remanente forma un hidroxido-derivado de H_4Bip . Este hidroxido-derivado pasa a una forma quinoida parcialmente reducida (qH_2Bip). La qH_2Bip por medio de una serie de pasos catalizados por enzimas es reducida totalmente para dar nuevamente H_4Bip (Figura 27). Además, H_4Bip tiene una segunda función en estas enzimas que es la de reducir el Fe en el sitio activo de la enzima de Fe^{3+} a Fe^{2+} [81].

La reacción catalizada por PAH es la primera de la síntesis de melanina, pigmento natural de la piel que confiere protección contra la radiación, que tiene lugar en las células de la piel (melanocitos). Es sabido que la melanogénesis está activada por la radiación UV. La fotooxidación directa de polímeros de melanina por radiación UV-B (290-320 nm) conduce al aumento de la pigmentación de novo. Además, produce un incremento del número de melanocitos y de la actividad de la tirosinasa (TYR) [82, 83], enzima que cataliza la etapa limitante de la melanogénesis, al generar L-DOPA a partir de tirosina. Bajo condiciones fisiológicas normales, los melanocitos tienen la capacidad de sintetizar de novo, reciclar y regular la síntesis de H_4Bip [84, 85].

3.6 VITILIGO

El vitiligo es una patología cutánea muy frecuente en los seres humanos. Consiste en un desorden en la pigmentación que produce manchas blancas sobre la piel. Estas manchas muestran una característica fluorescencia cuando son sometidas al denominado examen con luz de Wood (351 nm). Se ha demostrado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas oxidadas en las zonas afectadas por la enfermedad [84, 86], ya que son compuestos muy fluorescentes [87]. Por este motivo resulta interesante comentar el papel que juegan varios derivados pterínicos en esta patología.

Los pacientes con vitiligo presentan un gran aumento en la síntesis de novo de H_4Bip , y una alteración de la ruta de reciclado de este cofactor [88, 89, 90]. El aumento de los niveles de este tetrahydroderivado lleva a la acumulación de H_2Bip y $7-H_4Bip$ (un isómero de H_4Bip) [91]. Este último es un potente inhibidor de la actividad de la primera enzima en la ruta de síntesis de melanina (PAH) [92]. Como consecuencia de la baja actividad de PAH, aumentan los niveles de fenilalanina en piel, favoreciendo la síntesis de H_4Bip y aumentando aún más los niveles del tetrahydroderivado. El incremento de los niveles de fenilalanina y de $7-H_4Bip$, junto a la disminución de la actividad enzimática, la oxidación no enzimática de H_4Bip a qH_2Bip lleva a la generación y acumulación de H_2O_2 en la piel de estos pacientes (Figura 28) [92, 93]. Esta acumulación conduce a la inactivación de la enzima catalasa [94], y motivo por el cual en los melanocitos de los pacientes con vitiligo el medio se vuelve muy oxidante, alcanzando concentraciones de H_2O_2 del orden de milimolar. El incremento de los niveles de especies oxidantes en las manchas depig-

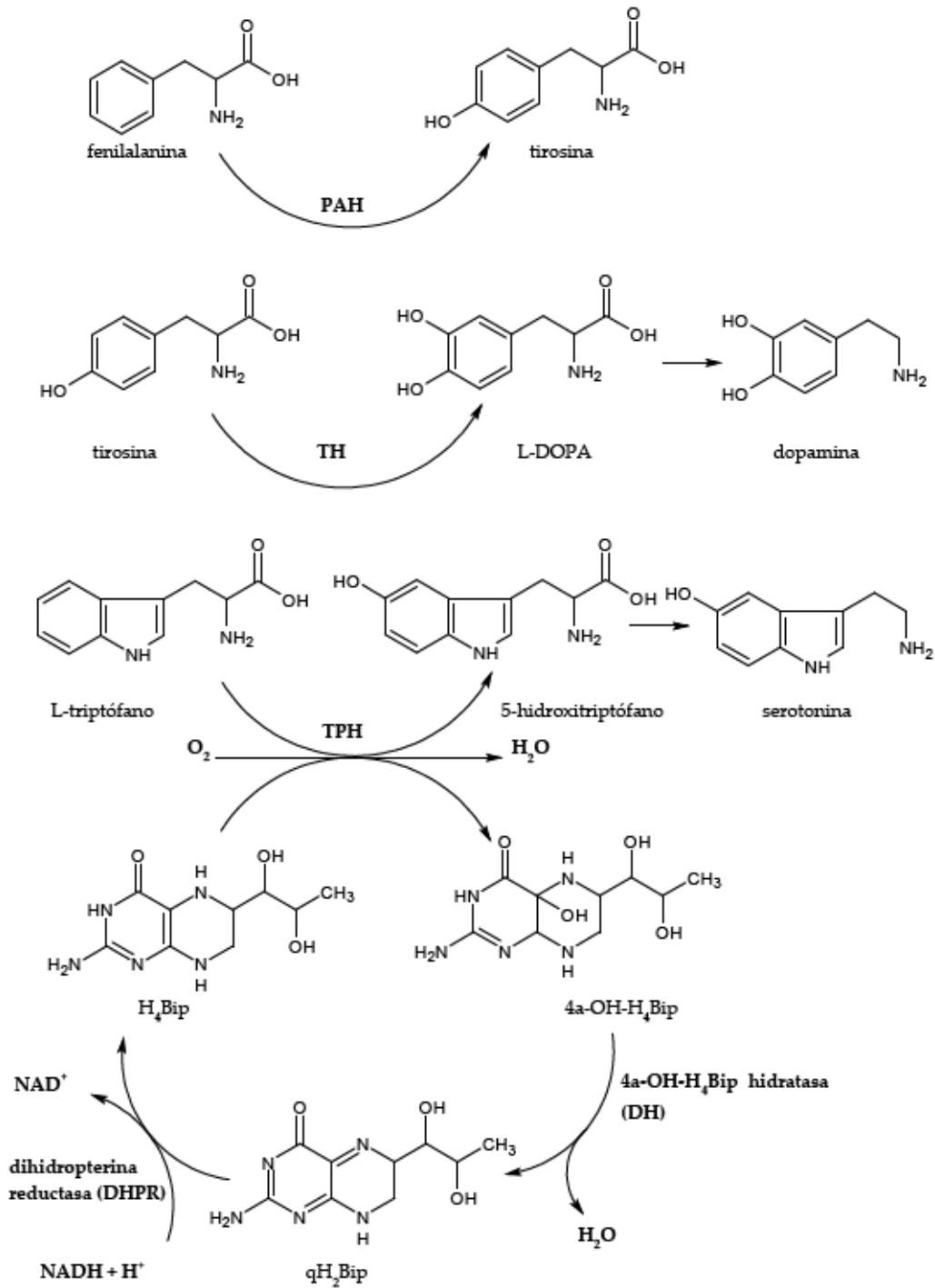


Figura 27: Participación de H_4Bip como cofactor de las enzimas hidroxilasas.

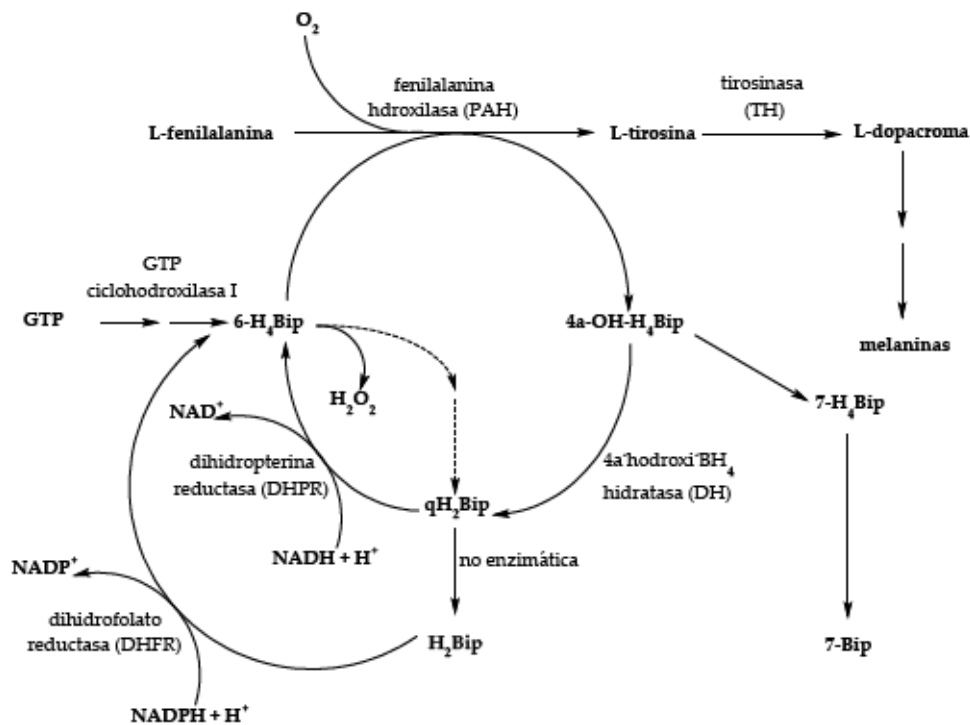


Figura 28: Síntesis de novo, reciclado y regulación de la síntesis de H_4Bip que tiene lugar en la melanogénesis. Las flechas punteadas indican la ruta corta de reciclado de H_4Bip , favorecida en el vitiligo.

mentadas quedó demostrado por biopsias de piel, en las que se encuentra un alto grado de vacuolización y peroxidación lipídica.

Además de la inhibición de PAH, se ha demostrado que en los tejidos afectados por vitiligo se produce inhibición de varias de las enzimas de la melanogénesis, pero, en la mayor parte de los casos, los mecanismos involucrados en dichos procesos no están dilucidados. A partir de este hecho, el estudio de la fotoquímica de los compuestos presentes en la piel y, en particular, de los procesos fotosensibilizados que afectan a las macromoléculas adquiere gran relevancia.

Si bien ciertos autores postulan la oxidación de H_4Bip y H_2Bip a 6-biopterina (6-Bip) y de 7- H_4Bip a 7-biopterina (7-Bip) por parte de H_2O_2 [95, 96], posteriormente se demostró que, H_2Bip es oxidada por esta especie reactiva de oxígeno dando como principal producto H_2Xap [69]. Esto último conduce al interrogante de cuál es el origen de la presencia de pterinas oxidadas en la piel de los pacientes que sufren esta enfermedad. Por otro lado, se demostró recientemente que la fotólisis de H_2Bip en presencia de aire conduce a su oxidación a Bip [97]. Por lo tanto, esta vía podría ser la responsable de la formación de pterinas oxidadas en la piel de pacientes que padecen vitiligo. En definitiva, si bien no es claro cuál es el primer mecanismo que perturba la homeostasis de H_4Bip , se sabe que estas alteraciones metabólicas conducen a una situación en la cual se tiene un tejido expuesto a la luz solar, sin protección contra la misma y donde se acumulan metabolitos fotoquímicamente activos.

FOTOQUÍMICA Y PROPIEDADES FOTSENSIBILIZADORAS DE PTERINAS

Desde hace varias décadas se sabe que ciertas pterinas oxidadas en solución acuosa y también algunos derivados reducidos son fotosensibles. En este capítulo se resumen los antecedentes existentes sobre el comportamiento fotofísico y fotoquímico de distintos derivados pterínicos. Por otro lado, el presente capítulo tiene por objeto condensar la información acerca de los antecedentes en la participación en procesos fotosensibilizados para esta familia de compuestos.

4.1 FOTOFÍSICA DE PTERINAS

4.1.1 *Propiedades de los estados excitados singletes*

Existen diversos estudios sobre los estados excitados de los distintos compuestos pterínicos, principalmente sobre pterinas oxidadas. Las características fluorescentes de las pterinas aromáticas (espectros de emisión y excitación, λ_{F} y λ_{F}) dependen de varios factores [98, 99, 58]. Por un lado, varían según sea la naturaleza química del sustituyente unido en la posición 6 del anillo pterínico. Mientras las denominadas pterinas conjugadas poseen una emisión de fluorescencia despreciable, las no conjugadas presentan, por el contrario, una emisión importante. Por otra parte, la emisión depende de la forma ácido-base del derivado pterínico presente en la solución. Típicamente, los espectros de emisión de las formas alcalinas presentan un corrimiento entre 10 y 15 nm hacia el rojo respecto de los espectros de emisión de las correspondientes formas ácidas, lo cual es consistente con las diferencias observadas en los espectros de absorción para ambas formas ácido-base (Capítulo 3). Por otro lado, los espectros de emisión normalizados de las pterinas no conjugadas son independientes de la longitud de onda de excitación, sugiriendo que la emisión fluorescente solo tiene lugar desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1).

En la [Tabla 4](#) se listan los valores reportados de longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia (λ_{F}), λ_{F} y λ_{F} para varias pterinas aromáticas. Puede apreciarse que, en todos los casos, los valores de λ_{F} correspondientes a las formas ácidas son mayores que los valores de las formas alcalinas. Además, estos valores presentan una fuerte dependencia con la naturaleza del sustituyente. Ciertamente, la presencia de la porción p-aminobenzoico en las pterinas conjugadas provoca una drástica reducción de los valores de λ_{F} . Asimismo, los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden y puede observarse que los λ_{F} para las formas

COMPUESTO	pH	$\lambda_{F, 5nm}$	Φ_F	τ_F	$\Phi_{F, 0,4ns}$	$\tau_{F, 0,4ns}$	$\Phi_{F, 0,4ns}$
Bip	5,5	441	0,36	0,01	9,1	0,34	0,01
	10,5	455	0,29	0,01	7,6	0,40	0,03
Fop	5,5	446	0,12	0,01	7,9	0,45	0,05
	10,5	454	0,07	0,01	2,2	0,47	0,02
Cap	5,5	439	0,28	0,01	5,8	0,27	0,03
	10,5	451	0,18	0,01	4,1	0,37	0,02
Ptr	5,5	439	0,33	0,01	7,6	0,18	0,02
	10,5	456	0,27	0,01	5,0	0,30	0,02
Nep	5,5	440	0,38	0,01	8,9	0,23	0,01
	10,5	454	0,31	0,01	7,4	0,34	0,04
Mep	5,5	448	0,61	0,01	13,6	0,10	0,02
	10,5	460	0,61	0,04	13,2	0,14	0,02
Hmp	5,5	449	0,53	0,01	11,0	0,15	0,02
	10,5	457	0,46	0,01	8,4	0,21	0,01
PteGlu	5,5	445	<0,005	-	-	<0,02	-
	10,5	455	<0,005	-	-	<0,02	-

Tabla 4: Longitud de onda del máximo de emisión ($\lambda_{F, 5nm}$), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F), tiempo de vida de fluorescencia (τ_F), y rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 ($\Phi_{F, 0,4ns}$) de las formas ácidas y alcalinas de algunos derivados pterínicos aromáticos [98, 58, 99, 87].

ácidas son mayores que los de sus respectivas formas alcalinas y que también tiene una clara dependencia con el tipo de sustituyente en la posición 6.

4.1.2 Propiedades de los estados excitados tripletes

Existen algunos estudios realizados sobre absorción de transientes de pterinas por la técnica de fotólisis de destello láser (LFP), o por su denominación en inglés *laser flash photolysis*. En estos trabajos se postula que al excitar una solución de Ptr a 355 nm se observan, en simultáneo, especies tripletes y radicales. Los autores asignaron dos de estos transientes a estados tripletes de Ptr [100]. Uno de ellos tiene un máximo de absorción a 550 nm y un tiempo de vida del estado excitado triplete (τ_T) de 2,3 - 0,2 s. El otro transiente posee dos máximos de absorción a 415 y 600 nm y un τ_T de 0,3 s. Según estos autores la existencia de dos estados tripletes se debe al equilibrio tautomérico presente en el estado fundamental de las pterinas (Sección 3.2). Ledbetter *et al.* [101] propusieron una hipótesis similar para los resultados obtenidos con Bip, encontrando dos estados excitados tripletes con sus correspondientes τ_T de 2,0 s y 0,3 s.

En estudios realizados por Parker R. T. *et al.* [102] se caracterizó la fosforescencia de un gran número de derivados pteridínicos, entre ellos Ptr, Cap y Hmp. En este trabajo estudiaron la emisión fosforescente, a temperatura ambiente y a 77 K, de soluciones alcalinas de estos compuestos mediante el método de detección en fase sólida. En general la emisión fosforescente de estos compuestos presenta una banda intensa centrada en 500 nm. En otro trabajo realizado por Chahidi *et al.* [100] se estudió la emisión fosforescente de Ptr en una mezcla de agua y etilenglicol a 77 K. Los espectros de estas soluciones mostraron un máximo de emisión de fosforescencia (λ_p) principal en 480 nm y un segundo máximo de menor intensidad centrado al rededor de 440 nm. Los autores asignaron este comportamiento a la presencia de dos estados excitados tripletes correspondientes a las dos especies tautoméricas (lactama y lactima) también observadas en experimentos de absorción de transientes a temperatura ambiente [100]. En este mismo trabajo se determinaron también los tiempos de vida de emisión de fosforescencia (τ_p) obteniéndose valores al rededor del segundo, 1,1 s (λ_p 480 nm) y 0,9 s (λ_p 440 nm). A partir de los espectros de fosforescencia se determinó la energía del primer estado excitado triplete, reportando un valor de 264 kJ/mol. Este valor es suficiente para transferirle la energía al O_2 en estado fundamental y generar 1O_2 (Sección 1.4). Por otro lado, no se encontraron datos similares para otros derivados pterínicos aromáticos, en particular Bip y Fop, compuestos que se estudiarán en el presente trabajo de tesis.

En solución acuosa y bajo irradiación UV-A, todas las pterinas aromáticas poseen una elevada eficiencia de producción de 1O_2 [103, 66, 104]. Por el contrario, las pterinas conjugadas como el PteGlu prácticamente no producen esta especie reactiva. Los valores de rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 (ϕ) se detallan en la Tabla 4. Para explicar las diferencias observadas en los valores de ϕ para PteGlu y las pterinas aromáticas no conjugadas se propuso que la cadena lateral de este compuesto actúa como desactivador interno, aumentando la velocidad de desactivación no radiativa del estado excitado singlete. Siendo muy deficiente el cruzamiento intersistemas y, consecuentemente, la producción de estados excitados tripletes resulta despreciable, por lo cual, no genera 1O_2 . Se aprecia, además, que la naturaleza del sustituyente en la posición 6 del anillo pterínico y el pH afectan significativamente los valores de ϕ , siendo mayor en medio alcalino para la mayoría de estos compuestos. Por otra parte, los dihidroderivados, a diferencia de las pterinas aromáticas, poseen capacidad extremadamente baja o nula para generar fotoquímicamente 1O_2 [63]. Es interesante comentar que las dihidropterinas que se encuentran presentes en los organismos en condiciones fisiológicas, incluso en zonas expuestas a la radiación como la piel del ser humano, cuando sus estados excitados pierden el exceso de energía lo hacen muy rápidamente, evitando así la formación de especies reactivas capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el medio. Por el contrario, las pterinas aromáticas no conjugadas que solo aparecen en piel bajo condiciones patológicas (Sección 3.6), generan fotoquímicamente especies como los estados excitados tripletes que viven lo suficiente como para reaccionar y, además, pueden formar una especie altamente reactiva como el 1O_2 .

Compuesto	$\Phi_R \cdot 10^3$				Ref.
	pH 5,5		pH 10,5		
Ptr	0,82	0,06	1,2	0,2	[105]
Cap	5,1	0,5	1,3	0,2	[105]
Mep	0,24	0,5	0,81	0,08	[67]
Fop	40	2	35	2	[59, 106]
Hmp	2,3	0,2	18	2	[66, 104]

Tabla 5: Rendimiento cuántico de consumo (Φ_R) de pterinas aromáticas en soluciones equilibradas con aire.

4.2 REACTIVIDAD FOTOQUÍMICA DE LAS PTERINAS AROMÁTICAS

En general, en soluciones aireadas y bajo irradiación UV-A, las pterinas aromáticas sufren reacciones de oxidación que involucran modificaciones en el sustituyente localizado en la posición 6, mientras que sus anillos aromáticos permanecen inalterados. Los mecanismos implicados en la fotooxidación de estos compuestos dependen de la naturaleza del sustituyente, como así también del pH del medio. De esta manera, la fotoquímica de la forma ácida de un determinado derivado pterínico puede ser muy diferente a la de su correspondiente forma alcalina.

4.2.1 Pterinas sin sustituyente oxidable

Aquellos compuesto pterínicos que no poseen sustituyente oxidable en la posición 6, como Ptr, 6-metilpterina (Mep) o Cap, son estables cuando se los irradia en solución acuosa en ausencia de O₂. En cambio, cuando la irradiación es en presencia de O₂ se produce la oxidación de la molécula con la consecuente ruptura de anillo, generando productos no pterínicos y H₂O₂ [105, 67]. No obstante, estas reacciones ocurren muy lentamente, con valores de rendimientos cuánticos de consumo del reactivo (Φ_R) mucho menores que los correspondientes a los derivados que poseen sustituyentes oxidables (Tabla 5).

4.2.2 Biopterina y neopterina

En la década del '70, W. Pfleiderer et al. estudiaron la fotoquímica de Bip y neopterina (Nep) en solución acuosas con buffer de pH 10. En estas condiciones y, bajo irradiación UV-A, los autores observaron que en presencia de O₂, Fop era el producto mayoritario de la reacción [107]. En estudios más recientes realizados por Vignoni *et. al.* acerca de la fotoquímica de Bip y Nep, encontraron que cuando soluciones acuosas de estos compuestos son expuestas a la radiación UV-A, se forma un intermediario rojo (IR) (con máximo

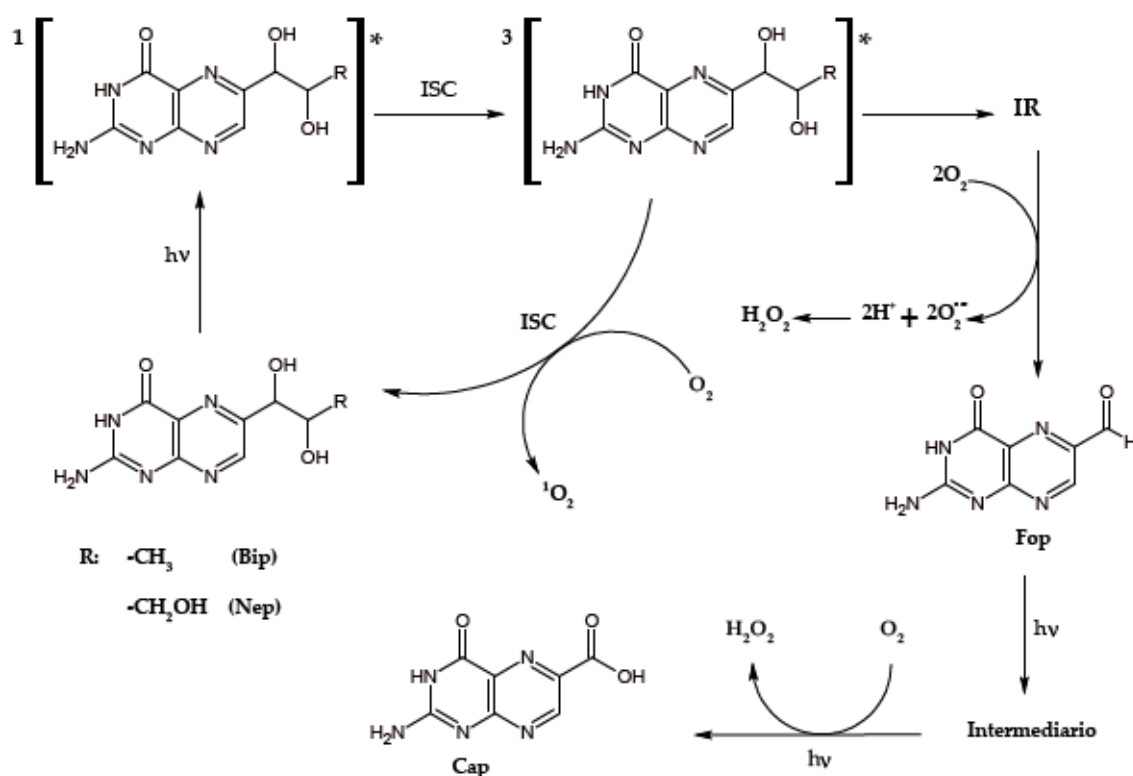


Figura 29: Mecanismo general de fotooxidación para Bip, Nep y Fop en soluciones acuosas equilibradas en aire bajo irradiación UV-A.

de absorción de la banda de menor energía centrado en 480 nm) en un proceso independiente del O_2 [108]. Luego, este producto es rápidamente oxidado por O_2 para generar Fop y H_2O_2 (Figura 29). A partir de estudios de ^1H -RMN se pudo establecer que ya sea en medio ácido o alcalino, se forma el mismo intermediario, 6-formil-5,8-dihidropterina, cuya estructura que había sido sugerida previamente por Pfeleiderer *et. al.*[109], además se determinó que este compuesto es inestable tanto en presencia como en ausencia de O_2 .

Para ambos reactivos y en ambas condiciones de pH, los Φ_{-R} dependen de la concentración de O_2 : a mayor concentración de O_2 , menor es el rendimiento cuántico (Tabla 6). Este resultado sugiere que el comportamiento general de ambas pterinas es el mismo y que el estado excitado del reactivo involucrado en la reacción fotoquímica es el estado excitado triplete, el cual es desactivado por el O_2 disuelto [108].

4.2.3 6-Formilpterina

Fop es otra pterina con sustituyente oxidable cuya reactividad fotoquímica (UV-A) ha sido estudiada. En presencia de O_2 , ya sea en medio ácido o alcalino, se oxida el sustituyente del anillo pterínico dando lugar a la formación de Cap y H_2O_2 . En ausencia de O_2 se genera también un intermediario, con características similares a las descritas para Bip y Nep, que reacciona con O_2 para generar como productos finales Cap y H_2O_2 (Figura

	pH	Ar	aire	O ₂			
Fotólisis Bip							
-Bip	5,5	0,10	0,01	0,037	0,003	0,024	0,003
	10,5	0,18	0,02	0,12	0,01	0,07	0,01
Fotólisis Nep							
-Nep	5,5	0,11	0,01	0,044	0,003	0,018	0,002
	10,5	0,16	0,03	0,11	0,01	0,069	0,005

Tabla 6: Rendimiento cuántico de consumo de reactivo (ϕ_R) para la fotólisis de Bip y Nep a diferentes concentraciones de O₂.

29)[106, 59]. Los rendimientos cuánticos de consumo de reactivo de Fop se encuentran en la Tabla 5.

4.2.4 Reactividad fotoquímica de los derivados reducidos

En estudios realizados por Vignoni et al.[97] se ha demostrado que cuando una solución acuosa de H₂Bip es expuesta a radiación UV-A, este compuesto se degrada por dos mecanismos diferentes. Por un lado, en un proceso independiente del O₂ y mediante la generación de un intermediario, H₂Bip se fotodimeriza generando al menos dos dímeros con un $\phi_{H_2Bip} = 0,053 \pm 0,003$. Este proceso se inicia a partir del estado excitado singlete. Por otra parte, y solo en presencia de O₂, H₂Bip se oxida produciendo su análogo oxidado, Bip. Esta vía oxidativa contribuye muy poco al consumo de H₂Bip en una primera etapa, pero adquiere relevancia al transcurrir el proceso fotoquímico. Es decir, existe un fenómeno que podría considerarse como auto-fotocatalítico que produce una aceleración en la fotooxidación del reactivo. En esta vía oxidativa participarían estados excitados tripletes. El mecanismo propuesto para estas reacciones se muestra en la Figura 30. De modo similar durante la irradiación de soluciones acuosas de H₂Nep, ya sea en presencia o ausencia de O₂, se produce una fotodimerización con $\phi_{H_2Nep} = 0,038 \pm 0,005$. El mecanismo por el cual se forman estos dímeros es similar al planteado para H₂Bip (Figura 30).

Otro derivado pterínico reducido que ha sido estudiado es Sep. En soluciones aireadas irradiadas tanto con UV-A como con UV-B, Sep se oxida generando Cap y H₂O₂ [110]. Por otra parte, cuando la radiación incide sobre soluciones anaeróbicas de Sep, tiene lugar la formación de un intermediario que luego, en contacto con O₂, genera Cap y H₂O₂ [95].

4.3 PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE PTERINAS

A fines de los 90' apareció el primer trabajo que confirmó que las pterinas son capaces de fotoinducir modificaciones químicas en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin em-

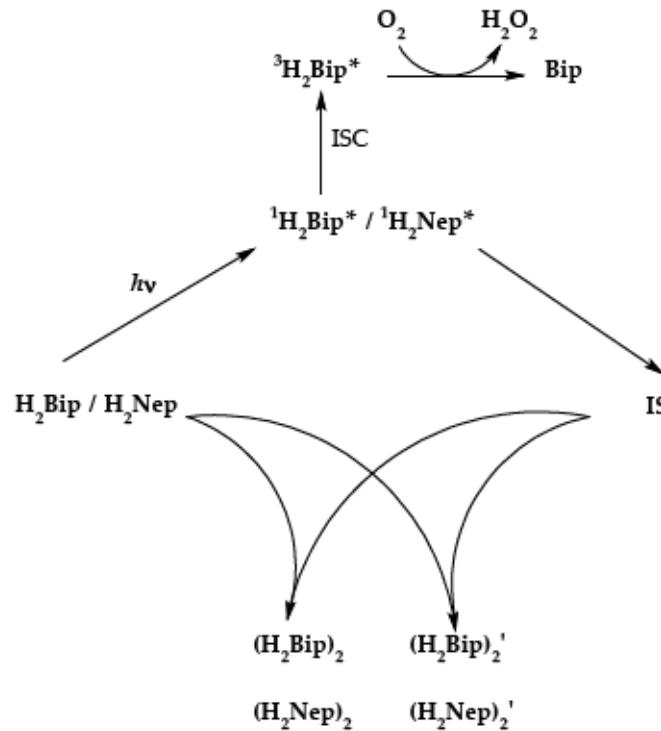


Figura 30: Mecanismo general de fotooxidación y fotodimerización para H_2Bip y H_2Nep en solución acuosa y bajo radiación UV-A. IS: intermediario

bargo, más recientemente se iniciaron investigaciones sistemáticas tendientes a evaluar la capacidad fotosensibilizadora de las pteridinas sobre otras biomoléculas, como así también a dilucidar los mecanismos de reacción involucrados. A continuación se hará una breve descripción de los principales resultados hallados en este sentido.

4.3.1 Fotosensibilización de bases púricas y desoxirribonucleótidos

Existen antecedentes en la literatura sobre el estudio de la fotosensibilización de monómeros de ADN por Ptr, el más antiguo data del año 1979 publicado por Santus y Momzikoff [111]. En ese estudio se cuantificó el porcentaje de degradación de las bases púricas (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) irradiadas en presencia de Ptr, Xap o isoxantopterina en una solución acuosa de buffer de fosfato de $pH = 8,4$. Los autores concluyeron, en primer lugar, que los sustratos que más se degradan son guanina y xantina y en segundo lugar que la Ptr no sustituida tiene un efecto sensibilizador superior que aquellas con sustituyentes hidroxilos. Respecto al mecanismo de fotosensibilización, postulan que las pterinas son capaces de actuar mediante ambos mecanismos (Tipo I y Tipo II).

A partir del año 2003, se realizaron estudios sistemáticos usando Ptr como sensibilizador y principalmente los nucleótidos $dGMP$ y $dAMP$ como sustratos [65, 112, 113, 114] (Tabla 1). Se realizaron experimentos irradiando soluciones acuosas en condiciones en

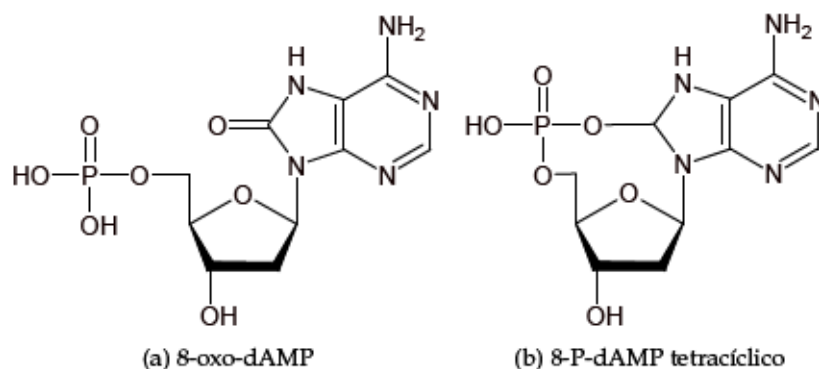
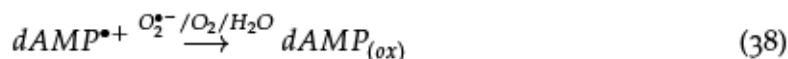
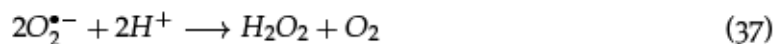
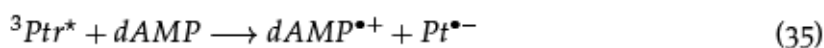


Figura 31: Estructura química de los productos de la oxidación fotosensibilizada de dAMP por Ptr, 8-oxo-dAMP y 8-P-dAMP tetracíclico.

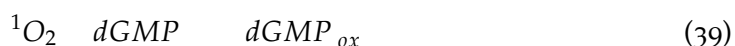
las cuales la radiación sólo es absorbida por Ptr. Dichos experimentos arrojaron varios resultados relevantes, los cuales se detallan a continuación:

- El nucleótido dAMP es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido mediante un mecanismo Tipo I. Durante la reacción sólo se consume el nucleótido. La presencia de O_2 es indispensable para que la reacción ocurra y el 1O_2 , a pesar de ser generado por el sensibilizador, no participa en la reacción. El proceso genera H_2O_2 y se acelera en presencia de superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la descomposición del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). El nucleótido dAMP no es fotosensibilizado por Ptr en medio alcalino ($pH = 10,5$). En base a lo resultados obtenidos en estos estudios se propuso el mecanismo de reacción que se detalla a continuación (reacciones 34 a 38) para el proceso fotosensibilizado.



- Se identificaron dos productos de oxidación fotosensibilizada de dAMP. Uno de ellos, 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (8-oxo-dAMP) (Figura 31 (a)), ya había sido identificado como producto de oxidación fotoinducida por otros sensibilizadores que actúan a través de mecanismos Tipo I (Sección 2.4). El segundo, en base a los espectros de masa obtenidos presenta una estructura cíclica (Figura 31 (b)) y no había sido reportado anteriormente.

- El nucleótido dGMP es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido en un proceso en el que el sensibilizador no se consume y que sólo ocurre en condiciones aeróbicas. Durante la reacción se consume O_2 , se produce H_2O_2 y varios productos altamente polares que no fueron identificados. La fotooxidación en medio ácido ocurre principalmente por una vía un mecanismo similar al descrito para dAMP (reacciones 34 a 38). El proceso de transferencia electrónica como etapa inicial del proceso fotosensibilizado fue confirmado mediante la detección del radical guanina en su forma neutra ($dGMP - H$) en experimentos de LFP. Por el contrario, en medio alcalino predomina la oxidación por 1O_2 (reacción 39). Es decir que, el mecanismo de reacción planteado para este sistema es una competencia entre un mecanismo Tipo I y Tipo II [114], que dependiendo del pH del medio se favorece una u otra vía.



Resultados similares se encontraron para las reacciones de fotosensibilización de nucleótidos púricos utilizando como sensibilizador Lum un compuesto perteneciente a la familia de las pteridinas (Capítulo 3).

4.3.2 Fotosensibilización de ADN eucariota

4.3.2.1 Hidroxilación de desoxiguanosina en ADN

Kawanishi et al. [115, 116] demostraron que al exponer ADN eucariota de doble hebra, a radiación de 365 nm, en presencia de Ptr, Cap, Bip, Nep y Pteglu se producen lesiones en secuencias específicas del mismo. La eficiencia del daño al ADN inducida por luz UV-A decrece en el sentido Ptr > Cap > Bip > Nep > PteGlu. Al utilizar xantopteroína o isoxantopteroína como sensibilizadores, no observaron daño. Estos estudios, demostraron que las oxidaciones y rupturas se encontraban en secuencias con varias guaninas consecutivas (secuencias poli-G: 5'-GG-3', 5'-GGG-3' y 5'-GGGG-3'). Basándose en la formación de radicales detectados en experimentos de EPR y en experiencias realizadas en D_2O postularon que el daño fotoinducido al ADN consiste en una oxidación fotosensibilizada Tipo I. El mecanismo de fotosensibilización propuesto puede resumirse de la siguiente manera: el sensibilizador (Ptr, Cap, Bip o Nep) excitado oxida al nucleótido por medio de un proceso de transferencia electrónica. La oxidación de guanina ocurre principalmente en secuencias con varias guaninas consecutivas. Esto se debe porque el apilamiento de dos bases guanina en un fragmento de ADN de doble cadena produce una disminución en el potencial de ionización. La descomposición del radical G posteriormente sigue alguna de las vías conocidas de reacción, que fueron explicadas en el Capítulo 2. En particular, en estos estudios se detectó 8-oxo-guanosina probando la existencia de la vía de hidratación del radical. Por otra parte, el anión radical del sensibilizador formado, puede consumirse en la reacción o regenerarse al reaccionar con O_2 produciendo anión superóxido.

4.3.3 *Fotosensibilización de ADN plasmídico*

Se han descrito estudios de fotosensibilización bajo irradiación con luz UV-A del plásmido pUC18, usando Ptr como fotosensibilizador [65, 117]. El plásmido pUC18 es una molécula de ADN circular de doble hebra y bajo peso molecular. En este trabajo, los autores demostraron que, cuando se irradia con luz UV-A (350 nm) soluciones de plásmido pUC18 en presencia de Ptr, las moléculas de ADN sufren cortes al azar en sus hebras, los cuales 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. Los autores encontraron que la reacción de fotosensibilización ocurre tanto en presencia como en ausencia de O_2 . No observaron diferencias en la cantidad de plásmido relajado, producida por irradiación del mismo en presencia de Ptr, al variar la concentración de O_2 disuelto en la solución. Por lo tanto, en dicho artículo se descartó la participación de especies reactivas de oxígeno en el mecanismo de clivaje del plásmido. En estudios realizados con el plásmido PBR322 confirmaron que por irradiación UV-A, Cap produce cortes en la cadena de ADN [118]. Sin embargo, los autores proponen que no puede descartarse la participación del 1O_2 , basándose en que el agregado de azida sódica (secuestrador inespecífico de 1O_2) al medio de reacción, inhibe la reacción fotosensibilizada.

4.3.4 *Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas.*

En estudios recientes realizados con Lum y Ptr se probó el efecto fotodinámico de estos compuestos sobre una línea cancerígena de células eucariotas, las células HeLa, a pH fisiológico [119, 120]. Lum y Ptr interaccionan con las células, pudiendo, o bien penetrar y localizarse dentro de dominios intracelulares o, al menos, asociarse a las membranas de las mismas. Se comprobó que ninguno de los sensibilizadores es un compuesto tóxico para las células en condiciones de oscuridad. Por el contrario bajo irradiación UV-A se observó pérdida de la integridad de la estructura de las células incubadas con Lum ó Ptr. Este evento se relacionó con una falla mitocondrial y con la alteración de en las membranas celulares.

4.3.5 *Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas*

En estudios recientes se demostró la capacidad de Ptr para participar en procesos fotosensibilizados utilizando como sustratos aminoácidos, en particular triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Los resultados demostraron que, en presencia de O_2 , Ptr es capaz de fotosensibilizar a ambos aminoácidos estudiados, siendo el principal mecanismo de reacción la transferencia electrónica desde el sustrato hacia el sensibilizador, Ptr. La transferencia electrónica se evidenció en forma directa por la detección de radical Trp en soluciones irradiadas en presencia de Ptr. utilizando la técnica de resonancia paramagnética electró-

nica (EPR) [121]. Asimismo, en estudios realizados con Tyr, se detectó la formación de dímeros generados a partir del radical neutro de Tyr ($Tyr \cdot H$) [122]. La detección de estos dímeros es relevante dado que son los responsables del fotoentrecruzamiento en las proteínas .

Por otro lado, se observó que estas mismas reacciones se podían llevar a cabo en péptidos y proteínas. En estudios realizados con la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) se demostró que Ptr es capaz de fotosensibilizar al péptido. En la reacción éste experimenta una oxidación y una dimerización, afectando específicamente, al menos, a los aminoácidos Trp y Tyr [123]. También se demostró la capacidad de Ptr para fotoinducir la oxidación de proteínas como la albúmina (BSA) y enzimas como la TYR. En el caso de la BSA el proceso implica la oxidación de la proteína en al menos dos sitios específicos, Trp y Tyr [124]. Los residuos de Tyr contribuyen a la dimerización de la proteína y por lo tanto al fotoentrecruzamiento. En los estudios realizados con TYR, se demostró por primera vez que la inactivación de la enzima como consecuencia de un proceso fotosensibilizado inducido por Ptr [125]. El mecanismo del proceso involucra una etapa inicial en la cual ocurre una transferencia electrónica desde la enzima al estado triplete excitado de la Ptr. Dado que las pterinas están presentes en la piel humana y que, en particular, se acumulan en regiones donde falla la protección contra la radiación UV, la inactivación de la enzima que cataliza el primer paso, y a la vez el limitante, de la melanogénesis es relevante desde el punto de vista biomédico.

Parte II

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

PREPARACIÓN E IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE SOLUCIONES

En este capítulo, se describirán las técnicas y los procedimientos que se emplearon para preparar e irradiar las soluciones acuosas en forma continua con radiación UV-A, y se describirá la técnica para medir la cantidad de radiación que alcanza la celda de reacción en un determinado período de tiempo.

5.1 REACTIVOS

Las pterinas oxidadas y 7,8-dihidropterinas utilizadas en este trabajo de tesis fueron sintetizadas y provistas por el Laboratorio Schircks (Suiza). Todas fueron usadas sin posterior purificación, debido a que presentan una pureza mayor al 99 %. En particular, los compuestos usados en este trabajo fueron:

- pterinas aromáticas: *Ptr*, *Bip*, *Fop*, *Cap*, *Nep*, 6-hidroximetilpterina (*Hmp*);
- pterinas reducidas: H_2Bip , H_2Nep , H_2Fop , H_2Hmp y *Sep*.

Los nucleótidos empleados como sustrato para las reacciones fotosensibilizadas fueron *dAMP*, *dGMP* y *dTMP* provistos por Sigma-Aldrich, con una pureza superior al 98 %.

A continuación se listan otros reactivos utilizados: NaOH, HCl, (Merck), D_2O (> 99,9 %, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio deuterado (NaOD, CEA, > 99 %) y ácido clorhídrico deuterado (DCl, Aldrich, 99,5 %). Ácido fórmico (HCOOH) (Sigma-Aldrich), metanol y acetonitrilo calidad HPLC (J. T. Baker). Además, se empleó yoduro de potasio (*KI*) (Sigma-Aldrich), *SOD* de eritrocito bovino (Sigma-Aldrich). El agua utilizada para preparar las distintas soluciones es calidad milliQ (agua destilada purificada en un equipo Milli Q Reagent Water System (resistividad $\sim 10 M^{-1} cm^{-1}$)).

5.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

5.2.1 Soluciones acuosas

Para preparar y manipular las soluciones de pterinas aromáticas y dihidroderivados siempre se trabajó en un cuarto oscuro iluminado con luz roja para evitar la fotodegradación de los reactivos. El procedimiento general para la preparación de las soluciones comienza con la disolución del sólido en agua libre de iones metálicos. Para facilitar la disolución se agregaron microlitros de NaOH 0,5 – 1 M ($\sim 10 - 100 \mu l$), ya que las pterinas presentan grupos ionizados en medio alcalino que favorecen la disolución (Sección 3.2). Se mantuvieron en agitación por alrededor de 1 hora hasta lograr la completa disolución

del reactivo. Luego, mediante el uso de matraces, se llevó la solución a volumen final y se transvasó a frascos de color caramelo para evitar la degradación que pudieran sufrir estos derivados pterínicos por exposición a la luz. En general, las pterinas reducidas son más inestables que los derivados aromáticos cuando se encuentran en soluciones acuosas aireadas a temperatura ambiente. En particular, las soluciones de H₂Nep deben ser utilizadas dentro de las 12 horas desde su preparación, mientras que las soluciones de H₂Bip pueden utilizarse hasta 48–72 horas posteriores a la preparación. Por el contrario, las soluciones de pterinas aromáticas son estables por alrededor de una semana luego de su preparación. Con respecto a las concentraciones de las soluciones de pterinas estudiadas, las mismas variaron, generalmente, entre 50 y 200 M. Para determinar la concentración exacta de las soluciones empleadas en los distintos experimentos se utilizaron distintos métodos: i) a partir de la cantidad de sólido pesado, el volumen de solución y el peso molecular del compuesto; ii) a partir del factor de dilución y la concentración (calculada según i)) de una solución más concentrada y iii) a partir de medidas de absorbancia y los correspondientes valores de los coeficientes de absorción molar a una determinada λ [106], utilizando la ecuación 40,

$$P = \frac{A}{\epsilon l} \quad (40)$$

donde P es la concentración del compuesto, A es el valor de absorbancia a una determinada λ y l es el camino óptico en cm.

Los nucleótidos son muy solubles en agua, en este caso, las soluciones se prepararon a pH neutro. Para dGMP, se compararon valores de concentración calculados por pesada o calculados a través del coeficiente de absorción molar ($\epsilon_{260nm}^{dGMP} = 12180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [126] aplicando la ecuación 40 y se obtuvieron valores similares, dentro del error experimental. Por lo tanto, se utilizó indistintamente cualquiera de los dos métodos. Por el contrario, para los casos de dAMP y dTMP, dado que los reactivos se hidratan fácilmente, la concentración se calculó sólo utilizando la ecuación 40 con $\epsilon_{260nm}^{dAMP} = 15060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{260nm}^{dTMP} = 8560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [126].

El pH de trabajo dependió del compuesto utilizado y de cada experimento en particular. Para las pterinas aromáticas se trabajó a pH 5,5. De esta manera, en las soluciones de trabajo sólo se encontró presente una única especie ácido-base, la especie protonada ya que, como se explicó en el Capítulo 3, el pK_a de la mayoría de las pterinas aromáticas es cercano a 8. En el caso de las pterinas reducidas, se trabajó en condiciones de pH comprendidas entre 7,0 y 7,4, condición en la cual se encuentra presente únicamente la especie neutra de estos compuestos que presentan valores de pK_a cercanos a 10. Las soluciones de ácido y álcali utilizadas para llevar a pH se prepararon a partir de una solución concentrada del reactivo comercial, en el caso del HCl y, por pesada de granallas, en el caso del NaOH. Las concentraciones variaron entre 0,1 y 2 M. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro (PHM220, Radiometer Copenhagen) en combinación con un electrodo de pH (pHC3001-9, Radiometer Analytical). La calibración de los equipos se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00, 7,00

y 10,00. Es necesario destacar que no se utilizaron soluciones reguladoras para ajustar el pH de las soluciones debido a que se sabe que ciertos aniones, como por ejemplo fosfato y acetato, son capaces de desactivar los estados excitados de las pterinas [58].

Para los experimentos de fotosensibilización, las mezclas entre soluciones de sensibilizador y el nucleótido se realizaron de dos formas. En algunos casos se mezclaron soluciones del sensibilizador y el nucleótido de igual pH y, en otros casos, se agregó el nucleótido sólido a una solución del sensibilizador de concentración y pH adecuados para el experimento a realizar. Antes de iniciar cada experimento se controló el pH y el espectro de absorción de la mezcla.

5.2.2 Soluciones en D_2O

Para ciertas medidas cinéticas se utilizó D_2O como solvente en lugar de H_2O . Las concentraciones de pterinas pueden alcanzar valores de hasta 2 mM, siendo mucho más elevadas que en H_2O debido a su mayor solubilidad en el solvente deuterado. Se partió de D_2O previamente alcalinizada a pD ~ 11 a la cual se agregó el sólido a disolver y se mantuvo bajo agitación magnética por un período de 45 a 60 minutos, sellando los envases con *parafilm*, para evitar el intercambio de D_2O con H_2O proveniente de la humedad ambiente. Luego, las soluciones se traspasaron a envases color caramelo para su disposición final y almacenamiento. La concentración se determinó mediante el cálculo del sólido pesado y el volumen de D_2O agregado. El pD $pD = -\log D$ fue medido con el pH-metro nombrado en la sección 5.2.1 y los valores de pD se calcularon aplicando una corrección a cada medida de pH dada por la ecuación 41, donde pH es el valor leído en el instrumento [127].

$$pD = pH - 0,4 \quad (41)$$

El valor final de pD se alcanzó mediante el agregado con micropipeta de pequeños volúmenes de soluciones relativamente concentradas de NaOD y DCl en D_2O .

5.2.3 Condiciones anaeróbicas y de saturación de O_2

Para realizar ciertos experimentos fue necesario eliminar el O_2 disuelto en la solución. Para tal fin, se prosiguió de la siguiente manera: mililitros de solución preparada siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2.1, se colocaron en celdas de cuarzo con dimensiones de 1cm x 1cm o de 1 cm x 0,4 cm, con tapa a rosca y septum de silicona. Se insertaron dos agujas atravesando el septum superior, una de ellas se introdujo hasta el fondo de la celda y operó como vía de entrada del gas (Ar), mientras que la otra se dejó por encima de la superficie de la solución actuando como vía de salida. De esta manera, se burbujearon las soluciones con el gas inerte durante, aproximadamente, 20 minutos. La disposición de las agujas permite que la presión alcanzada en el interior de la celda sea idéntica a la presión externa (atmosférica), evitando entonces que se genere una condi-

ción de sobre-presión en el interior de la celda. Luego, se extrajeron las agujas, retirando primero la aguja de salida y de esta manera generar una pequeña sobre-presión, luego se retiró la aguja de entrada y se cubrió la parte superior de la celda con *parafilm*, para evitar el intercambio de gases y la consecuente pérdida de anaerobiosis.

Para estudiar el efecto de la variación de la concentración de O₂ en diversos procesos, algunos experimentos se realizaron en soluciones saturadas en O₂. En estas condiciones la concentración de O₂ es, aproximadamente, 5 veces superior a la de las soluciones equilibradas en aire (1,28 mM a 25 °C). Para esto, se procedió al burbujeo de dicho gas de la misma manera que se realizó con el Ar mencionado en el párrafo previo.

Cabe aclarar que durante los burbujeos, también se elimina el CO₂ presente en la solución, el cual está en equilibrio con H₂CO₃ (ácido débil que, en solución acuosa, se encuentra parcialmente disociado) (reacciones 42, 43 y 44).



Por lo tanto, cuando se elimina el CO₂, los equilibrios de las reacciones 42, 43 y 44 se desplazan hacia la izquierda, disminuyendo así la concentración de protones, con la consecuente alcalinización de la solución. Teniendo en cuenta que las propiedades espectrales de las pterinas cambian con el pH (Sección 3.3) se utilizó esta propiedad como un indicador indirecto del pH de la solución. Se tomaron los espectros de absorción de las soluciones antes y después de burbujear el gas inerte, para asegurar que se mantuviera la forma ácido-base del derivado pterínico deseada para el experimento que se iba a realizar.

Para evitar que la solución cambie su concentración, ya que un burbujeo por tiempos prolongados puede provocar la pérdida de cantidades substanciales de solvente por arrastre de moléculas de H₂O con la corriente de gas. Los gases que inicialmente se encuentran libres de H₂O se hicieron pasar por una trampa de agua para saturar el gas con dicha sustancia antes de burbujear el gas en la solución y se controló la concentración de las soluciones a partir de la medida de los espectros de absorción antes de después del burbujeo.

5.3 IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE LAS SOLUCIONES

5.3.1 Sistemas de irradiación

Para la irradiación estacionaria de las soluciones en todos los experimentos se utilizaron lámparas *Rayonet Photochemical Reactor Lamp*, RPR 3500 A, fabricadas por la empresa *Southern N. E. Ultraviolet Co.* Estas lámparas emiten radiación de 350 nm, con un ancho

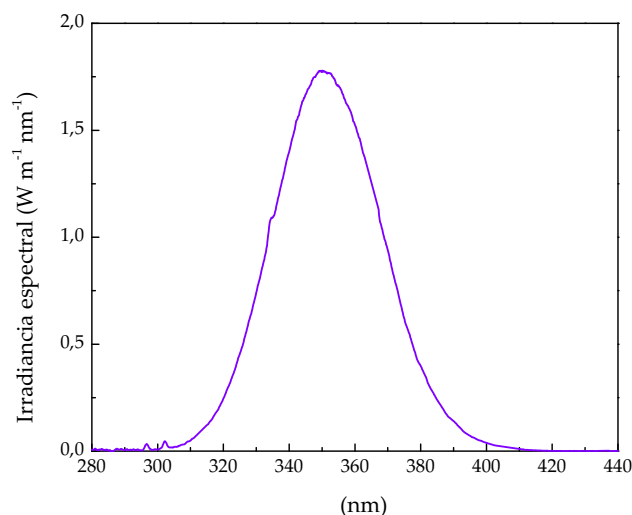


Figura 32: Espectro de emisión de la lámpara RPR 3500 A

total a mitad del máximo (ATMM) de emisión de la lámpara [6] aproximado de 20 nm (Figura 32).

En general se trabajó con dos sistemas de irradiación de diferente geometría, lo cual dependió principalmente del sustrato utilizado en los experimentos de fotosensibilización.

- Sistema de irradiación I: una sola lámpara Rayonet RPR 3500 A. En general se utilizaron celdas de absorción de cuarzo (*Hellma*) de dimensiones 10 por 4 mm y capacidad volumétrica de 1400 l. La distancia a la lámpara fue de tres centímetros medidos desde la cara exterior de la celda hasta la lámpara y se irradió en general con un camino óptico de 10 mm y sólo en algunos casos particulares con 4 mm. Las soluciones contenidas en las celdas se homogeneizaron usando un agitador magnético. De esta manera se logró una mejor distribución de los reactivos y fotoproductos en el seno de la solución, evitando la acumulación de estos últimos en la zona cercana a la cara irradiada de la celda. Este sistema de irradiación se utilizó con los nucleótidos púricos dGMP y dAMP.
- Sistema de irradiación II: tres lámparas Rayonet RPR 3500 A dispuestas alrededor de una celda de fluorescencia de 10 por 4 mm, dos lámparas colocadas irradiando por camino óptico 4 mm y la restante por camino 10 mm. En este tipo de sistema no fue necesario la agitación de la solución debido a que la radiación proviene de todas las direcciones, de esta manera se considera que la solución está siendo irradiada de forma completa y homogénea. Este sistema de irradiación se utilizó con el nucleótido de pirimidina, dTMP.

Ambos sistemas se ubicaron dentro de una “caja negra”, para evitar el ingreso de luz proveniente desde el exterior. El tiempo de irradiación (t_{irr}) fue medido con un cronómetro de disparo manual a partir del instante en que se enciende la lámpara. La geometría del dispositivo se mantuvo sin modificaciones dentro de cada experimento. Además, se

mantuvo invariable la posición relativa de la celda respecto de la lámpara entre distintos experimentos de fotólisis. El volumen de solución irradiado siempre fue el mismo en todos los experimentos, igual a 1000 l. Esto permitió una comparación directa entre resultados de distintos experimentos.

5.3.2 Metodología general para la toma de las muestras

En cada experimento de fotólisis continua, se extrajeron muestras a distintos tiempos de irradiación para su posterior análisis. Con este fin se adoptaron dos procedimientos generales:

- Medidas realizadas sobre la misma alícuota de solución original: se introduce la solución en la celda, se la irradia durante un cierto tiempo, se apaga la lámpara y se realiza la medida. Posteriormente se vuelve a encender la lámpara, se irradia la muestra durante otro período, etc. Se procede así, irradiando y analizando sucesivamente la solución sin sacarla de la celda. Se procedió de esta manera sólo en los estudios espectrofotométricos de las reacciones de fotosensibilización de Bip en ausencia de O_2 , para monitorear la formación de un intermediario que reacciona rápidamente con el O_2 .
- Medidas realizadas sobre distintas alícuotas de la solución original: se introduce una alícuota de la solución en la celda, se irradia durante un tiempo y se retira la totalidad de la muestra para ser procesada. Se vuelve a cargar la celda con solución fresca y se repite la operación irradiando un tiempo distinto esta vez, o el mismo tiempo si lo que se quiere es realizar un duplicado. Este procedimiento se empleó para la mayoría de los experimentos, principalmente para análisis cromatográfico de las soluciones y análisis de productos por espectrometría de masas.

5.4 EXPERIMENTOS EN CONDICIONES ESPECIALES

5.4.1 En presencia de yoduro de potasio

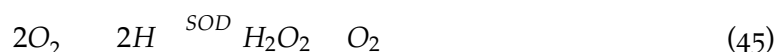
Algunos experimentos se realizaron en presencia de desactivadores específicos de estados excitados. Tal es el caso de algunos iones inorgánicos que actúan como desactivadores de estados excitados de moléculas orgánicas, en un fenómeno que se conoce como efecto del átomo pesado [128]. En el presente trabajo, se utilizó el anión yoduro (I^-) para desactivar los estados excitados de los sensibilizadores estudiados. El anión I^- en ciertas concentraciones desactiva tanto estados excitados singletes como tripletes de las pterinas. Para P_{tr} los valores de la constante de desactivación de S_1 ($k_{q_s} = 9 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) y de T_1 ($k_{q_T} = 4,9 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) son prácticamente iguales [129], pero debido a la diferencia en los tiempos de vida de los correspondientes estados excitados (Sección 4.1), se puede desactivar selectivamente uno u otro estado eligiendo adecuadamente la concentra-

ción de I^* . Por ejemplo, una concentración de 0,1 M es suficiente para desactivar el 90% de S_1 , mientras que para desactivar el mismo porcentaje de T_1 la concentración es igual a 500 M. Considerando que los demás derivados pterínicos oxidados presentarán un comportamiento similar se utilizaron concentraciones de KI en el intervalo comprendido entre 500 y 300 M. En estas condiciones casi todos los estados tripletes son desactivados por el I^* , mientras que la desactivación de los singletes es menor al 2%.

El procedimiento general de estos experimentos implica la irradiación continua de soluciones acuosas del sensibilizador y el sustrato en presencia y en ausencia de KI en idénticas condiciones experimentales (pH, geometría, intensidad de radiación, concentraciones de reactivos, etc). Luego se compararon las velocidades de consumo de reactivo en ambas condiciones. En términos generales, si el estado excitado triplete del sensibilizador es responsable del proceso fotoquímico, en la irradiación en presencia de yoduro se observará un inhibición de dicho proceso.

5.4.2 En presencia de superóxido dismutasa

Para estudiar la posible participación O_2 en el mecanismo de las reacciones estudiadas, se irradiaron soluciones en presencia de SOD. Esta enzima cataliza la dismutación del O_2 en H_2O_2 y O_2 , eliminándolo del medio de reacción (reacción 45).



Para la preparación de las soluciones con SOD, utilizó una solución concentrada de la enzima (1000 U/ml) preparada a partir de una cierta masa del sólido disuelto en agua, se fraccionó la solución madre en alícuotas de 500 l y se congelaron para su posterior uso. Se comprobó la estabilidad de la enzima antes y después de ser congelada. En el momento de su uso, se descongeló, se tomó una alícuota y se agregó a la mezcla que contenía el sensibilizador y el sustrato a estudiar. Para todos los experimentos donde se utilizó SOD la concentración fue de 50 U/ml, concentración suficiente para eliminar todo el O_2 del medio.

Realizando irradiaciones de las soluciones que contienen el sensibilizador, el sustrato y SOD, en idénticas condiciones experimentales, en comparación con soluciones de igual concentración pero sin el agregado de SOD, se puede evaluar la participación de O_2 en el proceso fotosensibilizado. Esto se consigue comparando las velocidades iniciales de consumo de reactivo para la reacción fotosensibilizada en presencia y ausencia de SOD.

5.4.3 En H_2O y D_2O

El reemplazo del agua común por D_2O , o agua pesada, disminuye la velocidad de desactivación del 1O_2 aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. El resultado es que el tiempo de vida del 1O_2 () en D_2O es mayor que en H_2O (H_2O 3 s y D_2O 63 s) [130, 131, 132]. Esta característi-

ca se puede utilizar para evaluar la participación de esta especie reactiva en un proceso fotosensibilizado. Para esto, se prepararon soluciones con las mismas concentraciones de sensibilizador y de sustrato en D₂O y H₂O (Subsección 5.2.2) y se irradiaron en las mismas condiciones para luego comparar las velocidades de consumo del sustrato. Debido a la diferencia en el ϵ en ambos solventes, se esperara un aumento en la velocidad de consumo de sustrato de aproximadamente un orden de magnitud mayor en D₂O en comparación a H₂O, si el proceso se lleva a cabo exclusivamente por una reacción química entre el ¹O₂ y el sustrato.

5.5 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO

Si se tiene una solución en la cual la única especie química que absorbe radiación, a determinada λ , es un soluto, la ley de Lambert-Beer se puede expresar según la ecuación 46,

$$q_{p,\lambda} = q_{p,\lambda}^0 (1 - 10^{-\epsilon l C}) \quad (46)$$

donde $q_{p,\lambda}$ es el flujo fotónico absorbido por el soluto que se encuentra en la solución con una concentración molar C a una determinada λ , $q_{p,\lambda}^0$ es el flujo fotónico incidente, ϵ es el coeficiente de absorción molar a λ y l es el camino óptico. $q_{p,\lambda}$ es igual al número de fotones (cuantos, N) por unidad de tiempo, ($\frac{N}{t}$, expresión simplificada: $q_{p,\lambda} = \frac{N}{t}$, cuando el número de fotones es constante a lo largo del tiempo considerado). La unidad en el sistema internacional (SI) es s⁻¹. El término se puede utilizar, alternativamente, con la cantidad de moles de fotones (einsteins), siendo entonces sus unidades en SI mol s⁻¹ [133]. En fotoquímica es más útil el parámetro densidad de flujo fotónico ($q_{p,\lambda}^V$), que puede definirse como el número de fotones absorbidos por el soluto por unidad de tiempo y por unidad de volumen [133]. Si "V" es el volumen de la solución, la relación entre $q_{p,\lambda}$ y $q_{p,\lambda}^V$ viene dada por la ecuación 47.

$$q_{p,\lambda}^V = \frac{q_{p,\lambda}}{V} \quad (47)$$

El ϕ para una reacción fotoquímica se define como el cociente entre la cantidad de reactivo consumido o de producto formado y número de fotones absorbidos (ecuación 48) [6].

$$\phi = \frac{\text{cantidad de reactivo consumido o de producto formado}}{\text{cantidad de fotones absorbidos}} \quad (48)$$

Si se mide la velocidad de desaparición de un reactivo (R/t) o la velocidad de aparición de un producto (P/t) puede calcularse el rendimiento cuántico de una reacción mediante las ecuaciones 49 y 50.

$$R = \frac{R/t}{q_{p,\lambda}^V} \quad (49)$$

$$P = \frac{R/t}{q_{p,}^V} \quad (50)$$

En el presente trabajo de tesis, las velocidades R/t y P/t se calcularon a partir de la determinación de las concentraciones de reactivos y productos realizadas con la técnica cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El otro parámetro que es necesario determinar es $q_{p,}^V$, para lo cual es imprescindible conocer $q_{p,}^0$ ó la densidad de flujo fotónico incidente ($q_{p,}^{0,V}$), que es igual al flujo fotónico incidente por unidad de volumen ($q_{p,}^0/V$).

Este último parámetro se determinó mediante una actinometría, cuyo procedimiento se describirá en la siguiente sección. Es importante destacar que $q_{p,}^0$ va a depender de factores geométricos, tales como la distancia de la lámpara a la celda, las dimensiones de la celda, camino óptico de irradiación, etc. Por esta razón en todos los experimentos en los cuales se empleó el valor de $q_{p,}^0$ para realizar cálculos, la geometría del sistema se mantuvo igual a la del experimento de actinometría.

En el caso particular de las reacciones fotosensibilizadas, se obtuvieron las velocidades de consumo de reactivo o sustrato sensibilizado en intervalos de tiempo en los cuales se cumplieran ciertas condiciones. Por un lado, que la absorbancia del sensibilizador utilizado no cambie significativamente en el rango de tiempo de trabajo, con lo cual se pretende que la cantidad de luz absorbida por unidad de tiempo sea aproximadamente constante. Por otro lado, que la absorbancia de los productos a la λ_{exc} sea despreciable respecto a la del sensibilizador. Esta condición asegura que la luz que llega a la solución es absorbida sólo por el sensibilizador, siendo válida la ecuación 46. En el caso en el que el sensibilizador utilizado no sea fotoquímicamente estable, la primera condición se puede cumplir eligiendo un intervalo de tiempo en donde el consumo del sensibilizador no supere el 20%. De lo contrario, si los fotoproductos del propio sensibilizador absorben radiación a la λ_{exc} , se observará un cambio en la velocidad de consumo, que podrá ser mayor o menor dependiendo de la eficiencia de dichos fotoproductos como sensibilizadores del sustrato.

5.6 ACTINOMETRÍA

Para determinar $q_{p,}^0$ se utilizó *Aberchrome 540* (Aberchromics Ltd.) [8] como actinómetro químico. Este compuesto es el anhídrido del ácido (E)-(2,5-dimetil-3-furiletiliden) (isopropiliden) succínico (DFIS), que al ser irradiado con una longitud de onda entre 310 y 370 nm adquiere un color rojo intenso correspondiente al 7,7a-dihidro-2,4,7,7a-pentametilbenzo[b]furano (7,7a-DHBF). Este producto posee una banda de absorción entre 436 y 546 nm y, si es excitado en este intervalo, la reacción ocurre en sentido inverso. En la [Figura 33](#) se presentan las estructuras químicas de las dos especies y sus respectivos espectros de absorción.

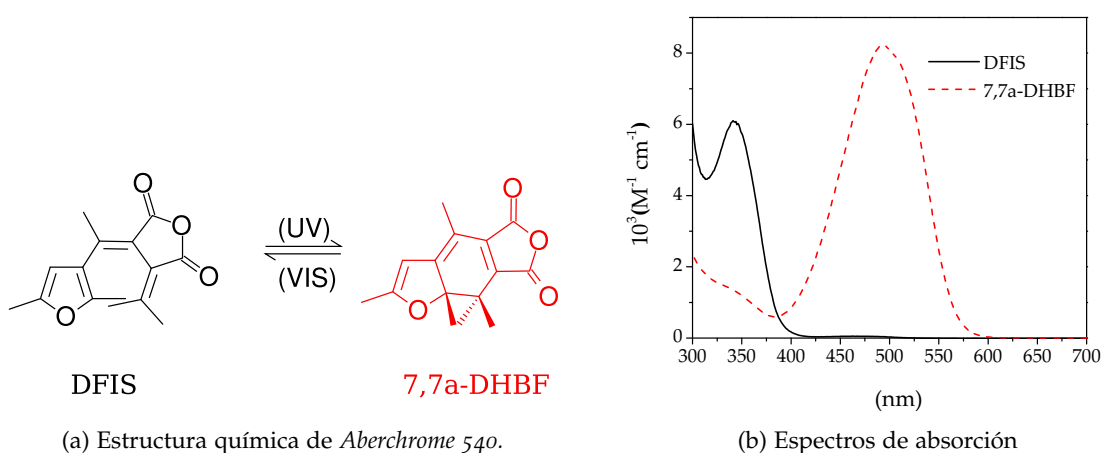


Figura 33: Estructura química de *Aberchrome 540* y espectros de absorción de los dos isómeros usando tolueno como solvente.

El *Aberchrome 540* puede utilizarse en distintos solventes, pero en este caso se utilizaron soluciones de tolueno. La λ_{max} del máximo de absorción del DFIS no depende de la naturaleza del solvente ($\lambda_{max DFIS} = 343nm$; $\epsilon_{DFIS} = 6077 M^{-1}cm^{-1}$). Por el contrario, la λ_{max} del máximo de absorción del 7,7a-DHBF varía considerablemente según el solvente en el que se encuentra disuelto ($\lambda_{max DHBF} = 494nm$; $\epsilon_{DHBF} = 8200 M^{-1}cm^{-1}$ en tolueno). En el UV, la actinometría se realiza preparando una solución de DFIS, irradiando a distintos tiempos y siguiendo la absorbancia del 7,7a-DHBF a 494 nm (λ_{max}) en función del tiempo. En cambio, a λ mayores, el isómero que se irradia es el 7,7a-DHBF. La q_p^V se puede calcular a partir de la ecuación 51,

$$q_p^V = \frac{7,7a \text{ DHBF}}{t} \frac{1}{A_c} \quad (51)$$

donde A_c es el rendimiento cuántico del actinómetro, cuyo valor es 0,2 para la conversión de DFIS a 7,7a-DHBF por radiación UV y es independiente del solvente usado.

Según la Ley de Lambert-Beer:

$$7,7a \text{ DHBF} = \frac{A^{494}}{\epsilon_{494} l} \quad (52)$$

donde A^{494} es la absorbancia a 494 nm, $\epsilon_{494} = 8200 M^{-1}cm^{-1}$ (en tolueno) y l es el camino óptico de la celda en la cual se mide la absorbancia. Por lo tanto, la ecuación 51 se puede expresar de la siguiente manera:

$$q_p^V = \frac{A^{494} / t}{\epsilon_{494} l} \frac{1}{A_c} \quad (53)$$

Para determinar q_p^0 , en el intervalo de 310-370 nm, se irradió el actinómetro en la misma celda donde se realizaron los experimentos de irradiación continua y con el mismo camino óptico y volumen de muestra durante diferentes intervalos de tiempo, para cada

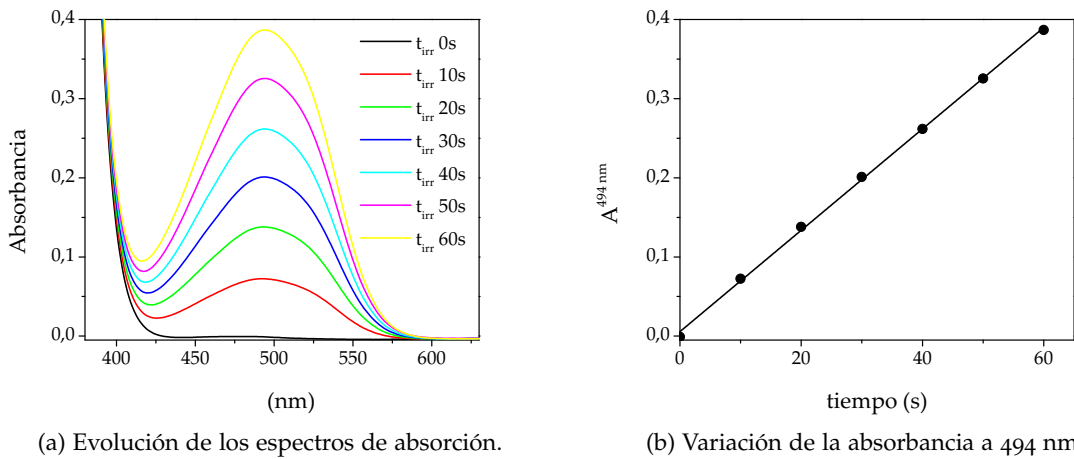


Figura 34: Evolución de los espectros de absorción de una solución de *Aberchrome 540* irradiada con una lámpara Rayonet RPR 3500 A; y la variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación; $l = 1\text{ cm}$.

uno de los cuales se midió la absorbancia a 494 nm. Luego se graficó A^{494} en función del tiempo de irradiación, se realizó la regresión lineal de los datos y se obtuvo la pendiente de la recta. Utilizando la ecuación 53 se calculó $q_{p,}^V$. En la Figura 34 se muestran los espectros de absorción obtenidos al irradiar el DFIS con una celda de camino óptico 1 mm y una lámpara Rayonet RPR 3500 A separa 3 cm de la celda.

Cuando más del 99,9 % de la luz es absorbida por el actinómetro, se puede suponer que $q_{p,}^V$ es aproximadamente igual a $q_{p,}^{0,V}$. De lo contrario, debe realizarse el cálculo empleando la ecuación 46. Este parámetro depende siempre de factores geométricos, como el tamaño de la celda, la distancia comprendida entre ella a la lámpara, etc. Consecuentemente, para cada geometría de irradiación utilizada es necesario tener el dato de la actinometría correspondiente.

ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES IRRADIADAS

Para seguir la evolución de los procesos fotoquímicos estudiados en el presente trabajo de tesis las soluciones sometidas a irradiación continua, según lo expuesto en el Capítulo 5, fueron analizadas empleando diferentes técnicas: i) espectrofotometría UV-visible; ii) HPLC, acoplada a un PDA y un FL; iii) espectrometría de masas (MS). Este conjunto de técnicas fue utilizado en la identificación, caracterización y cuantificación de reactivos y productos de reacción, como así también para obtener información sobre los mecanismos de reacción involucrados.

6.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

Esta técnica analítica está basada en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra. La absorción de la radiación varía con la longitud de onda de la radiación dependiendo de la composición química de la muestra y es directamente proporcional a su concentración. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto, pero es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, las distintas formas ácido-base de una misma sustancia pueden claramente ser distinguidas por las diferencias en sus espectros de absorción.

En este trabajo de tesis, los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron con los siguientes espectrofotómetros: UV-1800 (*Shimadzu*) y S2000 (*Ocean Optics*). Estos equipos permiten obtener espectros en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 900 nm. El primero de los equipos mencionados es un espectrofotómetro de barrido de doble haz, con alta sensibilidad; mientras que el equipo *Ocean Optics* tiene detección por arreglo de diodos de simple haz. Este equipo es menos sensible y preciso que el primero, pero tiene la ventaja de dar una respuesta muy rápida. Ambos poseen programas adecuados para registrar y almacenar los espectros. Los espectros se realizaron utilizando H₂O como blanco. Para las medidas, se emplearon celdas de cuarzo (*Hellma*) de 4 ó 10 mm de camino óptico, que se eligieron según la absorbancia de la muestra.

Durante los experimentos de irradiación continua se registraron los espectros de absorción a distintos tiempos. Cambios en los espectros de absorción durante un proceso indican inequívocamente una transformación química. Para reacciones fotosensibilizadas, y en el caso particular donde el sensibilizador no se consume durante la irradiación, si se observan cambios en los espectros de absorción en la región donde absorbe el sustrato, se puede afirmar que, efectivamente tiene lugar una reacción fotosensibilizada. Los datos obtenidos por esta técnica se utilizaron para realizar gráficos y análisis principalmente

de Absorbancia vs. tiempo, para una dada λ , que permite evaluar aspectos cinéticos del proceso.

6.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA Y FLUORIMÉTRICA

HPLC es una técnica que se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en distintos tipos de interacciones químicas o físicas generadas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En esta técnica, el compuesto atraviesa la columna cromatográfica (fase estacionaria) mediante el bombeo del solvente (fase móvil). Como la fase estacionaria está compuesta por partículas pequeñas densamente empaquetadas, ofrece gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo cual se requiere una alta presión para que el solvente fluya a una velocidad adecuada. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se llama tiempo de retención (t_r), el cual depende de la naturaleza misma del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. Se denomina cromatograma a la gráfica de la señal en función del tiempo de corrida. Esta señal es un valor dado en unidades arbitrarias (u.a.). En el caso de utilizar detector PDA, la señal es proporcional a la absorbancia de la solución a la longitud de onda seleccionada. También se pueden utilizar otras propiedades para la detección, tales como la fluorescencia, el índice de refracción, o la conductividad, entre otras. En este trabajo se utilizó esta técnica con dos objetivos fundamentales: para obtener los perfiles de concentración de consumo de reactivo y formación de productos que tienen lugar a lo largo de una reacción, y para identificar productos de reacción.

Para estas medidas se empleó un equipo *Shimadzu Prominence LC-20A* (Figura 35). Este equipo cuenta con un módulo de distribución de solventes (LC-20AT), un desgasificador en línea (DGU-20A5), un módulo controlador (CBM-20), un inyector programable (SIL-20A HT), un horno (CTO-10AS-VP). Este equipo cuenta con dos sistemas de detección acoplados al equipo. Uno de ellos es un detector espectrofotométrico UV/VIS (SPD-M20A, Shimadzu), el cual permite hacer un monitoreo a todas las λ entre 200 y 800 nm. El segundo, es un detector de emisión de fluorescencia (RF-M20A) que permite fijar la λ_{exc} entre 300 y 600 nm, la señal de emisión se puede registrar a dos longitudes de onda simultáneamente en un rango comprendido entre 300 y 800 nm. El equipo posee un programa de adquisición de datos (*LC Solution*) que permite registrar y analizar las señales provenientes de ambos detectores y extraer los espectros de absorción de cada uno de los productos obtenidos con el detector PDA.

En los diferentes ensayos se usó una columna de fase reversa, Synergi 4 μ m POLAR-RP 80A (150 \times 4,6 mm, 4 mm, Phenomenex). La fase estacionaria posee grupos fenilo unidos con una función éter a las partículas con protección hidrofílica diseñada para maximizar la retención y la selectividad de los analitos polares y aromáticos. Su principal ventaja reside en que es una columna mucho más estable para realizar corridas en las cuales la fase móvil tiene un alto porcentaje de fase acuosa. Como fase móvil, se utilizaron distintas



Figura 35: Fotografía del equipo HPLC Shimadzu Prominence LC-20A: (A) PC y *software* para el análisis de los datos (*LC Solution*) (B) desgasificador; (C) módulo de distribución de solventes; (D) módulo controlador; (E) detector de fluorescencia (FL); (F) detector UV/vis (PDA); (G) inyector programable; (H) horno y columna.

mezclas según los compuestos a analizar. A continuación se expresa la composición de dichas mezclas como relación de volúmenes y el pH corresponde a la solución acuosa antes mezclarse con el solvente orgánico:

- Fase móvil I: 97 % 25 mM Ácido fórmico y 3 % metanol, pH = 3,2 a flujo 1 ml/min.
- Fase móvil II: 100 % 25 mM Ácido fórmico pH = 3,2 a flujo 1 ml/min.

Para la cuantificación de las sustancias separadas por esta técnica, se realizaron curvas de calibración empleando soluciones patrón. Se prepararon las soluciones de mayor concentración por pesada y luego se prepararon soluciones de menor concentración por dilución con H₂O y se inyectó siempre el mismo volumen en el HPLC. A partir de los cromatogramas se integró el área de los picos y se construyeron curvas de área en función de la concentración. A estas se le aplicó una regresión lineal de la cual se obtuvo una pendiente, cuyo valor sería posteriormente utilizado como factor de conversión. Las curvas de calibración se realizaron para todas las sustancias que se necesitaba cuantificar y en las mismas condiciones de corrida en las cuales se realizaron luego los distintos experimentos de fotosensibilización. El programa de adquisición de datos, *LC Solution*, con el cual cuenta el equipo permite realizar las curvas de calibración y calcular la concentración de los picos cromatográficos automáticamente.

6.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se utiliza para determinar con gran precisión la masa de ciertos compuestos y, por consiguiente, ayudar a su identificación. El espectrómetro de masas genera la ionización de moléculas que luego, mediante un campo eléctrico y/o magnético, se separan en función de su relación masa/carga (m/z). Cuando este haz de iones formado alcanza el detector produce un patrón específico, que permite caracterizar el compuesto bajo análisis.

La cámara o fuente de ionización es el elemento que convierte los componentes de una muestra (analito) en iones, obteniéndose así un haz de iones positivos o negativos. Existen distintos tipos de fuentes de ionización, en este caso, el equipo utilizado posee ionización electrospray (ESI). En este tipo de fuente se producen grandes gotas cargadas por “nebulización neumática”; por ejemplo, cuando se fuerza a pasar la solución del analito a través de una aguja, donde al final de ésta se aplica un potencial; el potencial usado es suficientemente alto para dispersar la solución que sale en pequeñas finas gotas cargadas todas a la misma polaridad. El solvente se evapora, disminuyendo el volumen de la gota y aumentando la concentración de la carga en la superficie de la gota. Eventualmente, en el límite de Rayleigh, la repulsión culómbica supera la tensión superficial de la gota y ésta explota. Esta explosión culómbica forma una serie de gotas más pequeñas y menos cargadas. El proceso de disminución de volumen seguido de la explosión se repite hasta que se logran formar iones individuales cargados del analito “puro”. Las cargas están estadísticamente distribuidas en todos los sitios de carga disponibles del analito, dando lugar a la posible formación de múltiples iones cargados en las condiciones correctas. Aumentar la velocidad de evaporación del analito introduciendo un flujo de gas desecante a contra corriente a los iones aumenta el grado de cargado múltiple.

Luego, los iones pasan al analizador de masas, donde su trayectoria o velocidad son afectadas mediante un campo eléctrico o magnético. El dispositivo más utilizado para tal fin es el cuadrupolo, que posee un conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras. Cada par de barras opuestas se conectan a un polo positivo y a un polo negativo y se aplica un potencial de voltaje variable de corriente alterna. Esto hace que los iones dentro de un intervalo limitado de valores de m/z , circulen con una trayectoria rectilínea y lleguen al detector. El centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente. Otro analizador utilizado es el tiempo de vuelo (TOF) (por su nombre en inglés, *time of flight*), donde la separación se genera fundamentalmente por las distintas velocidades de vuelo de los iones y el tiempo que tardan en llegar al detector. El espectrómetro de masas TOF es el más simple de los analizadores de masas y tiene una muy alta sensibilidad en virtualmente un rango ilimitado de masas. Los iones de la muestra se generan en una zona fuente, en el equipo, por cualquiera de los métodos de ionización. Un potencial V se aplica a lo largo de toda la fuente para extraer y acelerar los iones de la fuente hacia la zona libre de

campo. En un caso ideal, todos los iones producidos saldrán de la fuente al mismo tiempo con la misma energía cinética, debido a que fueron acelerados por la misma diferencia de potencial. En este caso, los iones analizados por la técnica TOF, dependerán solamente de la masa y de la carga producida en el ion. Descartando el tiempo de extracción de la fuente, la fórmula básica para el análisis de masas por TOF está dada por la ecuación 54,

$$\frac{m_i}{z_i} = 2eEl_s \frac{t_i}{l_d}^2 \quad (54)$$

donde m_i es la masa del ion del analito, z_i es la carga del ion del analito, E es el campo de extracción, t_i es el tiempo de vuelo del ion, l_s es la longitud de la fuente, l_d es la región libre de campo magnético y e es la carga electrónica ($1,6022 \cdot 10^{-19}$ C). Finalmente, el detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ión pasa cerca o golpea una superficie. Generalmente, se utiliza un cierto tipo de multiplicador de electrones (electromultiplicador), cuyo funcionamiento se basa en el efecto cascada producido al impactar un determinado ion (o iones) en el mismo.

La técnica de MS puede ser utilizada en tándem, donde el término “tándem” indica el uso de una segunda etapa de análisis de masas en el mismo experimento. Esto da lugar a la capacidad de estudiar selectivamente iones específicos en una mezcla compleja para obtener información estructural sobre ese ion. Acoplando dos analizadores, separados por una cámara de colisiones se puede obtener más información de la molécula. El primer analizador se usa para seleccionar el ion de interés. Este ion se hace pasar luego hacia la cámara de colisiones, la cual, usualmente se encuentra presurizada con un gas inerte. La colisión del ion con los átomos en la cámara pueden inducir la disociación del ion. A este proceso se le conoce como Disociación Inducida por Colisión (CID). El ion original se le llama “ion precursor” y a los iones disociados se les conoce como “iones producidos”. Estos iones producidos luego se analizan en el segundo espectrómetro de masas dando lugar a un espectro de masas de iones producidos del ion original. Estos análisis se conocen como MSⁿ en donde “n” significa el número de etapas de análisis de masas. Un espectro MS² o MS/MS de iones producidos contiene dos etapas de análisis. Los espectros MS/MS proporcionan información estructural mediante el establecimiento de relaciones entre los iones precursores y sus fragmentos producidos por las colisiones.

En este trabajo se utilizó un espectrómetro de masas en tándem, MS/MS, acoplado a un equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) (*Ultra Performance Liquid Chromatography*). El equipo MS/MS utilizado XevoG2QTof (Waters) está acoplado a un UPLC (Waters), se operó con una columna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (1,7 mm; 2,1 x 100 mm) y solvente de corrida (Sección 6.2 I y II). La ionización ESI fue utilizada en modo positivo (*ESI*⁺) y negativo (*ESI*⁻). Los voltajes del capilar, cono y lentes RF fueron de 3,5 kV, 35 V y 40 V, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C y la de desolvatación fue de 150 °C. La energía del gas de colisión (Ar) se fijó en 10 eV. Se utilizó N₂ como gas nebulizador. El analizador cuadrupolo (MS₁) posee una alta resolución y estabilidad, más pre-filtros para maximizar la resolución y la transmisión, mientras que previene de la contaminación. El analizador de masas TOF (MS₂) de alto

rendimiento, por su parte, es capaz de detectar un valor de m/z con incertidumbre en el 4 decimal. Los datos se adquirieron y analizaron con el programa Masslynx 4.1 (Waters).

La técnica de UPLC utiliza una nueva tecnología de partícula para cromatografía líquida, un diseño de columnas, inyector, bombas y detectores diferentes capaces de trabajar a muy alta presión. La combinación en las prestaciones de las columnas rellenas de material híbrido con tamaño de partícula inferior a $2 \mu m$ y la capacidad del sistema UPLC de suministrar la fase móvil a alta presión y con una mínima dispersión produce como resultado picos más estrechos y más concentrados. Este equipo, además de los detectores de MS en tándem, posee acoplados un detector UV-vis que trabaja a una longitud de onda fija. Los cromatogramas en este equipo, entonces, corresponden a gráficas de absorbancia en función del tiempo de corrida, o bien con el detector de MS se puede generar un cromatograma de la intensidad de la señal detectada, para un valor de m/z fijo, como función del tiempo de corrida. Ambas intensidades son directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

En el presente trabajo de tesis se realizaron experimentos para la caracterización foto-física de los sensibilizadores, para estudiar la interacción de estados excitados con los sustratos, y para detectar la formación y consumo de intermediarios de reacción. Para ello se utilizaron técnicas espectroscópicas avanzadas, que se pueden dividir en dos grandes grupos: i) espectroscopía de emisión (estacionaria, y con resolución temporal); ii) espectroscopía de absorción triplete-triplete por fotólisis de destello laser con resolución temporal.

7.1 ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN

7.1.1 Descripción del equipo

Las medidas de emisión de fluorescencia, fosforescencia en región visible a 77 K, y las medidas de emisión de fosforescencia del oxígeno singlete a temperatura ambiente en la región del infrarrojo cercano (NIR), registradas en modo estado estacionario y con resolución temporal se realizaron empleando un espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon (Figura 36). Este fluorómetro emplea la técnica recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC), por su nombre en inglés *Time-Correlated Single Photon Counting*. Es un equipo modular en forma de "T" (Figura 37), cuenta con tres monocromadores, uno de excitación y dos de emisión, esto a su vez permite la disposición de tres detectores diferentes que permite registrar la emisión en un amplio rango espectral y trabajar en distintas escalas de tiempo. En la Figura 36 se muestran los distintos componentes del equipo, los cuales se pueden dividir de la siguiente manera:

- **fuentes de excitación:** (A-1) lámpara de Xenón estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xenón pulsada (UV *xenon flash tube*) y (B) LEDs pulsados (NanoLEDs de 340 y 460 nm y SpectraLED de 370 y 560 nm);
- **monocromadores:** (C) de excitación (330 nm blaze grating), (D) de emisión en la región del NIR (1000 nm blaze grating); y (E) de emisión para el UV-visible (iHR320, con dos redes de difracción, 330 y 500 blaze).
- **detectores:** (F) diodo de referencia para monitorear la intensidad de la lámpara de Xe luego de pasar por el monocromador C, (G) R-928 para medidas estacionarias en el UV-visible (entre 240-850 nm), (H) TBX-04 para medidas rápidas en el UV-visible (entre 182-650 nm), y (I) Hamamatsu H10330-45 para medidas en el NIR (entre 950-1700 nm).

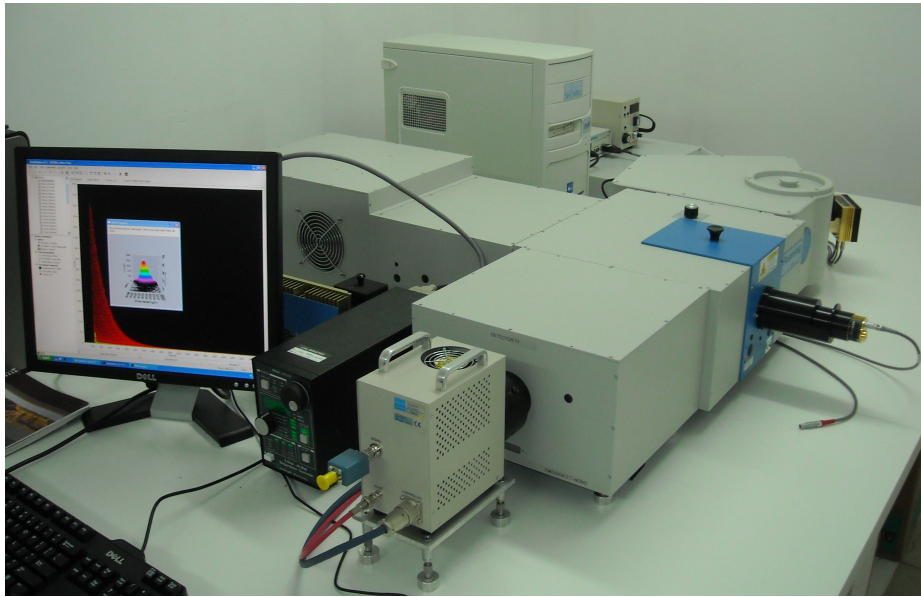


Figura 36: Fotografía del espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon.

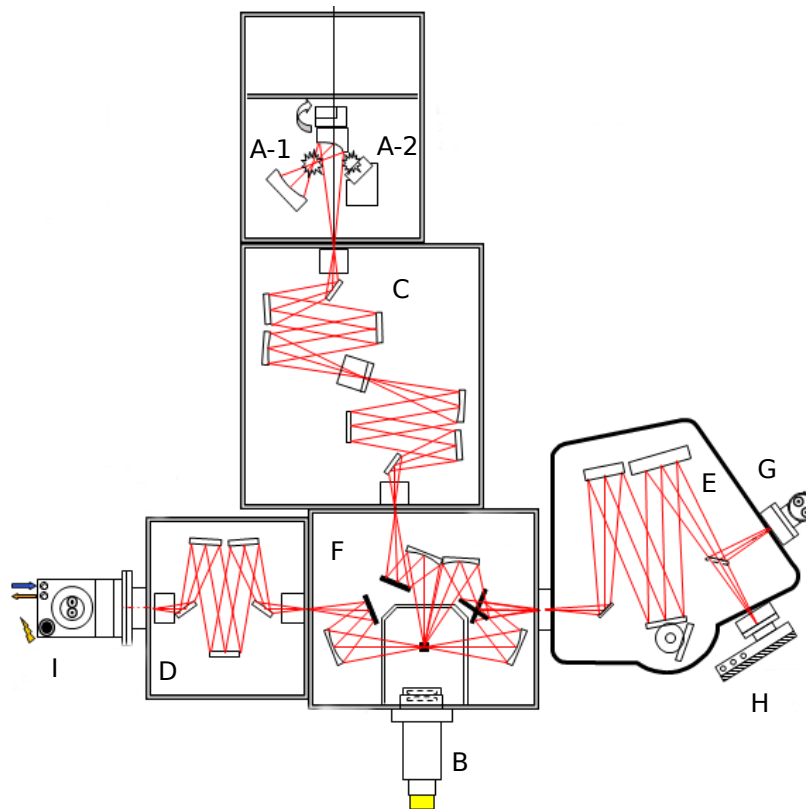


Figura 37: Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorómetro (FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon). Partes: (A-1) lámpara de Xe estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xe pulsada, (B) LED, (C) monocromador de excitación, (D) monocromador de emisión en la región del NIR, (E) monocromador de emisión UV-visible, (F) detector de referencia, (G) detector R-928, (H) detector TBX-04, y (I) detector Hamamatsu H10330-45.

7.1.2 Fluorescencia

7.1.2.1 Espectros de emisión en estado estacionario

La emisión se observa cuando una molécula excitada pierde el exceso de energía en forma radiativa (Capítulo 1). Un espectro de emisión es un registro de la intensidad de la emisión como función de la longitud de onda y depende de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma está disuelta [2]. Los espectros de emisión, al igual que los espectros de absorción, dan información relacionada con los niveles de energía de los orbitales de las moléculas, y permiten, por ejemplo, estimar la diferencia de energía entre los estados electrónicos involucrados en una transición. Como se explicó en el Capítulo 1, hay dos formas de emitir radiación desde un estado excitado, fluorescencia y fosforescencia. La primera corresponde a transiciones sin cambio de multiplicidad de espín, mientras que la segunda a transiciones entre estados de distinta multiplicidad.

Para analizar la emisión de una muestra en el equipo descrito en la Subsección 7.1.1 se utilizó la fuente de excitación A-1 en la región UV-A ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$). La λ_{exc} se selecciona haciendo pasar el haz de luz de excitación por un monocromador (C, Figura 37). La muestra, colocada en celdas de cuarzo, recibe la radiación de excitación en una cara de la misma. Posteriormente a la absorción, la muestra emite radiación en todas direcciones. La radiación emitida perpendicularmente a la dirección del haz de excitación, es dispersada en un monocromador de emisión (E, Figura 37). A la salida del mismo se ubica un detector (G) que mide la cantidad de radiación emitida a una determinada longitud de onda de emisión (λ_{emi}). Para obtener un espectro de emisión se excita la muestra siempre con la misma λ_{exc} y se barre un rango de con la red de λ_{emi} con el monocromador de emisión para que el detector pueda registrar la radiación emitida en función de λ_{emi} .

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en soluciones acuosas. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se registraron los espectros de emisión corregidos (el equipo corrige automáticamente la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión, utilizando el detector G) entre 360 y 650 nm, excitando con radiación de correspondiente a la banda de menor energía de las pterinas (340 nm).

7.1.2.2 Emisión con resolución temporal

En las técnicas resueltas en el tiempo se genera una cierta población de moléculas en estados electrónicamente excitados mediante un pulso de radiación electromagnética. Luego de dicho pulso se estudia alguna propiedad del sistema como una función del tiempo. Tal propiedad puede ser la emisión de un compuesto. De esta manera se pueden estudiar la fluorescencia y la fosforescencia con este tipo de técnicas. El decaimiento de la fluorescencia es generalmente mucho más rápido que el correspondiente al proceso de emisión fosforescente. Ya que en este caso la transición ocurre desde un estado excitado singlete, τ_F es el tiempo de vida de dicho estado. Para medir este parámetro se debe excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de τ_F apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz genera un cierto número de moléculas

en estado singlete excitado (N). La velocidad con que decrece N puede describirse con la ecuación 55,

$$-\frac{dN}{dt} = k_e N \quad (55)$$

donde k_e es la constante de velocidad de emisión espontánea, y es igual a la sumatoria de todas las vías de decaimiento del singlete (Sección 1.1). La integral definida de la ecuación 55 entre cero y un tiempo "t" da como resultado la ecuación 56,

$$N_t = N_0 \exp^{-k_e t} \quad (56)$$

donde N_t y N_0 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 τ_F se define como el tiempo requerido para que la intensidad de fluorescencia disminuya en un factor de $1/e$ de su valor inicial. Esto queda expresado en la ecuación 57,

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (57)$$

Para realizar las medidas de este parámetro se trabajó con el equipo FluoroLog3, y se utilizó como fuente de excitación NanoLEDs con un máximo de emisión a 341 y 460 nm dependiendo de la muestra. Los fotones emitidos por la muestra pasan a través del monocromador de emisión E fijo en 450 nm, y son registrados con el detector H trabajando en el modo TCSPC.

El principio de la técnica TCSPC es la detección de fotones individuales y la medición de sus tiempos de llegada al detector con respecto a una señal de referencia que es, por lo general, la fuente de excitación. TCSPC es un método estadístico por lo tanto, se necesita una fuente de luz pulsada con una alta tasa de repetición (por ejemplo un LED) para acumular un número suficiente de eventos (fotones individuales que llegan al detector) para una precisión estadística de los datos. Para comprender la electrónica necesaria para la técnica de TCSPC se puede hacer un analogía con un cronómetro rápido con dos entradas. El reloj se inicia con el pulso de la señal de la fuente de excitación (*start*) y se detiene con el pulso de la señal del detector (*stop*). El tiempo medido por una secuencia *start-stop* estará representada por un aumento de un valor de memoria en un histograma, en el que los canales en el eje "x" representa el tiempo. El histograma resultante, cuentas vs. canales representarán la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Por razones estadísticas es indispensable asegurar que se detecte un único fotón por evento. Los eventos de fotones múltiples afectarán a la estadística del histograma y por lo tanto generan mediciones erróneas. Para asegurarse que se detecte un sólo un fotón por destello de la fuente de excitación se mantiene baja la tasa de emisión en comparación con la tasa de la fuente de excitación, generalmente 2 % o inferior. Cuando se utiliza una fuente de excitación con un tasa de repetición alta, como en el caso de los NanoLEDs (1 MHz), se utiliza la técnica de

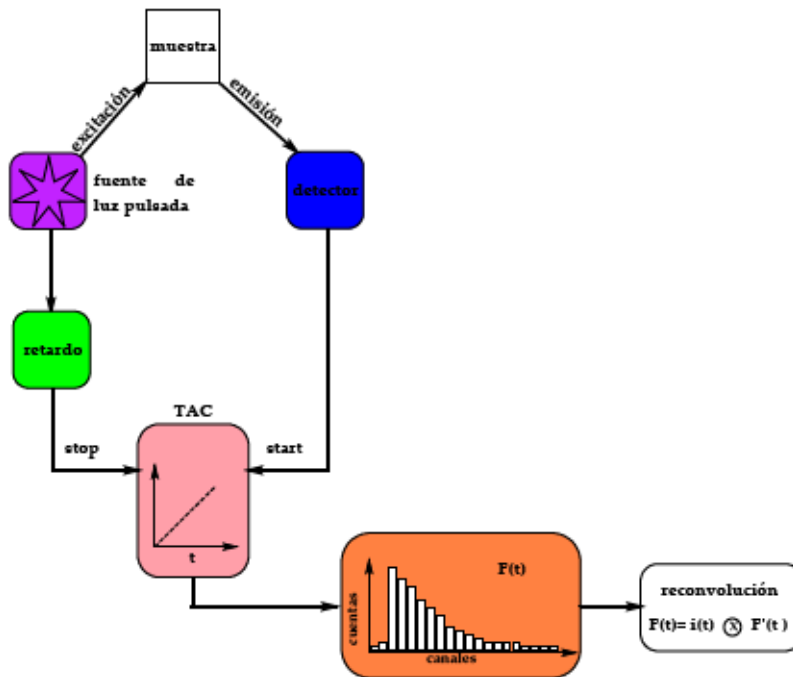


Figura 38: Esquema de TCSPC funcionando en modo reverso.

TCSPC en modo reverso. Donde el cable de señal que lleva la alta tasa de recuento de la fuente de luz de excitación se conecta a la entrada de la señal de *stop* y la tasa de repetición baja está conectada a la señal *start*. El inconveniente es que los pulsos de la referencia de la fuente de luz necesitan estar desplazado un determinado tiempo, este retardo debe ser ligeramente más largo que la escala de tiempo elegido para la medición (Figura 38). La llegada de cada uno de los fotones emitidos se correlaciona con referencia al evento de excitación por un convertidor de tiempo-amplitud, que en esencia convierte la señal en voltaje, el cual es proporcional al tiempo transcurrido entre cada ciclo *start-stop*. Luego un analizador multi-canal almacena la señal y construye el histograma de la distribución de los fotones en el tiempo, que es equivalente a decaimiento de la fluorescencia. Este histograma típicamente posee varios miles de fotones.

Una vez generada la señal de cuentas en función de tiempo, para la determinación de los parámetros cinéticos a partir del decaimiento es necesario tener en cuenta la respuesta temporal del instrumento. Esto se consigue registrando el perfil temporal de la fuente de excitación (*prompt*) utilizando como muestra un solución que disperse la luz, colocando el monocromador de emisión a la misma longitud de onda de la fuente de excitación y manteniendo todos los demás parámetros instrumentales iguales a los de la muestra. Esta respuesta instrumental corresponde a una función $P(t)$. El programa utilizado para el análisis de datos (DAS6) provisto por el equipo, combina datos la señal de la muestra, $F(t)$ y $P(t)$. Mediante el método estadístico de convolución de mínimos cuadrados calcula la función $i(t)$ que ajusta mejor a los datos del decaimiento de la señal, $F(t)$, aplicando la ecuación 58, donde \otimes representa la convolución entre las funciones $P(t)$ y $i(t)$.

$$F(t) = \sum_{i=1}^n P_i \exp(-\lambda_i t) \quad (58)$$

El mejor ajuste genera un valor cercano a 1 del parámetro estadístico chi cuadrado (χ^2). En el caso de que la muestra contenga una única especie emisora, $I(t)$ será monoexponencial (ecuación 56), pero el método de cálculo del programa permite el uso de funciones multiexponenciales de hasta 5 componentes.

7.1.2.3 Espectros de emisión con resolución temporal

El procedimiento de medición de los espectros de emisión con resolución temporal (TRES) o por su nombre en inglés, *time-resolved emission spectra*, consiste en registrar decaimiento de la señal de emisión de fluorescencia en función del tiempo a una determinada λ_{emi} y a una λ_{exc} fija, durante un tiempo de análisis predeterminado (por ejemplo, 60 s). Este procedimiento se repite realizando un barrido en un rango de λ_{emi} con el monocromador de emisión. De esta manera se genera una matriz de datos con tres variables, intensidad de cuentas, tiempo de decaimiento y λ_{emi} . En estos experimentos se utilizó la fuente de excitación B, en particular un NanoLED, el monocromador E y el detector H (Figura 37). La señal de decaimiento de fluorescencia se registró con el detector H funcionando en el modo TCSPC, tal como se explicó en la subsección 7.1.2.2. El uso de este método permite discriminar especies con λ_F diferentes, los espectros de emisión de las especies con λ_F menores serán predominantemente encontrados en tiempos de decaimiento más cortos, mientras que sólo las especies con mayor λ_F se encuentran en los tiempos más largos. Es decir, que permite resolver sistemas de mezclas de fluoróforos que emiten en la misma región espectral pero con diferencias en el λ_F y en el λ_{emi} . Esta técnica está limitada por la resolución temporal, las diferencias entre los λ_F de las especies y la cantidad de las especies a resolver.

El programa con el que cuenta el equipo, DAS6, permite realizar un análisis global de la matriz de datos generada al registrar los TRES, de esta manera es posible descomponer un espectro de emisión registrando en estado estacionario de una mezcla de fluoróforos como la suma de los espectros individuales obtenidos en el modo TRES y asociarlos con los λ_F de cada especie en particular. En este método, al igual que en la subsección 7.1.2.2, los parámetros cinéticos de la señal se calculan mediante la convolución aplicando la ecuación 58 para cada señal de decaimientos registrada el rango de λ_{emi} seleccionadas en el espectro TRES, donde $I(t)$ en este caso corresponde a la ecuación 59,

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \exp(-\lambda_i t) \quad (59)$$

donde A_i es el factor pre-exponencial y λ_i es el tiempo de vida de cada especie. Los λ_F calculados son valores promedio de todos los decaimientos registrados a cada λ_{emi} , mientras que A_i varía con λ_{emi} lo cual permite construir el espectro de emisión asociado a un determinado λ_F .



Figura 39: Dispositivo para las medidas de fosforescencia a 77 K.

7.1.3 Fosforescencia a 77 K en la región UV-visible

7.1.3.1 Fosforescencia en estado estacionario y con resolución temporal

La fosforescencia es la emisión de un fotón desde el estado excitado triplete, donde el electrón en el estado electrónico excitado tiene el mismo número cuántico de spin que en el estado fundamental. Por lo tanto esta transición está prohibida por spin, lo que implica que la velocidad de desactivación radiativa por emisión fosforescente es bastante baja ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$), es decir que los tiempos de vida de fosforescencia típicos son del orden de los milisegundos o incluso segundos. Por otro lado, no es común observar emisión fosforescente en soluciones acuosas a temperatura ambiente. Esto se debe a que existen diversos procesos de desactivación que compiten con la emisión, principalmente desactivación no radiativa con el solvente y desactivación del triplete por el O_2 molecular [2].

Por lo antes expresado, registrar los espectros o decaimientos de fosforescencia presentan cierta dificultad experimental. Para evitar la desactivación no radiativa que compete con la emisión es necesario trabajar a baja temperatura, 77 K que equivale aproximadamente a -200°C . Para llegar a esta temperatura fue necesario enfriar la solución con nitrógeno líquido. La muestra se colocó en una celda de cuarzo especial para este tipo de medidas (Figura 39), y se sumergió muy lentamente dentro de un vaso Dewar que contiene nitrógeno líquido en su interior. El vaso Dewar puede mantener el nitrógeno líquido sin evaporarse por completo ni formar condensación en las paredes durante 30 minutos aproximadamente. Ninguna medida de fosforescencia requirió más de 15 minutos, por lo tanto no fue necesario una corriente de nitrógeno para eliminar la condensación de la humedad ambiente en el exterior del vaso Dewar.

Con respecto a la preparación de las muestras, fue necesario trabajar en un solvente no acuoso, debido a que el agua es una de las pocas sustancias que aumenta el volumen en la transición de fase líquido-sólido. Por lo tanto para prevenir la posible ruptura de la celda

por la dilatación del solvente al solidificarse, se trabajó en un solvente orgánico adecuado. Se prepararon soluciones disolviendo las pterinas estudiadas en etanol absoluto, para favorecer la solubilidad se agregaron 10 l de NaOH 1M. En todos los experimentos se trabajó con soluciones de pterinas de absorbancia 0,1 a 340 nm.

Como fuente de excitación se utilizó la lámpara A-2, el monocromador E y el detector G (Figura 37). Hay cuatro parámetros instrumentales para ajustar en la medida de fosforescencia:

- retraso inicial, determina el tiempo entre el flash de la lámpara y el inicio de la adquisición de datos en el detector. Este valor debe ser lo suficientemente grande para eliminar la emisión de la lámpara de excitación, que posee un ancho medio temporal de 3 s, y la emisión de fluorescencia. Con un valor igual a 50 s la emisión registrada corresponde solo a la emisión fosforescente de la muestra;
- ventana de análisis, éste parámetro debe fijarse entre 5 a 10 veces el tiempo de vida de fosforescencia (τ_p) de la muestra;
- tiempo por flash, es la inversa de la velocidad de disparo de la lámpara pulsada. Los valores permitidos van desde 0.03 a 25 Hz. Este valor debe ser lo suficientemente grande para permitir que el detector registre la señal correspondiente a la ventana de análisis antes del siguiente flash;
- número de flash, es el número de disparos que contribuyen a cada punto. La señal es registrada para cada flash e integrada por el número total de disparos, por lo tanto la intensidad de emisión fosforescente será directamente proporcional a este parámetro.

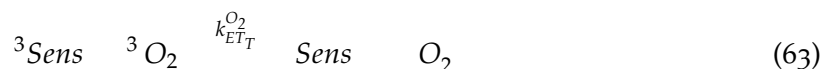
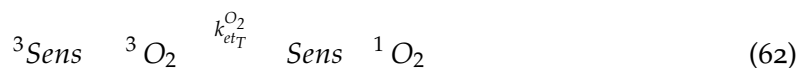
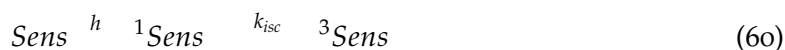
Para las medidas en estado estacionario, un determinado número de disparos de la lámpara a una λ_{exc} fija (340 nm) inciden sobre la muestra y se registra la emisión fosforescente a una ventana de tiempo fijo, que generalmente corresponde a un valor igual a dos veces el τ_p de la muestra. El espectro se construye con la intensidad de emisión detectada en función de λ_{emi} .

Para las medidas con resolución temporal, nuevamente un determinado número de disparos de la lámpara a una λ_{exc} fija (340 nm) inciden sobre la muestra y se registra la emisión fosforescente a una λ_{emi} fija, que corresponde al máximo de emisión de la muestra, en una ventana de análisis óptima. La señal registrada corresponde a la intensidad de fosforescencia en función del tiempo. El decaimiento se ajustó con una función exponencial, similar a la ecuación 56 utilizando el programa de análisis del equipo (*FluorEssence*).

7.1.4 Oxígeno molecular singlete

El mecanismo de generación fotosensibilizada del 1O_2 consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada o Sens al O_2 disuelto en el medio.

Consecuentemente, el sensibilizador vuelve al estado basal, y el O₂ queda en su estado excitado singlete (reacciones 60 y 62).



En ausencia de un desactivador, el ϕ_{et}^0 está dado por la ecuación 65,

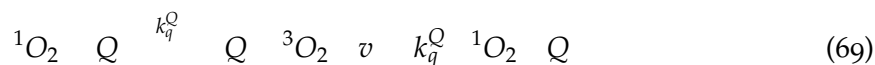
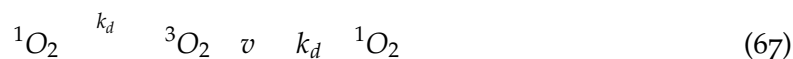
$$\phi_{et}^0 = \frac{k_{etT}^{O_2} [{}^3O_2]}{k_d + k_{etT}^{O_2} [{}^3O_2]} \quad (65)$$

con

$$\phi_{et}^0 = \frac{k_{etT}^{O_2} [{}^3O_2]}{k_d + k_{etT}^{O_2} [{}^3O_2]} \quad (66)$$

donde ϕ_T es el rendimiento cuántico de producción de estados excitados tripletes, ϕ_{et}^0 es la eficiencia de la transferencia de energía entre el triplete del sensibilizador y el O₂ para producir ¹O₂ en ausencia de un desactivador (Q), k_{etT} s⁻¹ es la constante de velocidad de transferencia de energía, k_{dT} s⁻¹ es la constante de velocidad de decaimiento unimolecular del triplete del sensibilizador en ausencia de O₂ y $k_{tT}^{O_2}$ M⁻¹s⁻¹ es la constante de velocidad de desactivación total del triplete del sensibilizador por O₂ (que incluye la transferencia de energía ($k_{etT}^{O_2}$) y la transferencia electrónica ($k_{ET}^{O_2}$)).

La desactivación del ¹O₂ puede ocurrir en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz). En presencia de otra sustancia capaz de actuar como desactivador, deben considerarse las vías de desactivación del ¹O₂ por reacción química y por interacción física. Las ecuaciones 67 a 70 detallan las reacciones correspondientes a cada una de estas vías de desactivación junto con las correspondientes expresiones matemáticas de sus velocidades de reacción.



$${}^1\text{O}_2 \xrightarrow{Q} \xrightarrow{k_r^Q} \text{QO}_2 \xrightarrow{v} \xrightarrow{k_r^Q} {}^1\text{O}_2 \xrightarrow{Q} \quad (70)$$

En una solución que contiene un sensibilizador de ${}^1\text{O}_2$ que está absorbiendo radiación, la velocidad de generación de ${}^1\text{O}_2$ viene dada por la ecuación 71,

$$\frac{{}^1\text{O}_2}{t} = q_p^V \quad (71)$$

donde ϕ_{Sens} es el rendimiento cuántico de producción de ${}^1\text{O}_2$ del sensibilizador. En experimentos de irradiación continua, y sin interferencias producidas por interacciones del Sens con otras sustancias, la concentración de Sens no cambia y la velocidad de producción del ${}^1\text{O}_2$ es constante. La velocidad de consumo de ${}^1\text{O}_2$ será igual a la suma de todas las vías de desactivación planteadas en las ecuaciones 67 a 70. En condiciones de estado estacionario la velocidad de formación y consumo de ${}^1\text{O}_2$ serán iguales, esto queda expresado por la ecuación 72.

$$\frac{{}^1\text{O}_2}{t} = q_p^V - k_d {}^1\text{O}_2 - k_p {}^1\text{O}_2 - k_q^Q {}^1\text{O}_2 \xrightarrow{Q} - k_r^Q {}^1\text{O}_2 \xrightarrow{Q} = 0 \quad (72)$$

De la ecuación 72 se puede despejar la concentración de ${}^1\text{O}_2$ de estado estacionario (${}^1\text{O}_2_{ss}$), ecuación 73,

$${}^1\text{O}_2_{ss} = \frac{q_p^V}{k_d + k_p + k_q^Q \xrightarrow{Q} + k_r^Q \xrightarrow{Q}} = q_p^V \quad (73)$$

donde τ es el tiempo de vida del ${}^1\text{O}_2$, en presencia de Q ($\tau = \frac{1}{k_d + k_p + k_q^Q \xrightarrow{Q} + k_r^Q \xrightarrow{Q}}$).

En ausencia de Q y teniendo en cuenta las reacciones 67 y 68, la ${}^1\text{O}_2_{ss}^0$ viene dada por la ecuación 74,

$${}^1\text{O}_2_{ss}^0 = \frac{q_p^V}{k_d + k_p} = q_p^V \tau^0 \quad (74)$$

donde τ^0 es el tiempo de vida del ${}^1\text{O}_2$, en ausencia un desactivador ($\tau^0 = \frac{1}{k_d + k_p}$).

Por otro lado, en experimentos con resolución temporal, el decaimiento de la emisión fosforescente del ${}^1\text{O}_2$ sigue una cinética de primer orden, según la ecuación 75,

$$S_t = S_i \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (75)$$

donde S_t es la señal registrada por el detector NIR, y es proporcional a la concentración de ${}^1\text{O}_2$ a un tiempo dado "t"; y S_i es el factor pre-exponencial, el cual es proporcional a la concentración inicial de ${}^1\text{O}_2$ al tiempo $t = 0$.

Las medidas se realizaron con el espectrofluorómetro empleando como fuente de excitación A-1, para las medidas en estado estacionario y A-2 para las medidas con resolución

temporal, el monocromador D y el detector I acoplado al equipo (Figura 37). El equipo permite la detección del $^1\text{O}_2$ bajo irradiación continua o bien en el modo resuelto en el tiempo. Ambos modos consisten en la medida de la luminiscencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm, producido durante la irradiación de una solución de la sustancia que se quiere investigar [134]. Esta señal corresponde a la emisión de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ a temperatura ambiente, por lo tanto los parámetros instrumentales en estas medidas son similares a las descritas en la subsección 7.1.3. Todos los experimentos que se realizaron para la detección de $^1\text{O}_2$ se llevaron a cabo en agua deuterada (D_2O). Debido a que el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en D_2O ($\tau_{\text{D}_2\text{O}} = 62 \text{ s}$) es mucho mayor que en H_2O ($\tau_{\text{H}_2\text{O}} = 3 \text{ - } 4 \text{ s}$) [130, 131, 132]. Lo cual produce que bajo irradiación continua se alcancen concentraciones de estado estacionario muy superiores y, por ende, señales lumínicas también mucho mayores. Esto produce un gran aumento en la sensibilidad del método. En particular esta técnica se utilizó para el estudio de desactivación de $^1\text{O}_2$ tanto en estado estacionario como resuelto en el tiempo.

7.2 FOTÓLISIS DE DESTELLO

LFP es una técnica con resolución temporal para el estudio espectroscópico y cinético de transitorios en la cual se emplea luz pulsada para generar especies transitorias. Habitualmente, se utiliza un pulso intenso de corta duración para producir una especie transitoria con la concentración adecuada para su observación espectroscópica [133]. El método de LFP fue desarrollado por Norrish y Porter en 1948, utilizado para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. En esta técnica se crea una situación de no equilibrio en la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo corto, generando intermediarios inestables en concentraciones relativamente altas.

7.2.1 Conceptos teóricos

En las distintas etapas que tienen lugar en los experimentos de fotólisis de destello láser se observan diferentes transiciones entre los estados excitados (Figura 40). Estas transiciones son las responsables de la variación de la intensidad de la absorbancia. Brevemente, en la etapa (1) la muestra tiene la configuración electrónica propia del estado fundamental (S_0). Al excitar la molécula con el pulso del láser (2) se genera una alta población de especies en el estado excitado singlete (S_1) y, consecuentemente, tiene lugar el proceso de entrecruzamiento de sistemas (ISC) (3). Esta última transición produce la formación de estados excitados de tipo triplete (T_1). A su vez, las moléculas en estado T_1 presentan un espectro de absorción (transición $T_1 \rightarrow T_n$) diferente al observado para las moléculas en su estado fundamental (es decir, para la transición $S_0 \rightarrow S_n$). Cuando el láser se dispara en $t = 0$ y causa un aumento en la absorbancia en la muestra; como consecuencia, la intensidad de luz que llega al detector disminuye. Los sistemas de fotólisis de destello son normalmente espectrómetros de un solo haz, pero de hecho se comportan como instrumentos de doble haz. El haz de referencia se separa del haz de la muestra en el tiempo, en

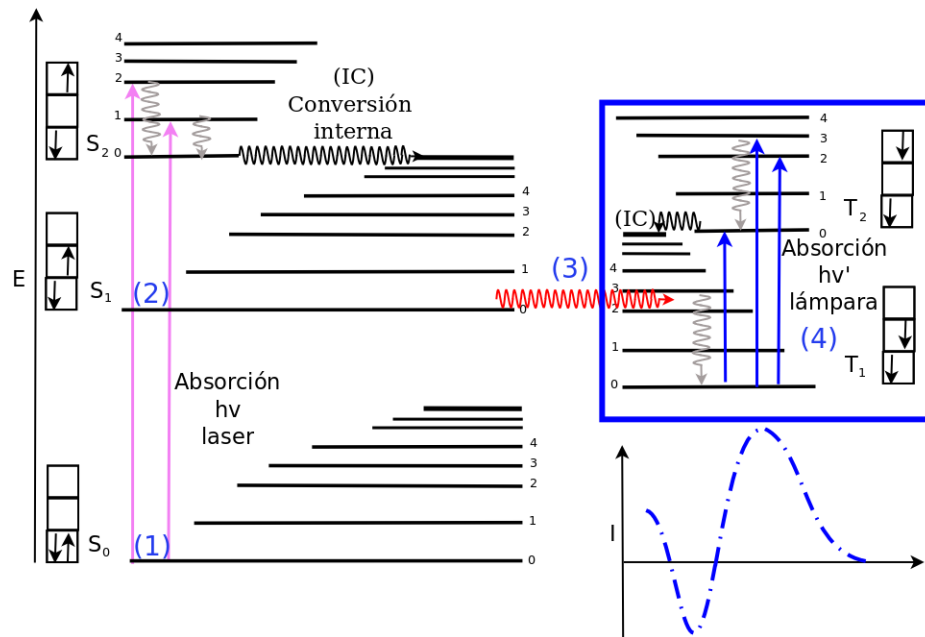


Figura 40: Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro azul resalta la transición triplete- triplete que tiene lugar durante los experimentos de fotólisis de destello láser.

lugar de espacio. De este modo, la señal de referencia se adquiere antes de la excitación con el láser denominada P_0 . La variación de la absorbancia en el tiempo “ t ” luego del pulso del láser, en la Figura 41 esta dada por la ecuación 76.

$$A = \log \frac{P_0}{P_t} \tag{76}$$

En un sistema simple, en donde solo se genera el estado triplete, la relación entre A y la concentración está dada por la ecuación 77,

$$A = \log \frac{P_0}{P_t} = C_T t l \tag{77}$$

donde es la diferencia entre los coeficientes de absorción de los estados triplete y fundamental, $C_T t$ es la concentración del transiente al tiempo “ t ” y l es el camino óptico.

7.2.2 Descripción del equipo

Para estas determinaciones se utilizó el sistema LFP de nanosegundo (ns) esquematizado en la Figura 42 . Como se discutirá más adelante, este equipo se utilizó para: (i) estudios cinéticos de los estados tripletes de los sensibilizadores y (ii) estudios cinéticos de especies radicales.

El equipo utilizado consta de un láser Nd:YAG (Minilite II laser, de Continuum Inc.), cuyo haz de salida fundamental de 1064 nm se triplica para generar un haz de salida utilizado en todos los experimentos, correspondiente al tercer armónico del mismo (355 nm). La duración del pulso generado es de 10 ns de largo y 7 mJ por pulso de energía. Para

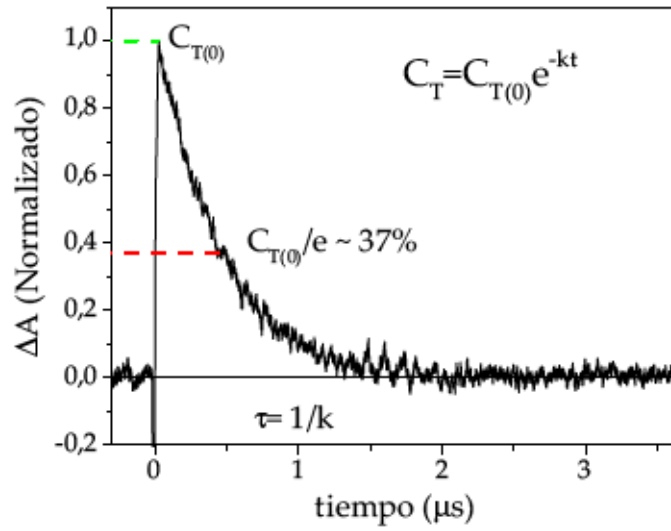


Figura 41: Evolución temporal de ΔA observada en un experimento típico de fotólisis de destello conjuntamente con los parámetros más relevantes de la señal.

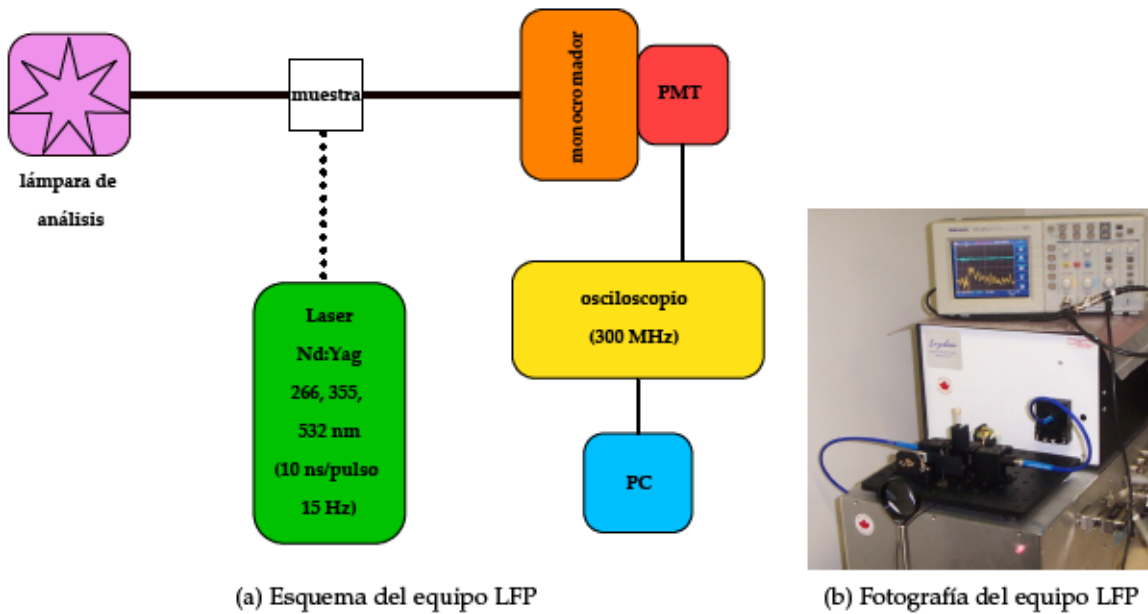


Figura 42: Esquema y fotografía del equipo de fotólisis de destello láser (LFP) utilizado.

los ensayos se utilizó una celda de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de camino óptico, especial para este tipo de medidas ya que minimiza el ingreso de O₂ a la solución. La luz del láser y la de análisis se disponen en una geometría de 90°. La luz de análisis de una lámpara de arco de Xe de 150 W se hace pasar por la celda y se enfoca luego en el monocromador (PTI 1695) que tiene acoplado a un fotomultiplicador (1P28 PMT). Las señales se adquirieron como el promedio de 5 pulsos, con un osciloscopio digital de 300 Mhz (Tektronik TDS 3032B) y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis. Para aquellas muestras que se degradan fotoquímicamente, se colocó un filtro de corte a 400 nm entre la lámpara de análisis y la celda, para evitar que la radiación (> 400 nm) proveniente de la lámpara degrade la muestra.

7.2.3 *Decaimientos y espectros de especies transitorias*

Se prepararon soluciones acuosas de las pterinas estudiadas de absorbancia menor a 0,5 a la λ_{exc} . Se trabajó en condiciones de pH ácido (5,5-6). Una vez que las soluciones se colocaron en la celda, se burbujearon con Ar durante 20 minutos. En algunos casos, las soluciones también se burbujearon con aire y con O₂. Se realizaron controles espectrofotométricos de las soluciones antes y después de los disparos del láser, para monitorear cualquier cambio en la muestra, ya sea un cambio en el pH de la solución por el burbujeo, o debido a la fotodegradación de la muestra. Para el estudio de procesos de desactivación del estado excitado triplete de las pterinas, se prepararon mezclas conteniendo un sensibilizador determinado y diferentes concentraciones de cada uno de los nucleótidos estudiados (dGMP, dAMP y dTMP), las cuales se burbujearon con Ar. Para los estudios cinéticos de especies radicalarias, se utilizaron mezclas que contenían el sensibilizador y el sustrato, que fueron burbujeadas con Ar, O₂ o aire durante 20 minutos, o bien con el agregado de SOD a la mezcla, luego se registraron las señales de decaimiento en dichas condiciones.

El sistema de LFP descrito, es capaz de detección de la señal como una función de tiempo a una λ_{exc} seleccionada. O bien, en un rango de λ_{exc} y a partir de los datos registrados construye un espectro LFP automáticamente. Se registraron los decaimientos de la señal luego del disparo del láser a distintas λ_{exc} , entre 400 y 600 nm (en intervalos constantes de 5 o 10 nm). Se registró en forma rutinaria un promedio de 5 señales para aumentar la relación señal-ruido. Para evitar fotodegradación de la muestra, la solución se agitó entre las medidas realizadas a cada longitud de onda o se reemplazó por una alícuota nueva de la misma solución madre. Se utilizaron escalas de tiempo diferentes para analizar las diferentes especies transitorias. Para estudiar los estados excitados tripletes por lo general estas escalas fueron de 0,4 s/div, 1 s/div, 2 s/div o 4 s/div. Para estudiar intermediarios o radicales se trabajó con ventanas de tiempo más largas, 10 s/div, 400 s/div y 100 s/div.

Por otro lado los espectros se construyeron registrando las trazas con resolución temporal en un rango de λ_{exc} , y luego de cada señal de decaimiento se extraen los valores de A

en una ventana de tiempo dado. De esta manera se obtiene una matriz de datos, en la que el eje vertical es la intensidad de señal (A de la especie transitoria), y los otros dos ejes son el tiempo y longitud de onda. En el equipo se registran los decaimientos y se seleccionan las ventanas de tiempo en la que promedia la señal de A a una determinada longitud de onda de análisis. Luego automáticamente repite este procedimiento en todas las longitudes de onda en el rango espectral deseado, acumulando los decaimientos para generar luego la matriz de datos. Esto implica una mayor acumulación de disparos del láser sobre la misma muestra, como así también mayor exposición a la lámpara de análisis. En algunos casos en donde la muestra sufría fotodegradación fue necesario trabajar con un sistema en flujo, renovando la muestra durante la mediada del espectro para evitar que la radiación incidente degradara la muestra. De todas maneras, para verificar que no hubiera consumo de la muestra durante el experimento, en todos los casos se realizaron controles a través de la medida de los espectro UV-visible antes y después de registrar el espectro de transientes para controlar que no hubieran cambios en los espectros de absorción debidos a la fotodegradación de la muestra durante el experimento.

7.3 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

La técnica de **EPR**, por su nombre en inglés, *Electronic Paramagnetic Resonance*, conocida también como Resonancia de Espín Electrónico, es la rama de la espectroscopía de absorción en la cual una radiación de microondas produce la transición entre niveles de energía magnética de electrones desapareados.

EPR consiste en la aplicación de un campo magnético estático H que desdobra los niveles de energía de espín y de un campo magnético oscilante débil $H_1 \cos t$ perpendicular a H ($H_1 \ll H$) con frecuencia en el rango de las microondas ($\approx 10^{10}$ Hz). Esta radiación induce transiciones entre los distintos estados de espín [135]. Las diferencias de energía que se miden o analizan en EPR corresponden, predominantemente, a la interacción de los electrones desapareados presentes en la muestra con el campo magnético producido por un imán externo. Este fenómeno se lo conoce como *efecto Zeeman*. Debido a que el electrón tiene un momento magnético, puede actuar como una barra de imán cuando se la coloca frente a un campo magnético, H_0 . Consecuentemente, el electrón ocupará el nivel de menor energía cuando su momento, μ , esté alineado con la dirección del campo magnético. De manera opuesta, ocupará el nivel de mayor energía cuando μ este alineado en la dirección contraria al campo magnético. Las ecuaciones fundamentales de EPR se obtienen a partir de la mecánica cuántica, ecuaciones 78 y 79,

$$E = g \mu_B H_0 M_s + \frac{1}{2} g \mu_B H_0 \quad (78)$$

$$E = h \nu + g \mu_B H_0 \quad (79)$$

donde g es un factor de proporcionalidad igual a 2,0023 para el electrón libre. Sin embargo, puede variar dependiendo de la configuración electrónica del radical o del ión; μ_B es el

magnetón de Bohr, unidad del momento magnético electrónico, es la frecuencia de la radiación electromagnética y M_s es el momento de espín.

De las ecuaciones 78 y 79 se desprenden dos puntos muy importantes: (i) en ausencia de un campo magnético, los dos estados de espín tienen la misma energía y (ii) la energía de los estados de espín diverge, linealmente, a medida que aumenta la intensidad del campo magnético. Se puede mantener constante la ν y hacer un barrido o variación de H_0 . De esta manera, aparecerá un pico de absorción cuando el campo magnético se encuentre alineado con los dos estados de spin de modo tal que la diferencia de energía entre los spines coincida con la energía de la radiación. Este campo magnético en particular se lo denomina “campo de resonancia”.

En un experimento típico de EPR se registra, a una ν fija, la derivada de la intensidad de energía de microondas absorbida por la muestra respecto del campo magnético H . Los parámetros que caracterizan una señal de EPR son:

- la posición de la resonancia H_0 , de donde puede calcularse el valor de $g = \frac{h}{B H_0}$;
- forma y ancho de línea pico a pico de la resonancia (ΔH_{pp});
- posibles estructuras de multiplete.

Como cualquier espectrómetro, requiere de una fuente de radiación y de algún dispositivo que detecte absorción en la muestra. El generador de microondas es una válvula electrónica denominada *klystron* que se acopla mediante una guía de ondas a la cavidad resonante en la que se coloca la muestra. Cuando se produce la absorción de energía de microondas cambia la cantidad de energía que llega al detector. Para detectar la señal de EPR con una máxima relación señal/ruido, se modula el campo magnético estático con un campo magnético oscilante a una frecuencia de 100 kHz, paralelo al campo estático, mediante bobinas adosadas a la cavidad. La energía absorbida por la muestra que llega al detector, se amplifica y se detecta mediante un detector sensible a fase. La salida de este detector es la derivada primera de la energía absorbida por la muestra respecto del campo magnético estático y puede registrarse en forma gráfica o digital mediante un sistema de adquisición electrónico de datos.

El espectrómetro utilizado en este trabajo de tesis fue el ELEXSYS E 500 (Bruker). Este equipo cuenta con una caja denominada “puente de microondas” en donde se encuentra la fuente de radiación electromagnética y el detector. La muestra se coloca en una cavidad, que se encuentra en una caja metálica que ayuda a amplificar las señales más débiles provenientes de la muestra. Un imán ajusta los niveles de energía de espín electrónico. La potencia de microondas fue de 20 mW; la amplitud de modulación de campo de 0,1 mT; la frecuencia de modulación de campo de 100 kHz, y la frecuencia de microondas de 9,77 GHz. Mediante una computadora no solo se obtienen y procesan las señales del campo magnético, sino que también se regulan los diferentes parámetros necesarios para el funcionamiento del equipo.

Esta técnica se utilizó para evaluar la formación de especies radicalarias en las reacciones fotosensibilizadas estudiadas. En general, los radicales de las moléculas orgánicas

presentan un tiempo de vida relativamente corto más aún en presencia de especies capaces de oxidarlos fácilmente (como el H_2O , el O_2^- , o el O_2). Por lo tanto, la detección directa de los radicales suele presentar ciertas dificultades. Por lo tanto, para llevar a cabo estas experiencias se recurrió al método de atrapamiento de espín o "*spin trapping*". En esta técnica se usa una sustancia, que en particular, se denomina "secuestrador". El secuestrador es una especie no radicalaria y, por lo tanto diamagnética, que presenta una elevada y selectiva reactividad con la especie radicalaria que se quiere detectar. El secuestrador reacciona con el radical, generando un producto también de naturaleza radicalaria (paramagnético). De esta forma, el producto, que presenta una vida media más larga, que puede ser detectado por EPR [136, 137]. El secuestrador utilizado en los experimentos fue el N-óxido-5,5'-dimetil-1-pirrolina o DMPO [138]. Este secuestrador sirve para detectar O_2^- , ya que reacciona con esta especie formando un aducto (DMPO -OOH) detectable por EPR [139]. Sin embargo, el DMPO también puede reaccionar con otras especies radicalarias presentes en el medio. Por lo tanto, la señal resultante estará superpuesta con la señal característica del aducto DMPO -OOH.

Parte III

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES DE PTERINAS OXIDADAS

Para abordar el estudio de procesos fotosensibilizados inducidos por pterinas oxidadas de interés biológico es necesaria la caracterización de los estados excitados que potencialmente podrían participar. Con respecto a esto, en trabajos anteriores se investigaron las propiedades fotofísicas de los estados excitados singletes de una amplia serie de pterinas oxidadas. Allí se caracterizaron sus propiedades fluorescentes, en particular, τ_F y λ_{em} tanto en soluciones ácidas como alcalinas (pH 5,5 y 10,5) [87] (Capítulo 4).

Por el contrario, a pesar que existen numerosos trabajos donde se reportan evidencias de la participación de los estados excitados tripletes de las pterinas en procesos fotosensibilizados con diferentes sustratos [114, 125, 124, 122, 123], los estudios sobre la fotofísica de estos son escasos [100, 101].

En este capítulo se presentarán resultados concernientes a caracterizar los estados excitados tripletes de pterinas oxidadas de interés biológico, Bip y sus fotoproductos Fop, Cap y Ptr. Para estudiar las especies transientes generadas por estos compuestos, su velocidad de decaimiento y la interacción con el O_2 se utilizó la técnica LFP (Sección 7.2). Por otro lado, para esta misma serie de compuestos se estudiaron las propiedades fosforescentes a baja temperatura en experimentos de estado estacionario y resolución temporal.

8.1 CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES TRANSIENTES POR FOTÓLISIS DE DESTELLO LÁSER

En general para todos los experimentos de LFP se utilizaron soluciones acuosas de Bip, Fop, Cap o Ptr a pH 5,5 previamente burbujeadas durante 20 minutos con Ar para eliminar el O_2 del medio. El procedimiento experimental y los detalles técnicos se describieron en los capítulos 5 y 7. Para todos los experimentos descritos a continuación se utilizó como fuente de excitación el tercer armónico de un láser de Nd-YAG (355 nm).

8.1.1 Espectro de absorción de transientes

En primer lugar se caracterizaron los espectros de absorción de transientes de los cuatro compuestos. En particular, los espectros de Bip y Fop se registraron utilizando un sistema en flujo para evitar la degradación de las muestras, debido a que estos compuestos se oxidan relativamente rápido bajo irradiación UV-A (Capítulo 4). Para el resto de los compuestos, Cap y Ptr, los cuales son fotoquímicamente más estables, los espectros se registraron irradiando la misma solución durante todo el tiempo que duró el experimen-

to sin necesidad de utilizar un sistema en flujo. Para verificar que no hubiera consumo apreciable de la muestra durante los experimentos, en cada caso se realizaron controles a través de la medida de los espectros de absorción antes y después de registrar los espectros de transientes, es decir, antes y después de la irradiación de la muestra con el láser y con la lámpara de análisis. Todos los resultados mostrados en esta sección corresponden a experimentos en los cuales no se registraron consumos significativos del compuesto estudiado.

Los espectros que se muestran en la [Figura 43](#) se construyeron a partir de los decaimientos registrados entre 280 y 600 nm. Para cada espectro se calcularon los valores de la diferencia de absorbancia (ΔA) promedio dentro de intervalos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, para el caso de Bip el espectro se registró entre 280 y 600 nm en un intervalo de 10 nm, midiendo los decaimientos con una escala de 4 s por división (s/div), se calculó el promedio de la señal a cada longitud de onda, a 0,12 s, 0,27 s, 0,69 s y 19 s luego del pulso del láser. En general, todos los compuestos estudiados generaron señales de especies transitorias con una absorción intensa entre 400 y 600 nm con un máximo intenso centrado alrededor de 440 nm. Estos resultados son similares a los reportados previamente para Ptr y Bip [100, 101].

8.1.2 *Tiempo de vida de los estados excitados tripletes*

Tal como se explicó en el capítulo 3, las pterinas en el estado fundamental y en su forma neutra se encuentran en su forma tautomérica lactama. Bajo la irradiación del láser se producen ambas especies excitadas tripletes tautoméricas, que decaen simultáneamente con un decaimiento biexponencial formado por un componente corto (T_c) y otro largo (T_l) correspondientes a las especies tautoméricas lactama y lactima, respectivamente.

Al analizar los decaimientos de los compuestos estudiados, éstos presentan un comportamiento claramente biexponencial en todo el rango del espectro de absorción de transientes. En la [Figura 44](#) se presentan los decaimientos con longitud de onda de análisis (λ_{ana}) igual a 430 nm de soluciones acuosas de cada uno de los compuestos saturadas en Ar a pH 5,5, con el correspondiente ajuste biexponencial y la distribución de residuos.

Los estados excitados tripletes de las moléculas orgánicas se desactivan eficientemente con el O_2 presente en el medio, debido a que esta especie en su estado fundamental es un triplete. Por lo tanto, un aumento en la velocidad de decaimiento de la señal del transiente en presencia de O_2 es una evidencia a favor de que la señal observada corresponde a la absorción de un triplete. Para comprobar que las señales obtenidas con los diferentes compuestos se trataban de especies tripletes, se registraron los decaimientos de soluciones saturadas con O_2 . En todos los casos se observó una disminución significativa en el valor de T_l .

A partir de lo observado se pueden destacar algunos puntos importantes: i) todas las señales siguen una cinética de decaimiento biexponencial, ii) los tiempo de vida obtenidos del ajuste biexponencial arrojan valores comparables a los reportados en literatura

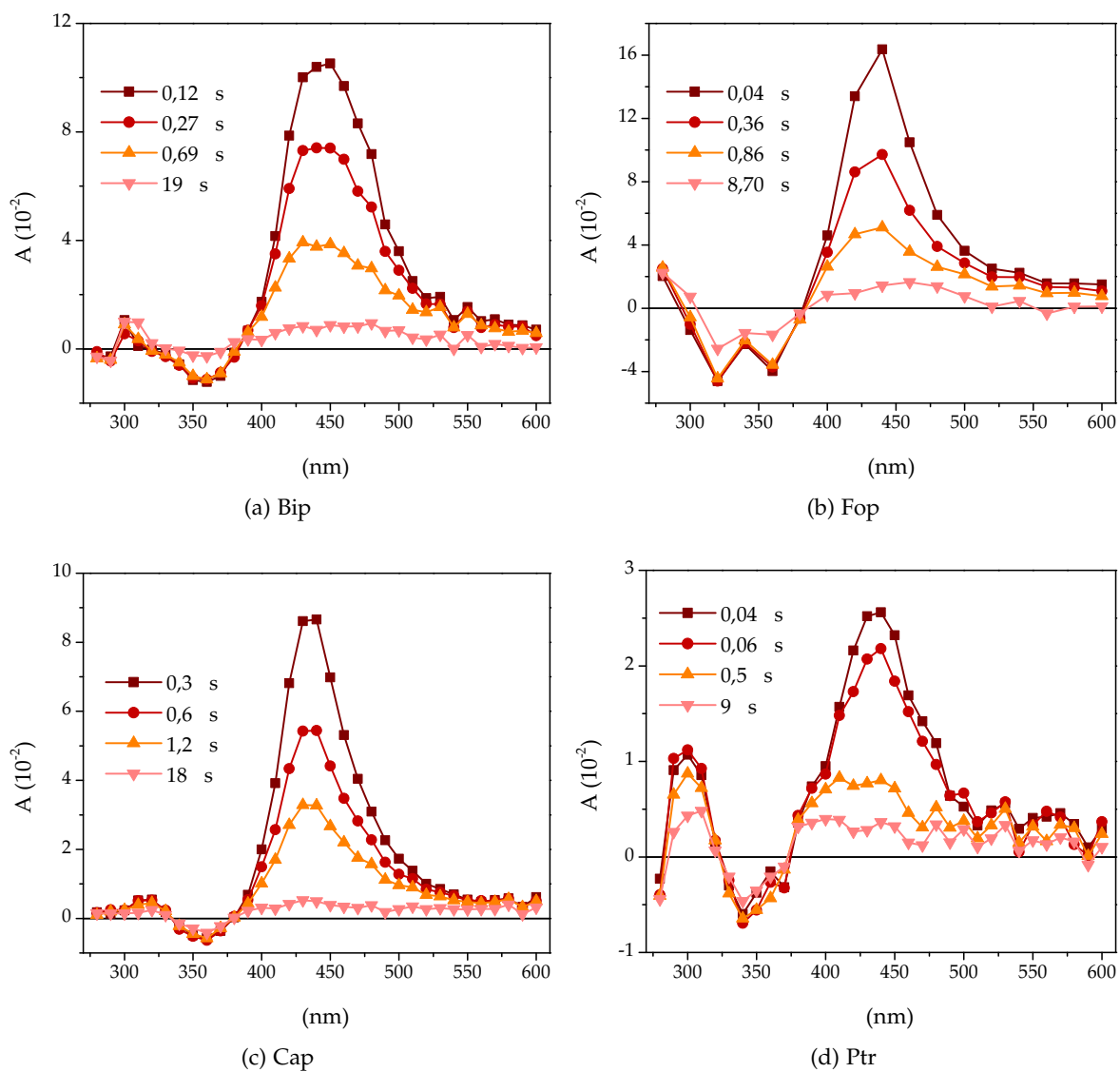


Figura 43: Espectros de absorción diferencial de transientes de soluciones acuosas saturadas con Ar, pH = 5,5 de las pterinas oxidadas estudiadas. λ_{exc} 355 nm, $A_{355\text{ nm}}$ 0,5, escala = 4 s/div, Bip 80 M, Fop 55 M, Cap 68 M y Ptr 95 M.

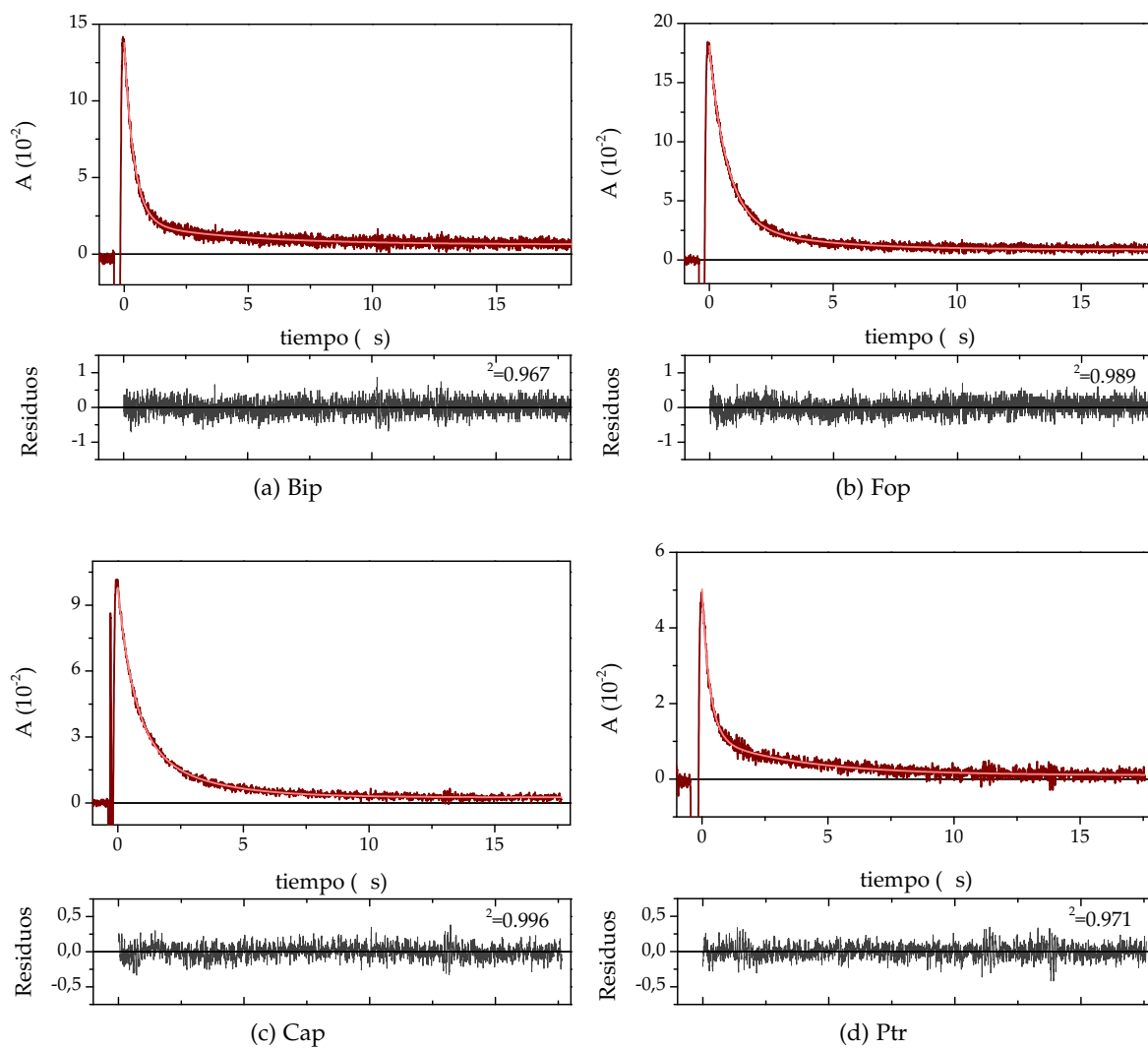


Figura 44: Dependencia del A con el tiempo y distribución de los residuos del ajuste de la señal con una función biexponencial. Soluciones acuosas saturadas en Ar a pH 5,5 de las pterinas oxidadas estudiadas. λ_{exc} 355 nm, λ_{ana} 430 nm, A_{355nm} 0,5, escala = 2 s/div. Bip 80 M, Fop 55 M, Cap 68 M y Ptr 95 M.

COMPUESTO	pH 5,5				pH 9			
	T_c	T_l	T_c	T_l	T_c	T_l	T_c	T_l
Bip	0,34	0,04	2,5	0,5	0,28	0,02	2,0	0,1
Fop	0,8	0,2	2,9	0,6	-	-	-	-
Cap	0,6	0,1	2,1	0,5	-	-	-	-
Ptr	0,36	0,08	3,9	0,7	0,3	0,1	2,3	0,2

Tabla 7: Tiempos de vida de los estados excitados tripletes de Bip, Fop, Cap y Ptr en ausencia de O_2 a pH = 5,5; comparados con los valores reportados en la literatura medidos a pH 9 [100, 101].

para Bip y otros derivados pterínicos [100, 101], iii) la velocidad de decaimiento de los transientes aumenta conforme aumenta la concentración de O_2 del medio. A partir de lo mencionado anteriormente se puede afirmar que, las señales de los transientes corresponden a especies excitadas tripletes de los diferentes compuestos estudiados que de ahora en adelante se denominarán 3Bip , 3Fop , 3Cap o 3Ptr según corresponda, o bien en forma general para las pterinas oxidadas 3Pt . En la Tabla 7 se resumen los valores obtenidos para cada compuesto estudiado a pH 5,5 en comparación a los datos reportados en literatura medidos a pH 9 [100, 101], para ambas especies excitadas tripletes. Las cuales se denominarán T_c para la especie con T menor y T_l con T mayor.

Se aplicó un análisis global utilizando la ecuación 80 en la matriz de datos obtenida de los espectros de la Figura 43 con el objetivo de intentar separar los espectros de absorción de los tripletes correspondientes a T_c y T_l .

$$A = A_0 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{T_c}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{T_l}\right) \quad (80)$$

donde A_0 es el valor de A cuando "t" tiende a ∞ , A_1 y A_2 son los factores pre-exponenciales los cuales son proporcionales a la cantidad de cada una de las especies y varían con la ana . Ésta propiedad es la que permite construir el espectro de absorción y asociarlo aun determinado T (Subsección 7.1.2.3). En la Figura 45 se muestran los resultados del análisis global para Ptr, con T_c y T_l fijos en los valores que figuran en la Tabla 7. El espectro muestra las variaciones de los factores pre-exponenciales, A_1 y A_2 , asociados a cada tiempo de vida, T_c y T_l respectivamente. Para el resto de los compuestos estudiados el análisis global de los datos no permitió separar los espectros de cada especie excitada triplete.

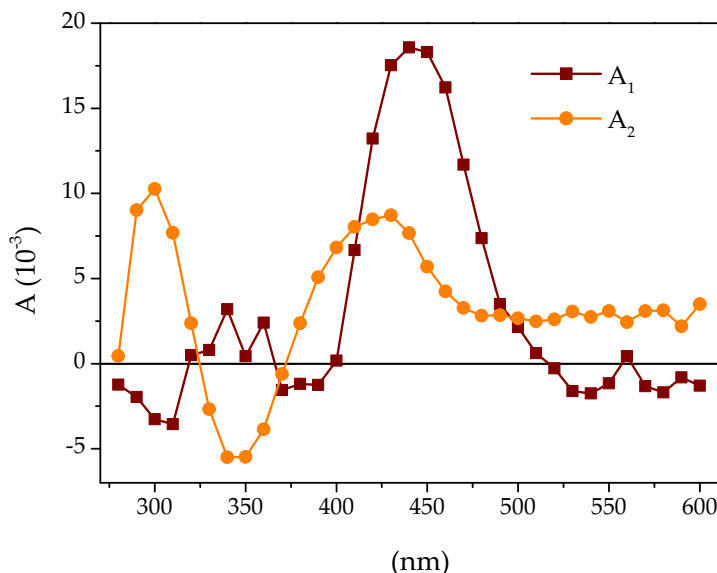


Figura 45: Variaciones de los factores pre-exponenciales asociado a cada τ , registrado con soluciones acuosas saturadas en Ar de Ptr, pH = 5,5, λ_{exc} = 355 nm, A_{355} = 0,5, escala: 4 s/div, Ptr = 95 M.

8.1.3 Desactivación de los estados excitados tripletes por O₂

Se analizaron las señales de los tripletes a una λ fija variando la concentración de O₂ en las soluciones. Específicamente estas concentraciones fueron de 0 mM, 0,27 mM y 1,28 mM, que se consiguieron burbujando las soluciones durante 20 minutos con Ar, aire y O₂, respectivamente. Los decaimientos obtenidos para Fop se muestran a modo de ejemplo en la Figura 46. Se observa claramente un aumento en la velocidad de decaimiento de los tripletes con el aumento de la concentración de O₂, evidenciando la desactivación de los estados excitados por el gas disuelto. El mismo comportamiento se observó para el resto de los compuestos.

Se realizaron experimentos para determinar las constantes de desactivación total de los estados excitados tripletes por O₂. Para ello se trabajó con una solución aproximadamente 80 M de cada compuesto (Bip, Fop Cap o Ptr) y se calcularon los τ , registrando el decaimiento a una λ fija donde absorben los tripletes (430 nm) para diferentes concentraciones de O₂. Una vez obtenidos los valores de los τ a partir del ajuste biexponencial de las señales, se aplicó un análisis de Stern-Volmer utilizando la ecuación 81,

$$\frac{\tau}{\tau_0} = 1 + \frac{\tau_0 k_{tT}^{O_2}}{k_{tT}} [O_2] \tag{81}$$

donde, τ_0 y τ es el tiempo de vida del triplete en ausencia y en presencia de O₂, respectivamente. $k_{tT}^{O_2}$ es la constante de desactivación total del estado excitado triplete por O₂ y $[O_2]$ es la concentración de O₂.

En todos los casos se observaron comportamientos lineales y a partir de la pendiente de las gráficas de Stern-Volmer se calcularon los valores de $k_{tT}^{O_2}$ para cada compuesto estu-

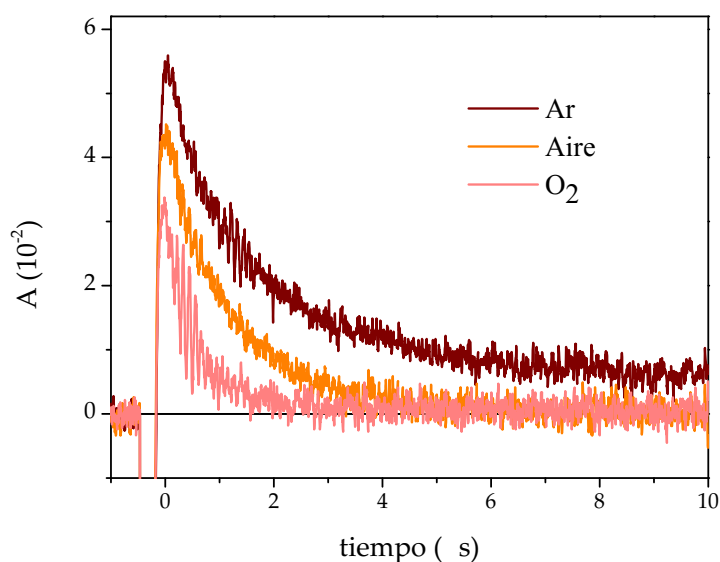


Figura 46: Dependencia del A con el tiempo para una solución acuosa de Fop a pH 5,5 saturada en Ar, O_2 y equilibrada con aire. exc 355 nm, ana 430 nm, $A_{355\text{nm}}$ 0,5, escala = 2 s/div. Fop 55 M.

diado (Figura 47). En general, los valores obtenidos para las constantes de desactivación son del orden de $10^8 M^{-1} s^{-1}$ y, dentro del error experimental, muy similares para ambas especies excitadas tripletes. En la Tabla 8 se resumen los valores de las constantes a pH 5,5 obtenidos para cada uno de los compuestos correspondientes a T_c y T_l . Estos valores se comparan con los publicados para Bip y Ptr en medio alcalino.

8.2 ESTUDIOS DE FOSFORESCENCIA A 77 K

Para completar la caracterización de los estados excitados tripletes de las pterinas oxidadas se realizaron experimentos de emisión de fosforescencia a baja temperatura en estado

COMPUESTO	$k_{tT}^{O_2} \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$					
	pH 5,5				pH 9	
	T_c		T_l		T_l	
Bip	0,6	0,2	0,8	0,2	1,4	0,2
Fop	0,5	0,2	0,6	0,2	-	-
Cap	0,4	0,2	1,7	0,5	-	-
Ptr	0,5	0,1	1,6	0,8	1,9	0,3

Tabla 8: Valores de constante de desactivación total de los estados excitados tripletes por O_2 ($k_{tT}^{O_2}$) para soluciones acuosas de Bip, Fop, Cap y Ptr a pH 5,5, comparados con los valores reportados en la literatura medidos a pH 9 [100, 101].

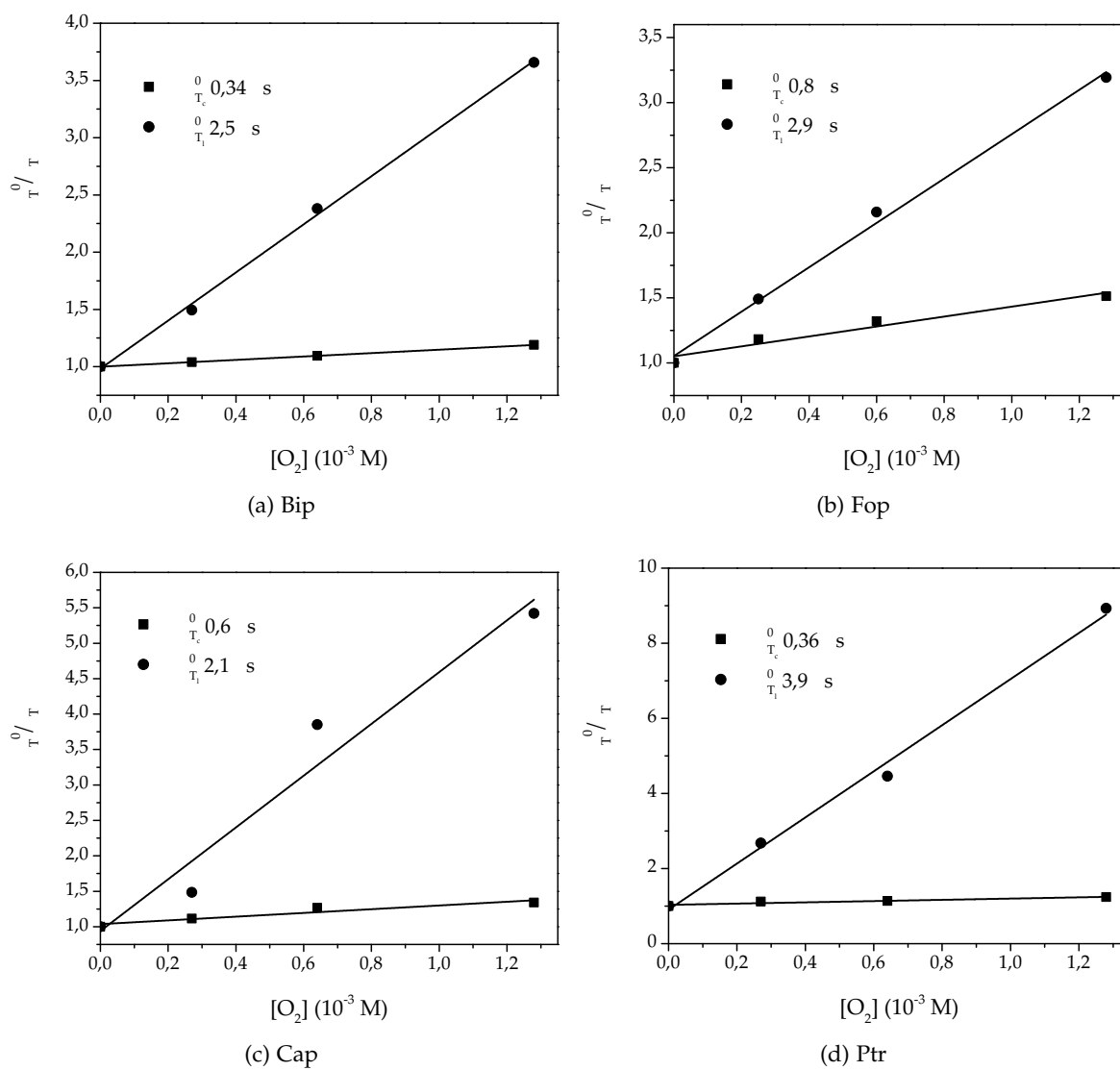


Figura 47: Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes por O_2 . T_c y T_1 calculados a partir de los decaimientos registrados en soluciones acuosas a pH 5,5 de las pterinas oxidadas estudiadas. exc 355 nm, $análisis$ 430 nm, $Abs_{355 nm}$ 0,5. Bip 80 M, Fop 55 M, Cap 68 M y Ptr 95 M.

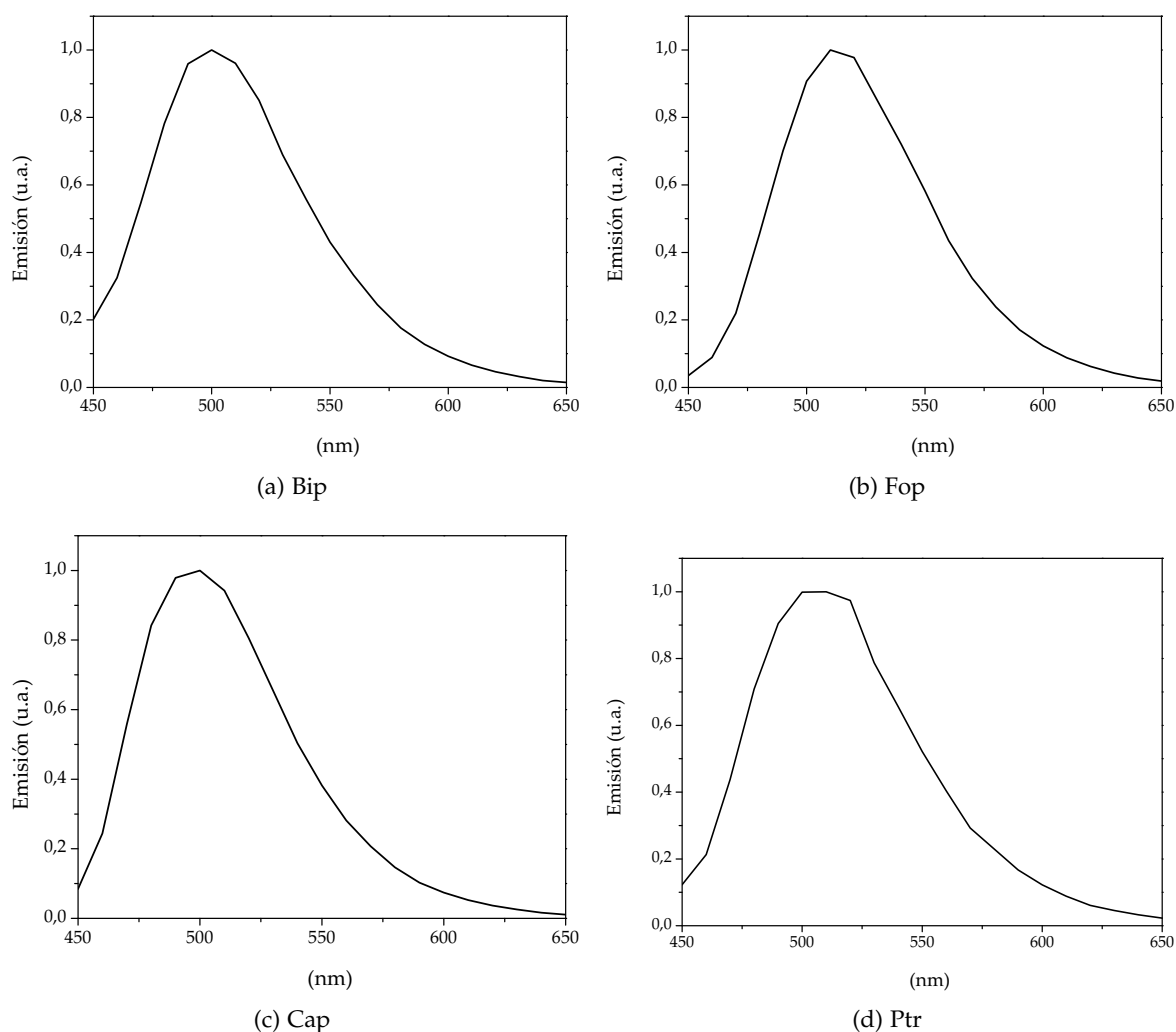


Figura 48: Espectros de emisión de fosforescencia a 77 K de soluciones de las pterinas oxidadas estudiadas preparadas en etanol absoluto. $Abs_{340\text{ nm}} = 0,1$. Bip 10 M , Fop 8 M , Cap 12 M y Ptr 15 M .

estacionario y resuelto en el tiempo. Se midieron espectros de emisión fosforescente y los τ para la serie de pterinas estudiadas. Los detalles experimentales y la descripción de la técnica se desarrollaron en la subsección 7.1.3.

8.2.1 Espectros de emisión fosforescente a 77 K

Se registraron los espectros de emisión de soluciones de Ptr, Bip, Fop y Cap en etanol absoluto a 77 K, excitando la banda de absorción de menor energía ($\lambda_{exc} = 350\text{ nm}$) con una lámpara pulsada de Xe y registrando la emisión fosforescente entre 450 y 650 nm cada 10 nm, con una ventana de análisis de 1 segundo, un promedio de 10 disparos del flash por punto del espectro con una duración de 0,2 segundos por flash, (Subsección 7.1.3). En la Figura 48 se muestran los espectros de emisión de fosforescencia normalizados.

COMPUESTO	P_1 (10 ³ s)	P_2 (10 ³ s)	P (nm)	$E_{0,0}^T$ (KJ mol ⁻¹)
Bip	1038	-	500	274
Fop	740	174	510	267
Cap	1165	-	500	273
Ptr	791	-	505	270

Tabla 9: Tiempo de vida (P), longitud de onda en el máximo de emisión de fosforescencia (P) y energía del estado excitado triplete ($E_{0,0}^T$) de Bip, Fop, Cap y Ptr.

En general todas los compuestos estudiados presentan una banda de emisión intensa con un máximo centrado aproximadamente en 500 nm (Tabla 9). Este máximo se encuentra desplazado más de 50 nm con respecto al máximo de emisión fluorescente y alrededor de 150 nm con respecto al máximo de absorción de la banda de menor energía (Capítulo 4). Estas características espectrales son similares a las reportadas en trabajos previos para Ptr y Cap [102, 100].

Los conceptos de mecánica cuántica indican que las moléculas o los átomos tienen estados energéticos discretos, cada uno con su correspondiente valor de energía. La diferencia de energía (E) se puede calcular de acuerdo a la ley de *Planck* (ecuación 82).

$$E = h \nu = hc \tilde{\nu} \quad (82)$$

Donde $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ es la constante de *Planck*, ν la frecuencia asociada a un cuanto o a una partícula elemental, $\tilde{\nu}$ es el número de onda, y $c = 2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ la velocidad de la luz.

Considerando que la emisión de fosforescencia corresponde a un fotón emitido desde el estado excitado triplete de una molécula (Capítulo 1), a partir de los espectros de fosforescencia se puede estimar la diferencia de energía electrónica entre el estado excitado triplete y el estado electrónico fundamental ($E_{0,0}^T$) aplicando la ecuación 83.

$$E_{0,0}^T = h c (\tilde{\nu}_P - \tilde{\nu}_{ATMM}) \quad (83)$$

Donde $\tilde{\nu}_P$ es el máximo de la banda de fosforescencia expresado en número de onda, y $\tilde{\nu}_{ATMM}$ es diferencia en número de onda para el ancho total a la mitad del máximo de banda de fosforescencia [140]. A partir de los espectros de emisión de fosforescencia normalizados (Figura 48) se calcularon los máximos de emisión de fosforescencia (P) y los valores de $E_{0,0}^T$. En la Tabla 9 se resumen los valores calculados para dichos parámetros. Los valores de $E_{0,0}^T$, en general, son del mismo orden para todos los compuestos estudiados y similar al valor reportado en la literatura para el estado excitado triplete de Ptr (264 KJ mol⁻¹) [100]. Por lo que se desprende que el sustituyente en la posición 6 no tendría un efecto apreciable en la energía del triplete, para la serie de compuestos estudiados.

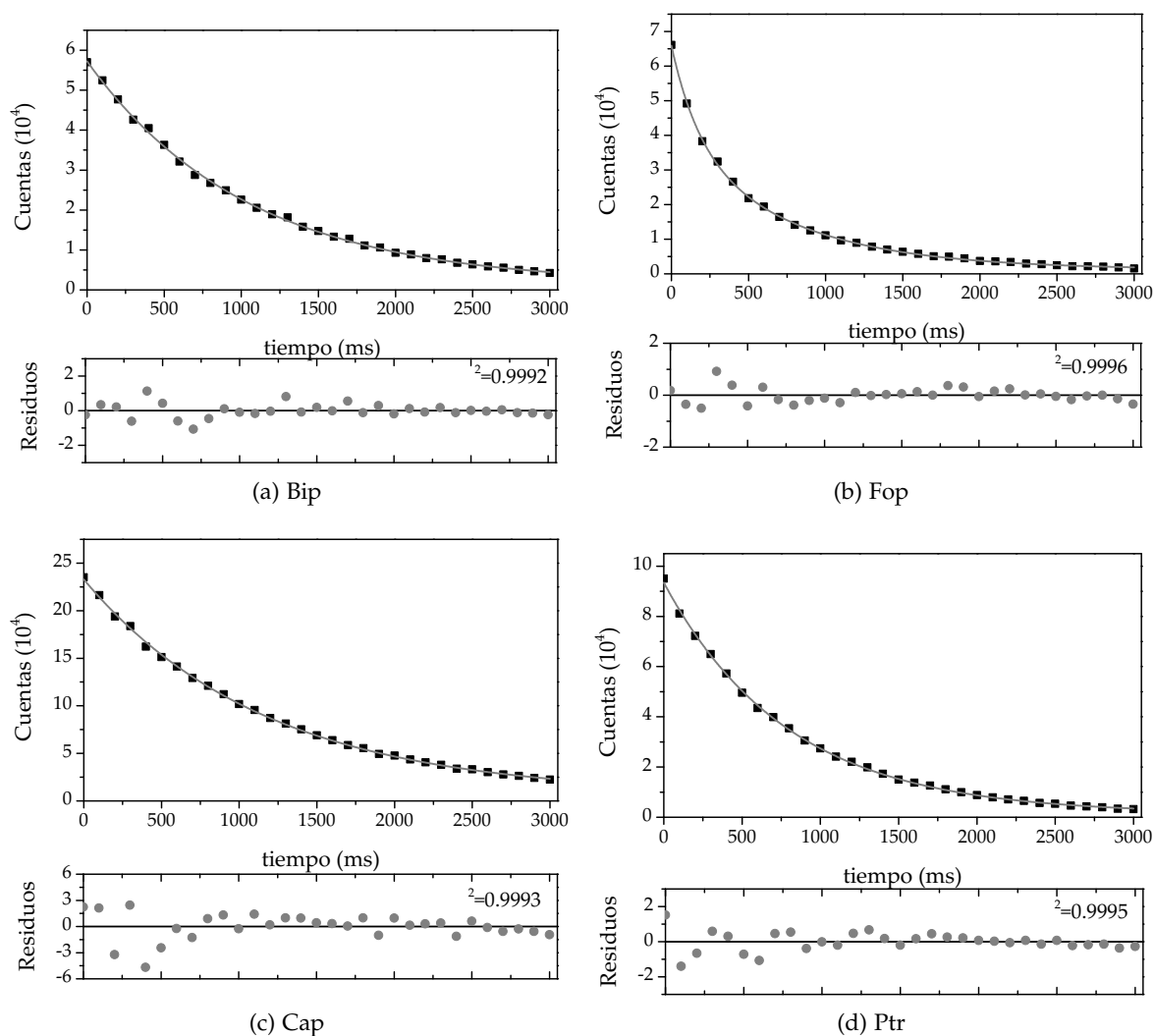


Figura 49: Decaimientos de emisión de fosforescencia a 77 K, ajuste de las señales con una función exponencial y las distribución de los residuos. Registrados en soluciones de Bip, Fop, Cap y Ptr preparadas en etanol absoluto. $A_{340} = 0,1$. Bip $10 M$, Fop $8 M$, Cap $12 M$ y Ptr $15 M$.

8.2.2 Tiempo de vida de fosforescencia

Se registraron los decaimientos en la λ_p de cada compuesto estudiado. Los parámetros de las medidas fueron las mismas en todos los casos, $\lambda_{exc} = 350$ nm, una ventana de análisis de 3 segundos y un promedio de 5 disparos del flash por punto en el decaimiento (Subsección 7.1.3).

En la Figura 49 se muestran los decaimientos de la emisión fosforescente registradas en soluciones de Bip, Fop, Cap y Ptr disueltas en etanol absoluto a 77 K. La mayoría de ellos presenta un comportamiento mono-exponencial, salvo Fop el cual decae con una cinética biexponencial. En la Figura 49 también se muestra la que la distribución de los residuos correspondientes para cada ajuste.

A partir del ajuste de las señales se calcularon los τ_p que se resumen en la Tabla 9. En general, a 77 K se observan tiempos de vida del orden de 1 segundo para Bip y Cap y un poco menor para Ptr. Mientras que Fop posee dos tiempos de vida uno corto de 0,174 segundos y otro más largo similar al de Ptr de 0,74 segundos.

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIADENOSINA 5'-MONOFOSFATO POR BIOPTERINA Y SUS FOTOPRODUCTOS

Bip y sus fotoproductos, *Fop* y *Cap* forman parte de la familia de las pterinas oxidadas. Estos tres compuestos en particular son importantes desde el punto de vista biomédico porque se ha encontrado que se acumulan en la piel de pacientes afectados por vitiligo. Tal como se explicó en la introducción (Sección 3.6), esta enfermedad cutánea se caracteriza por manchas blancas que se deben a una falla en la síntesis de melanina, y por lo tanto, existe una deficiencia en la protección contra la radiación solar.

El objetivo general de éste y el siguiente capítulo es evaluar la capacidad de estos compuestos para actuar como potenciales fotosensibilizadores de biomoléculas. Específicamente se evaluó la capacidad de fotoinducir algún daño en el ADN a través de la degradación de sus componentes. Para ello, en la primera etapa se utilizó como sustrato al nucleótido *dAMP*. Este compuesto posee varias características que lo posicionan como sustrato modelo adecuado para el estudio de procesos fotosensibilizados mediados por un mecanismo Tipo I (Sección 1.4). En primer lugar, en trabajos previos se ha demostrado que esta molécula prácticamente no reacciona con $^1\text{O}_2$ [141]. Además, por poseer una base púrica en su estructura, es susceptible a participar en procesos de transferencia electrónica [15]. Por otro lado, desde el punto de vista analítico, es altamente soluble en agua, lo cual permite trabajar en amplios rangos de concentración en dicho solvente. Además se conoce su espectro de absorción, como así también su coeficiente de extinción molar a 260 nm [126]. Por último, es fácilmente cuantificable por métodos cromatográficos lo cual es de gran ayuda en sistemas en donde se generan muchos productos de reacción, en este caso particular, debido no solo al proceso fotosensibilizado sino también a la rápida fotodegradación de los sensibilizadores utilizados.

Como otros miembros de la familia de las pterinas, los compuestos a estudiar poseen un equilibrio ácido base con un $pK_a \approx 8$ [87], (Sección 3.2). En condiciones normales el pH de la piel es ácido, con valores de pH entre 4 y 6, mientras que el resto del cuerpo mantiene un pH cercano a la neutralidad, entre 7 y 9 [142]. Considerando que los sensibilizadores utilizados en este trabajo se encuentran presentes en la piel, los experimentos se realizaron a pH 5,5, para asemejar las condiciones celulares. Por otro lado, considerando el equilibrio ácido-base de los sensibilizadores, a pH 5,5 más del 99% de los mismos se encuentran en sus correspondientes formas protonadas.

Con respecto a la molécula del nucleótido, ésta posee varios equilibrio ácido-base, pero el único de relevancia para la condición de pH antes mencionada es el equilibrio que tiene lugar en el grupo fosfato, con un $pK_{a2} \approx 6,22$. Este equilibrio, no tiene efecto sobre el espectro de absorción del nucleótido, debido a que el grupo fosfato se encuentra alejado de la porción púrica, que es el cromóforo de la molécula (Sección 2.2).

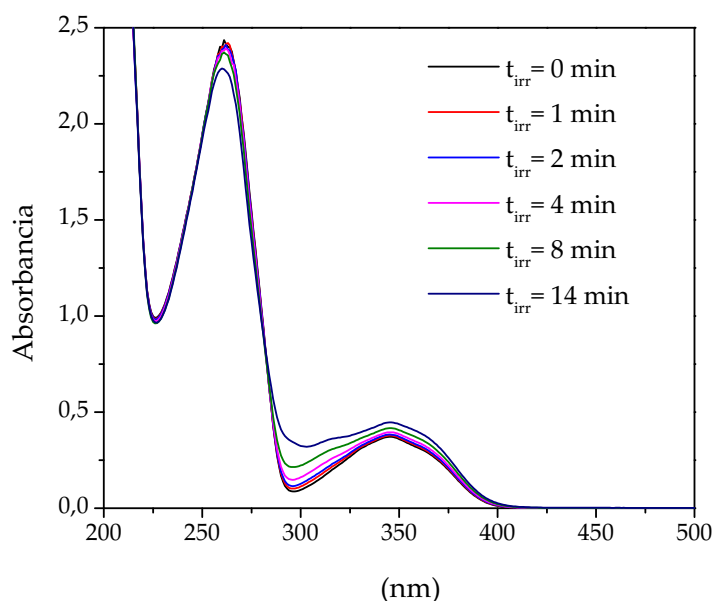


Figura 50: Evolución de los espectros de absorción con el tiempo de irradiación de una solución acuosa equilibrada con aire de *dAMP* y *Bip*. $dAMP_0 = 300 \text{ M}$; $Bip_0 = 150 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$; camino óptico = 1 cm.

En este capítulo se presentan resultados de experimentos de irradiación estacionaria y resueltos en el tiempo en los cuales soluciones acuosas conteniendo el nucleótido y un dado sensibilizador (*Bip*, *Fop*, *Cap* o *Ptr*) se expusieron a radiación UV-A. Las soluciones irradiadas se analizaron por espectroscopia UV-visible para observar los cambios espectrales de las mezclas, y por *HPLC* para cuantificar el consumo del sustrato y del sensibilizador, como así también la formación de los productos correspondientes a los diferentes procesos. Por otro lado, se llevaron a cabo estudios utilizando la técnica de *LFP* para evaluar la interacción de los estados excitados tripletes con el sustrato y para identificar la formación de especies radicalarias. El análisis de los resultados se enfocará en la dilucidación de los mecanismos de reacción.

9.1 BIOPTERINA COMO SENSIBILIZADOR DE *dAMP*

9.1.1 Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de *Bip*

Para comenzar el estudio del proceso fotosensibilizado de *dAMP* fue necesario probar si *Bip* era capaz de degradar al nucleótido bajo irradiación UV-A. En la *Figura 50* se muestra la evolución de los espectros de absorción de una mezcla que contenía *dAMP* 300 M y *Bip* 150 M para distintos tiempos de irradiación (t_{irr}). En la zona comprendida entre 200 y 300 nm que corresponde a la suma del espectro de absorción del nucleótido y *Bip*, se observa una disminución de la absorbancia con el tiempo de irradiación, mientras que en la región entre 300 y 400 nm se observa un aumento de la absorbancia. Sin embargo, para este sistema no fue posible obtener información a partir de los cambios espectrales

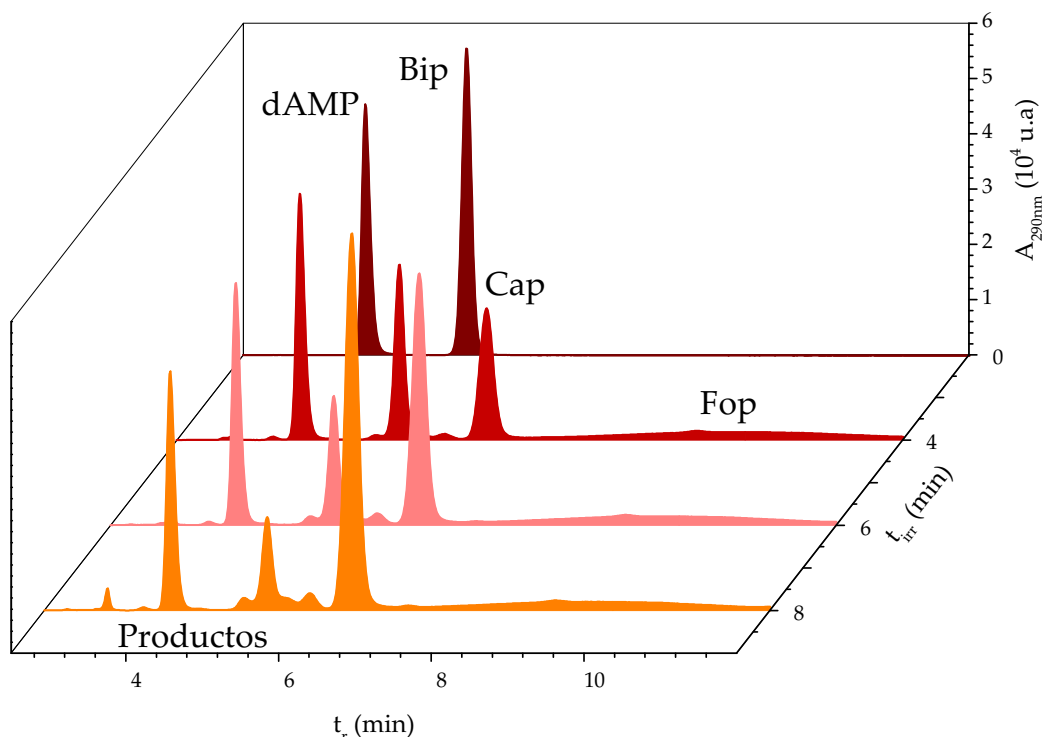


Figura 51: Cromatogramas a distintos tiempos de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con aire que contenían dAMP y Bip. $dAMP_0 = 320 \text{ M}$; $Bip_0 = 150 \text{ M}$; $pH = 5,5$; $\lambda_{irradiación} = 290 \text{ nm}$.

observados, debido a que el sensibilizador empleado para este estudio, bajo irradiación UV-A se fotooxida a Fop con un $k_{Bip} = 0,037 - 0,003$ en aire. Fop bajo irradiación UV-A se fotooxida a Cap, el que, por último, también bajo irradiación se decarboxila para dar Ptr (Sección 4.2). Esta serie de compuestos absorben en la misma región del espectro electromagnético (Capítulo 3). Por lo tanto, los cambios espectrales que se observan no pueden atribuirse exclusivamente al proceso fotosensibilizado, sino que podrían deberse al proceso de fotodegradación del sensibilizador o bien a los dos procesos en conjunto.

Las muestras irradiadas se analizaron mediante la técnica de HPLC. En la Figura 51 se muestran los cromatogramas registrados a 290 nm a distintos tiempos de irradiación para una solución conteniendo Bip (150 M) y dAMP (320 M). En ausencia de irradiación ($t_{irr}=0$) se observan los picos correspondientes a los reactivos, dAMP con un t_r de 4,4 minutos y el segundo pico, Bip, con un t_r de 5,8 minutos. Si se considera el pico correspondiente al nucleótido, la disminución del área del pico no disminuye de forma apreciable con el tiempo de irradiación. Sin embargo, se puede ver claramente la formación de picos con tiempos de retención mayores y menores al de dAMP que corresponderían a productos provenientes del proceso fotosensibilizado y que crecen conforme aumenta el tiempo de irradiación. Estos picos se diferencian de los picos correspondientes a los productos de la fotodegradación de Bip, que aparecen a t_r de 7 y 10 minutos y corresponden a Cap y Fop, respectivamente. Esto se comprobó inyectando soluciones patrón de dichos compuestos, y comparando los tiempos de retención y los espectros extraídos de los cromatogramas

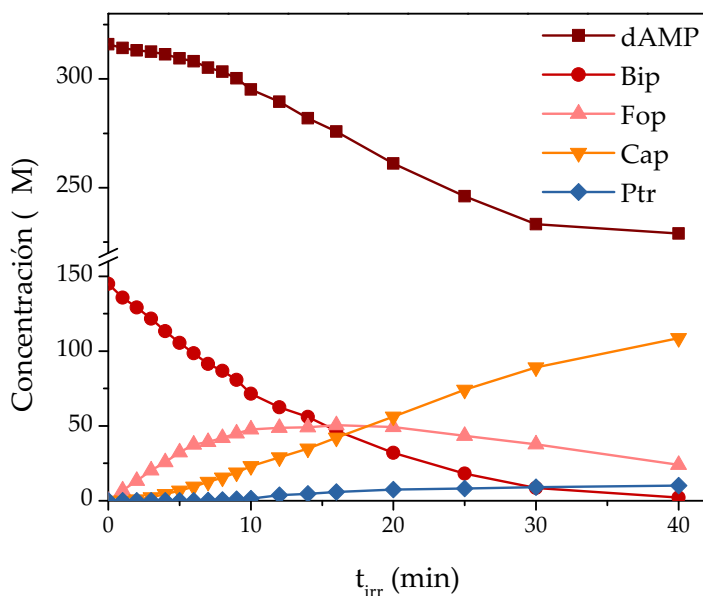
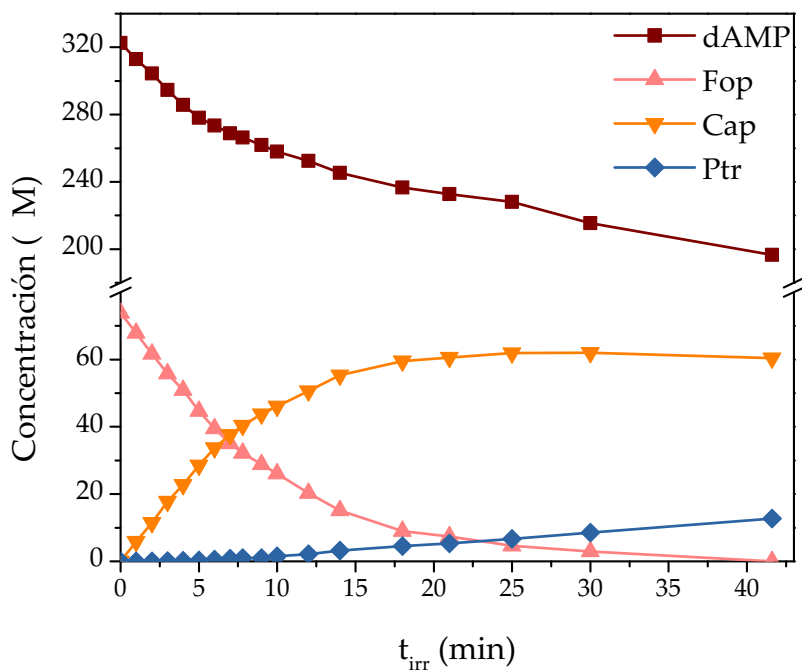


Figura 52: Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de *dAMP* y *Bip*. $dAMP_0 = 320 \text{ M}$; $Bip_0 = 150 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$.

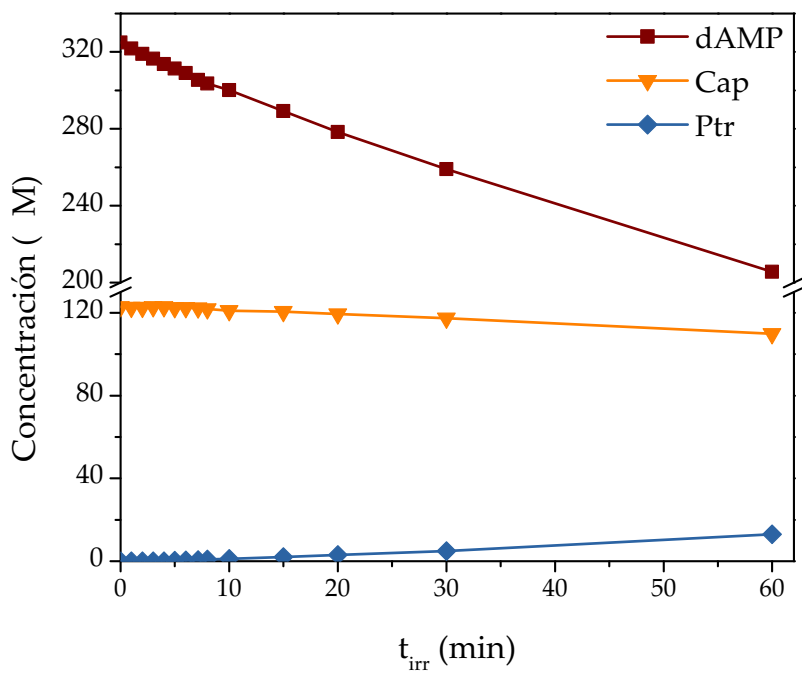
con los datos obtenidos en presencia de *Bip* y *dAMP*. Este resultado indica además que, al menos cualitativamente, el proceso de fotooxidación de *Bip* y sus fotoproductos es el mismo que el observado en ausencia de *dAMP*.

Se integraron los picos correspondientes a *dAMP*, en cromatogramas registrados a 260 nm, y los correspondientes a *Bip*, *Fop*, *Cap* y *Ptr* registrados a 340 nm, para los distintos tiempos de irradiación; las áreas se convirtieron a concentración utilizando las correspondientes curvas de calibración (Capítulo 6) y de esta manera se construyeron los perfiles de concentración (Figura 52). Se observó que a medida que aumenta el tiempo de irradiación disminuye la concentración del nucleótido, fenómeno que continúa aún cuando el sensibilizador inicial, *Bip*, se consumió para dar los productos de fotólisis *Fop*, *Cap* y *Ptr*. Si se analiza en detalle el comportamiento de la velocidad inicial de consumo del nucleótido, se observa una pequeña disminución de la concentración de *dAMP* en los primeros minutos de la exposición a la radiación, en donde a pesar que *Bip* se está degradando, se puede considerar que se encuentra en mayor proporción con respecto a sus fotoproductos. Cuando el tiempo de irradiación es mayor a 5 minutos, el consumo de *dAMP* se ve acelerado; en este punto se consumió más del 50% de *Bip* inicial. Por lo tanto se podría considerar que los productos *Fop*, en mayor medida, y posiblemente *Cap*, estarían participando en el proceso fotosensibilizado.

Para confirmar esta hipótesis, se realizaron irradiaciones de soluciones que contenían *dAMP* y *Fop* como sensibilizador inicial y soluciones que contenían *dAMP* y *Cap*. En la Figura 53 se puede observar un consumo apreciable del sustrato para ambos fotosensibilizadores, lo que indica que *Fop* y *Cap* son capaces de fotosensibilizar *dAMP* en medio ácido. Por consiguiente, la aceleración en la velocidad de consumo de *dAMP*, podría ser



(a) Fop



(b) Cap

Figura 53: Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dAMP utilizando Fop o Cap como sensibilizador. $dAMP_0 = 320 \text{ M}$; $Fop_0 = 75 \text{ M}$; $Cap_0 = 120 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

consecuencia de los productos de fotooxidación, los cuales serían sensibilizadores más eficientes que Bip.

Para evaluar la participación del O_2 en el proceso fotosensibilizado se irradiaron soluciones acuosas que contenían dAMP, y Bip o Fop, equilibradas con aire, en comparación con soluciones que se burbujearon durante 20 minutos con Ar, para eliminar el O_2 del medio. En la [Figura 54](#) se muestra el consumo del nucleótido en presencia y ausencia de O_2 . En las soluciones saturadas con Ar no se observa consumo apreciable del sustrato con respecto a las soluciones equilibradas con aire. A partir del análisis de este resultado se puede interpretar que el O_2 es indispensable para que se produzca consumo del sustrato, por lo tanto se puede pensar que dAMP sufre una oxidación durante la reacción fotosensibilizada.

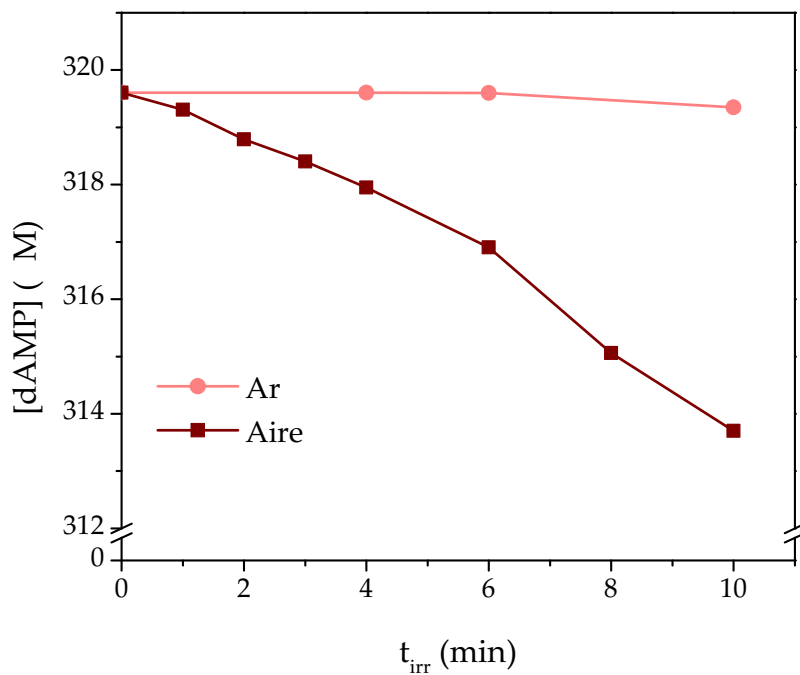
9.1.2 Controles

El primer control se realizó para descartar la existencia de una reacción térmica entre dAMP y Bip. Para ello soluciones acuosas de dAMP y Bip o Fop, se conservaron en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante distintos períodos de tiempo. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV-visible y HPLC. Estos ensayos se llevaron a cabo en medio ácido y con distintas concentraciones de nucleótido y sensibilizador. En todos los casos se observó que los espectros de absorción de las soluciones y las concentraciones no se modificaron aún después de transcurridos más de 90 minutos ([Figura 55](#)).

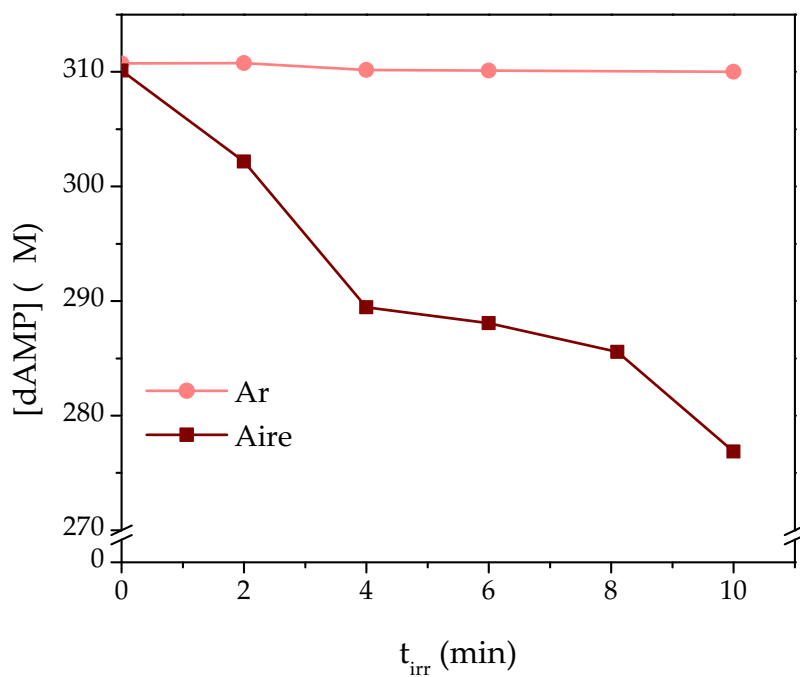
El segundo control consistió en irradiar soluciones acuosas de dAMP a 350 nm en ausencia de sensibilizador. A distintos tiempos de irradiación se tomaron los espectros de absorción y se analizaron las soluciones por HPLC. No se observaron cambios espectrales ni variación en la concentración ([Figura 56](#)), indicando que no se produjeron cambios químicos en la molécula de dAMP. Esto es lógico ya que el nucleótido no absorbe radiación a la longitud de onda de irradiación (Sección 2.2).

9.2 PARTICIPACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES

La primera etapa de la investigación de los mecanismos involucrados consistió en estudiar la participación de los estados excitados tripletes del sensibilizador (3Pt). Es decir, evaluar si dichas especies reactivas, generadas luego de la absorción de un fotón, son las responsables de iniciar la degradación del nucleótido. Teniendo en cuenta que Bip y Fop son las principales pterinas que se encuentran presentes en el medio durante el consumo del sustrato que se observa en la [Figura 52](#), en los experimentos que se presentarán a continuación y en las secciones siguientes, se utilizaron como sensibilizadores Bip y Fop.



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 54: Evolución de la concentración de dAMP con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas con Ar utilizando como sensibilizador Bip y Fop. $dAMP_0 = 320 \text{ M}$, $Bip_0 = 117 \text{ M}$; $dAMP_0 = 310 \text{ M}$; $Fop_0 = 74 \text{ M}$.

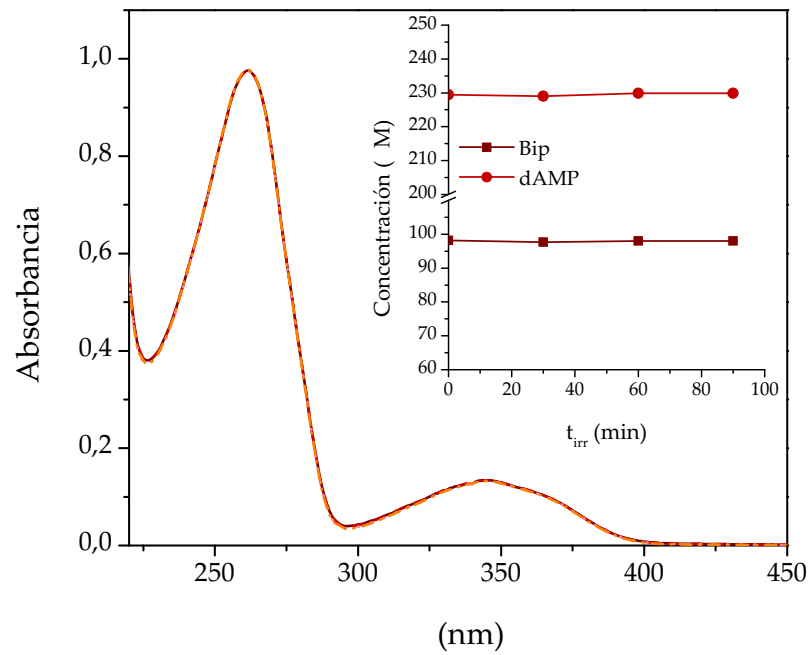
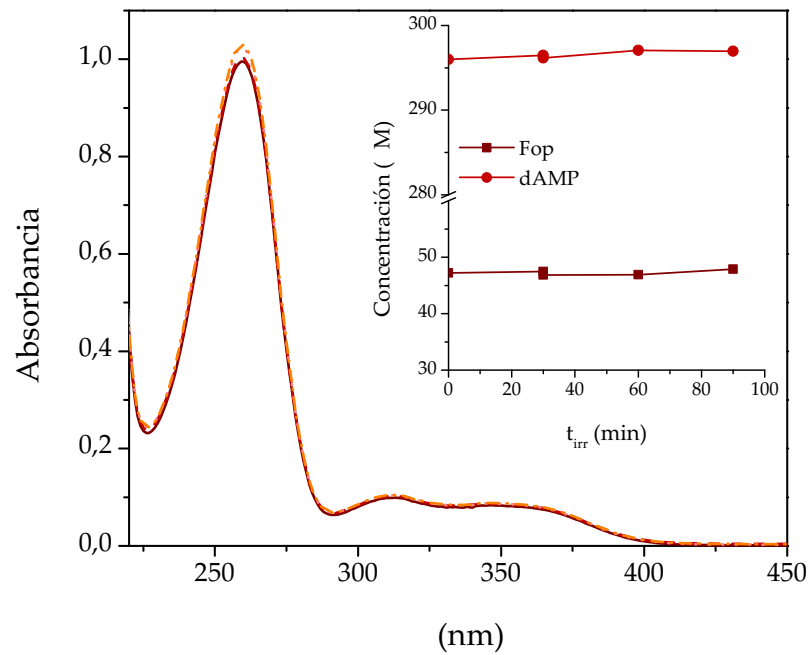
(a) Sensibilizador: *Bip*(b) Sensibilizador: *Fop*

Figura 55: Espectros de absorción de soluciones que contenían de *dAMP* y un sensibilizador, *Bip* o *Fop*, mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min). Bip_0 230 M, Bip_0 98 M; o Fop , $dAMP_0$ 295 M, Fop_0 47 M; pH= 5,5. *Inset*: Concentración de *dAMP* y el sensibilizador en función del tiempo determinadas por HPLC. Camino óptico = 0,4 cm; ; pH= 5,5.

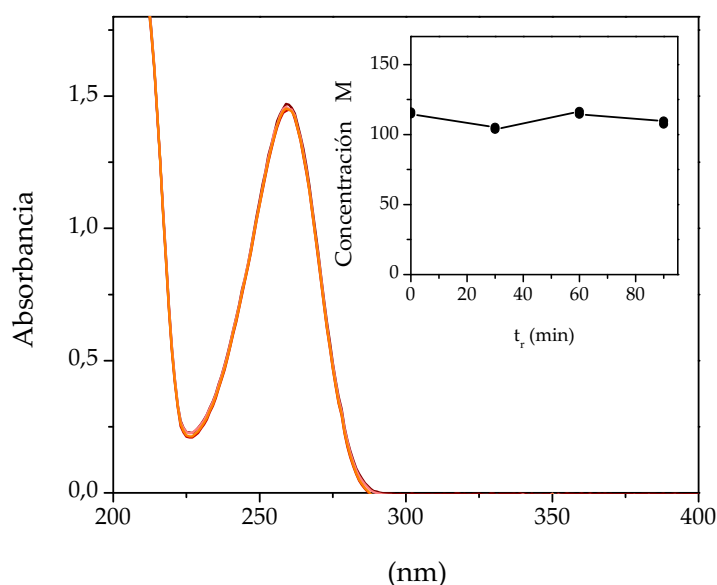


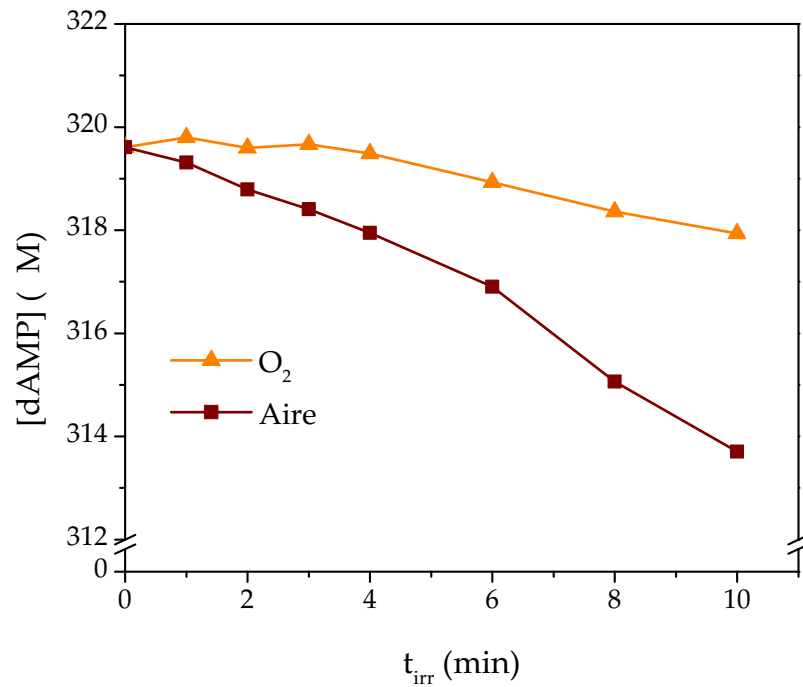
Figura 56: Espectros de absorción de soluciones de dAMP expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min). *Inset*: concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación determinada por HPLC. $dAMP_0 = 100 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; camino óptico = 1 cm.

9.2.1 Rol del O_2

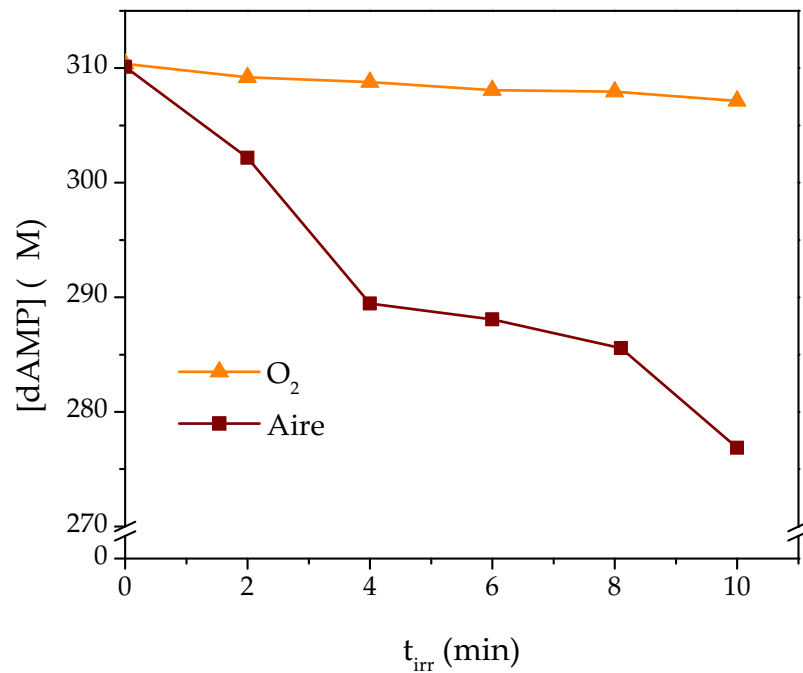
Se realizaron experimentos aumentando la concentración de O_2 a condiciones de saturación (1.28 mM), burbujando las soluciones a irradiar durante 20 minutos con O_2 (Subsección 5.2.3). Se cuantificó el consumo del sustrato en función del tiempo de irradiación en estas condiciones y se comparó con respecto a soluciones irradiadas en idénticas condiciones, pero equilibradas con aire (Figura 57). En experimentos independientes realizados tanto con Bip como con Fop, se observa que la velocidad de consumo de dAMP disminuye cuando el O_2 aumenta a concentración de saturación. Este resultado en principio parece contradictorio, es decir al aumentar la concentración de uno de los reactivos disminuye la velocidad de consumo. Sin embargo, este comportamiento se puede explicar si se considera la capacidad que tiene el O_2 en el estado fundamental para desactivar eficientemente los estados excitados tripletes de las pterinas (Subsección 8.1.3). Por otro lado, se determinó que el O_2 no desactiva los estados excitados singletes de las pterinas, aún en condiciones de saturación [143]. Por consiguiente, se podría pensar que los 3Pt , ya sea de Bip o Fop, están directamente involucrados y son las especies precursoras del proceso fotosensibilizado.

9.2.2 Irradiación en presencia de yoduro de potasio

Se conoce que el KI en cierto rango de concentraciones desactiva eficientemente los estados excitados singletes o tripletes de las pterinas (Subsección 5.4.1). Se puede utilizar



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 57: Evolución de la concentración de *dAMP* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas en O_2 , utilizando como sensibilizador: *Bip*, $dAMP_0 = 320 \text{ M}$, $Bip_0 = 120 \text{ M}$; o *Fop*, $dAMP_0 = 310 \text{ M}$; $Fop_0 = 75 \text{ M}$.

esta característica para evaluar la participación de los estados excitados del sensibilizador en el mecanismo de reacción. Para ello, se plantearon experimentos para comparar el consumo de dAMP en ausencia y en presencia 300 μ M de KI, concentración a la cual solo se desactivan los ^3Bip y ^3Fop , pero no los correspondientes estados excitados singletes.

En la [Figura 58](#) se muestra el efecto que tiene la presencia de KI sobre el consumo del nucleótido utilizando como sensibilizadores Bip o Fop. Para ambos casos la presencia de KI inhibe casi por completo el consumo de dAMP, comparando estos datos con un experimento realizado en ausencia de dicho compuesto en idénticas condiciones de irradiación. Este resultado confirma la hipótesis a cerca de la participación de los estados excitados tripletes en el proceso.

9.2.3 Efecto de dAMP sobre la fotoquímica de Bip

La fotooxidación de Bip para dar Fop ocurre desde los estados excitados tripletes de Bip (Sección 4.2). Por otro lado, los resultados mostrados hasta el momento en el presente capítulo sugieren que en la fotosensibilización de dAMP participan también los estados excitados tripletes de Bip. Por consiguiente, bajo irradiación y en presencia de dAMP ambos procesos deberían competir, lo cual implica que la fotooxidación de Bip debería estar parcialmente inhibida por el nucleótido. Para explorar esta hipótesis se comparó la velocidad de fotooxidación de Bip en presencia y en ausencia de dAMP.

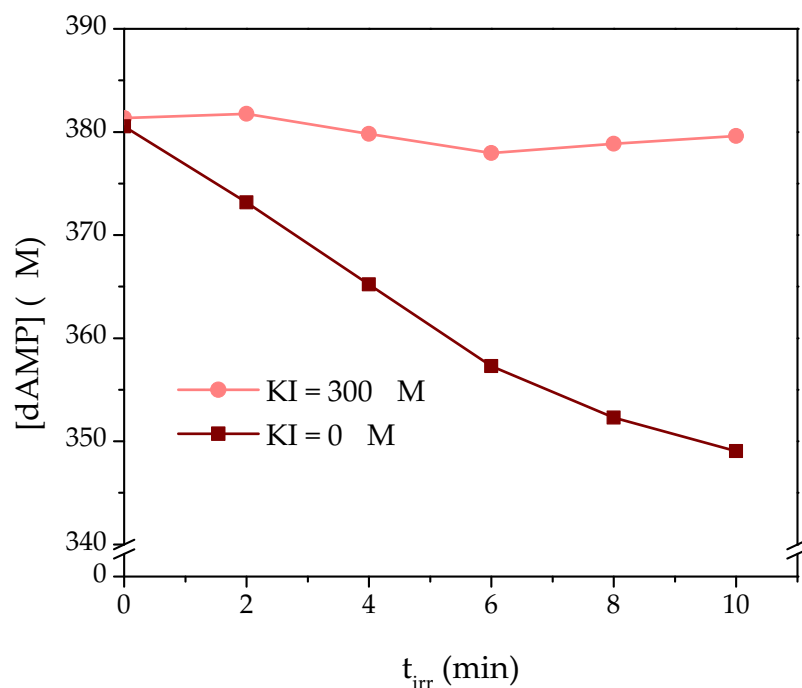
9.2.3.1 Irradiación en presencia de aire

Soluciones equilibradas con aire que contenían Bip en ausencia y en presencia de 350 μ M de dAMP fueron expuestas a radiación UV-A y luego se obtuvieron los perfiles de concentración por HPLC para Bip y sus productos ([Figura 59](#)). La reacción de fotooxidación experimentó una marcada inhibición. Se observó que tanto el consumo de Bip como la formación de productos es menor en presencia del nucleótido. Además, si se tiene en cuenta el balance de masas, se observa que el proceso fotoquímico es efectivamente el mismo que en ausencia de dAMP, pero ocurre a una velocidad menor.

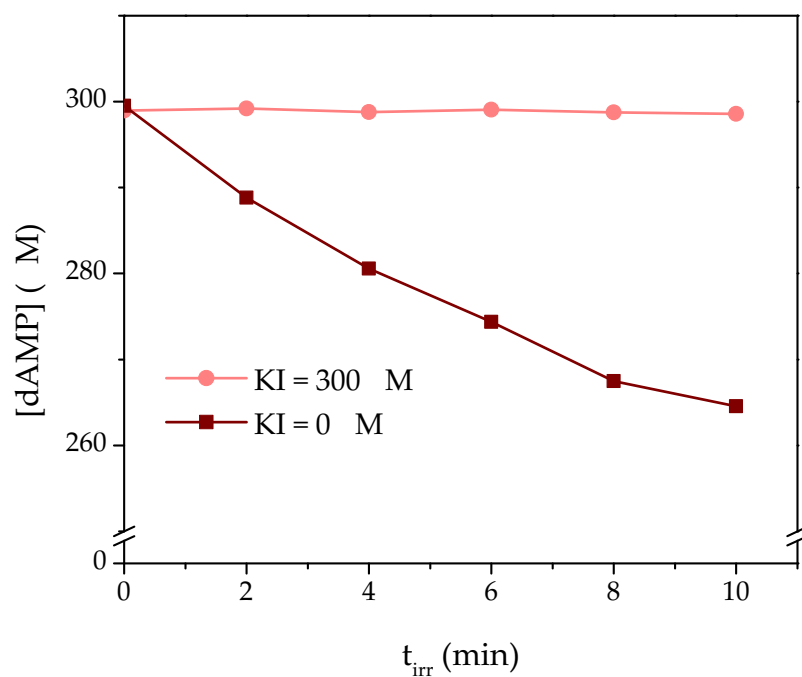
Considerando que la concentración de dAMP utilizada en los experimentos antes descritos, no desactiva el estado excitado singlete de Bip [144], este efecto inhibitorio sugiere la interacción entre los ^3Bip y dAMP, lo cual es una evidencia a favor de la hipótesis planteada anteriormente, es decir, dAMP reacciona con los tripletes de Bip provocando que los mismos no puedan evolucionar hacia productos oxidados. Esto a su vez es compatible con los resultados observados en la irradiación de soluciones saturadas con O_2 y en presencia de KI ([Figuras 57 y 58](#)).

9.2.3.2 Irradiación en ausencia de O_2

Tal como se detalló en la Subsección 4.2.2, en ausencia de O_2 y bajo irradiación UV-A Bip genera un intermediario, IR, que posee una banda de absorción centrada en 480 nm.



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 58: Evolución de la concentración de *dAMP* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de 300 M KI, utilizando como sensibilizador: Bip, $dAMP_0 = 380$ M, $Bip_0 = 109$ M; Fop, $dAMP_0 = 300$ M, $Fop_0 = 74$ M.

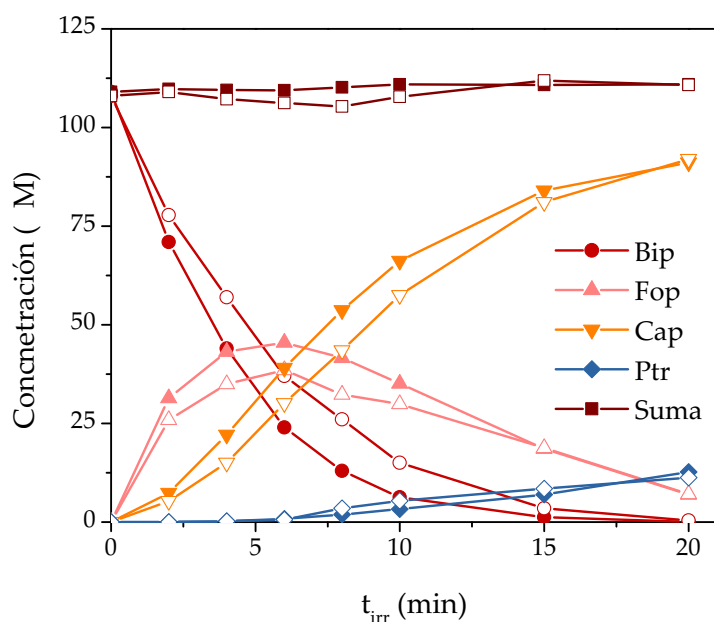


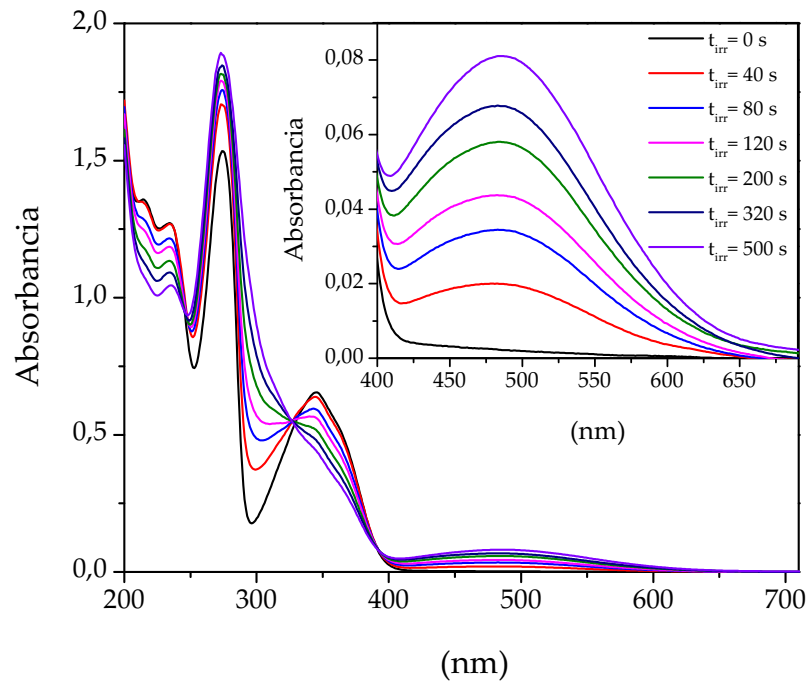
Figura 59: Fotodegradación Bip para soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip sin (símbolos llenos) y con el agregado de de dAMP (símbolos vacíos) a $\text{pH} = 5,5$. $dAMP_0 = 350 \text{ M}$, $Bip_0 = 109 \text{ M}$.

Este compuesto en presencia de O_2 reacciona rápidamente para dar Fop como producto estable. Por lo tanto, se puede monitorear la formación del IR midiendo la absorbancia a 480 nm para distintos tiempos de irradiación. En trabajos anteriores, se determinó que este compuesto se forma a partir del estado excitado triplete de Bip [108], por lo tanto se puede utilizar la formación del IR para evaluar la interacción del nucleótido con este estado excitado en ausencia de O_2 . Para ello se realizaron experimentos en donde soluciones acuosas saturadas con Ar que contenían Bip fueron irradiadas durante 10 minutos en intervalos de 20 segundos, en ausencia y en presencia de 300 M de dAMP.

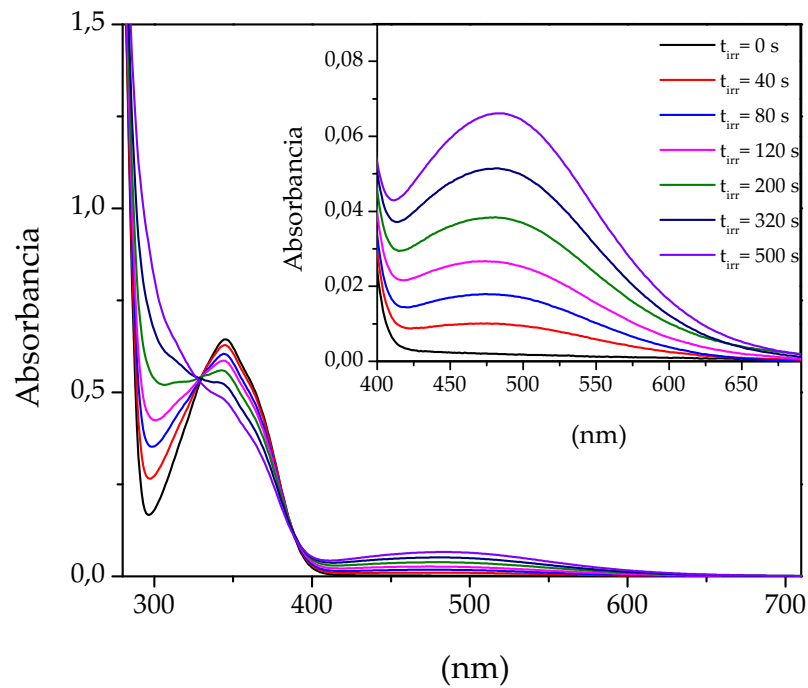
La Figura 60 muestra los cambios espectrales para las diferentes soluciones irradiadas en ausencia de O_2 . En el *inset* se muestra el aumento de la absorbancia entre 400 y 700 nm que corresponde a la formación del IR. Se observó que, en presencia del nucleótido, la formación del IR es mucho menor. Este efecto se puede apreciar con mayor claridad en la Figura 61 donde se compara la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación para ambas soluciones. Este comportamiento se puede adjudicar a la eficiencia de desactivación de los 3Bip por dAMP en ausencia de O_2 .

9.2.4 Desactivación de los estados excitados tripletes

Se plantearon experimentos de LFP con el objetivo de encontrar evidencia directa de la interacción entre los estados excitados tripletes de los sensibilizadores (Bip, Fop, Cap y Ptr) y el sustrato. Para cuantificar la desactivación de 3Pt por dAMP, se utilizaron soluciones burbujeadas 20 minutos con Ar que contenían un determinado sensibilizador



(a) Sin agregado de dAMP



(b) Con agregado de 300 M de dAMP

Figura 60: Espectros de absorción de soluciones saturadas en Ar para diferentes tiempos de irradiación. Soluciones de Bip con y sin agregado de dAMP. *Inset*: Cambio de la absorbancia entre 400 y 700 nm. $[Bip] = 100 \text{ M}$; $[dAMP] = 300 \text{ M}$; camino óptico = 1 cm.

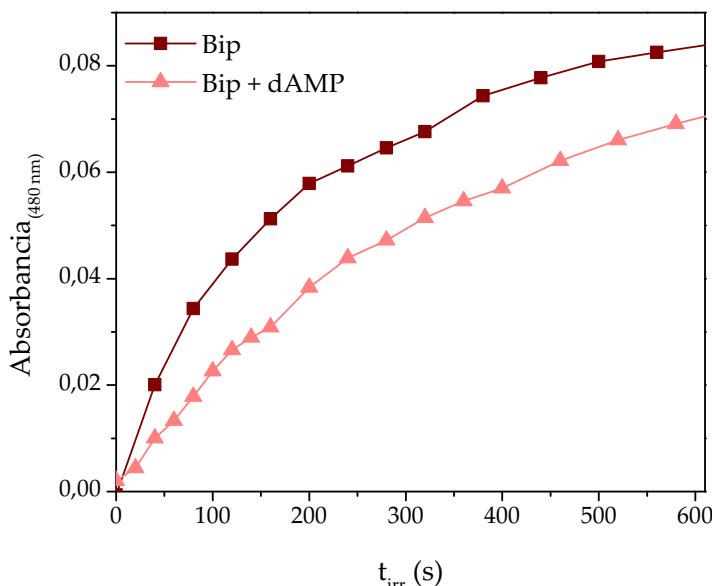
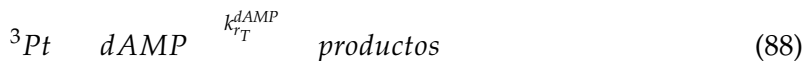


Figura 61: Aumento de la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación de soluciones saturadas con Ar a pH 5,5 de Bip en ausencia y en presencia de 300 M de dAMP.

y concentraciones crecientes del nucleótido. Luego se registraron los decaimientos de los 3Pt a 430 nm, (Capítulo 8). Una vez obtenidos los valores de τ a partir de los ajustes biexponencial de las señales, se realizó un análisis de Stern-Volmer utilizando la ecuación 84 (Subsección 1.1.2),

$$\frac{\tau}{\tau_0} = 1 + k_{tT}^{dAMP} \tau_0 [dAMP] \tag{84}$$

donde, τ_0 y τ son el tiempo de vida del triplete en ausencia y en presencia del desactivador, k_{tT}^{dAMP} es la constante de desactivación total de 3Pt por dAMP y $[dAMP]$ es la concentración de dAMP. Los valores de k_{tT}^{dAMP} corresponden al proceso de desactivación total, igual a la suma de las constantes de desactivación física (k_{qT}^{dAMP}) y química (k_{rT}^{dAMP}) de 3Pt por dAMP (reacciones 87 y 88). A temperatura ambiente y en ausencia de dAMP y de O_2 , el 3Pt vuelve al estado fundamental por una desactivación no radiativa (reacción 86) por lo tanto, $\tau_0 = \frac{1}{k_{dT}}$, donde k_{dT} es la constante de velocidad para la desactivación unimolecular de 3Pt .



COMPUESTO	$k_{t_T}^{dAMP} \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$			
	T_c		T_l	
Bip	0,9	0,1	1,1	0,2
Fop	0,9	0,1	1,3	0,2
Cap	0,2	0,1	1,6	0,3
Ptr	0,6	0,1	1,4	0,2

Tabla 10: Constantes de desactivación total de 3Pt por *dAMP* a pH = 5,5 calculadas para las especies T_c y T_l .

En todos los casos se obtuvieron gráficas lineales para ambos tripletes (Figura 62), y de las correspondientes pendientes se calcularon las constantes de desactivación de 3Pt por *dAMP* para cada compuesto estudiado. En la Tabla 10 se resumen los valores de $k_{t_T}^{dAMP}$ obtenidos a pH 5,5 para las dos especies excitadas triplete de los sensibilizadores. Los valores de $k_{t_T}^{dAMP}$ resultaron similares para los cuatro compuestos, dentro del error experimental.

Un vez formado el 3Pt a partir de la absorción de un fotón, en presencia de O_2 las reacciones descritas anteriormente (86 a 88) van a competir con la vía de desactivación por O_2 (reacción 86).



A partir de los valores de $k_{t_T}^{dAMP}$ (Tabla 10) y $k_{q_T}^{O_2}$ (Capítulo 8 Tabla 8) es posible evaluar la competencia entre el O_2 y *dAMP* por la desactivación de 3Pt y, de esta manera, analizar el efecto del O_2 en la velocidad de la degradación fotosensibilizada de *dAMP* observada en los experimentos de irradiación continua (Subsección 9.2.1 Figura 57). La fracción de 3Pt (en este caso, $^3Pt = ^3Bip$ o 3Fop) desactivado por *dAMP* en presencia de O_2 (f_q^{dAMP}) se puede calcular con la ecuación 90.

$$f_q^{dAMP} = \frac{k_{t_T}^{dAMP} [dAMP]}{k_d + k_{q_T}^{O_2} [O_2] + k_{t_T}^{dAMP} [dAMP]} \quad (90)$$

Para las condiciones de concentración de *dAMP* utilizadas en los experimentos de la Figura 57, y aplicando la ecuación 90 se obtuvieron los valores de f_q^{dAMP} que se resumen en la Tabla 11 para ambas especies excitadas tripletes (T_c , T_l) y para dos concentraciones de O_2 , soluciones equilibradas con aire $f_{q_{aire}}^{dAMP}$ y soluciones saturadas con O_2 $f_{q_{O_2}}^{dAMP}$. Comparando los valores obtenidos se puede apreciar que, un incremento en la concentración de O_2 reduce significativamente la eficiencia de la desactivación de los 3Pt de ambos sensibilizadores por *dAMP*. Lo cual explica y está de acuerdo con la disminución de la velocidad de consumo del nucleótido registrada en los experimentos realizados con soluciones saturadas en O_2 .

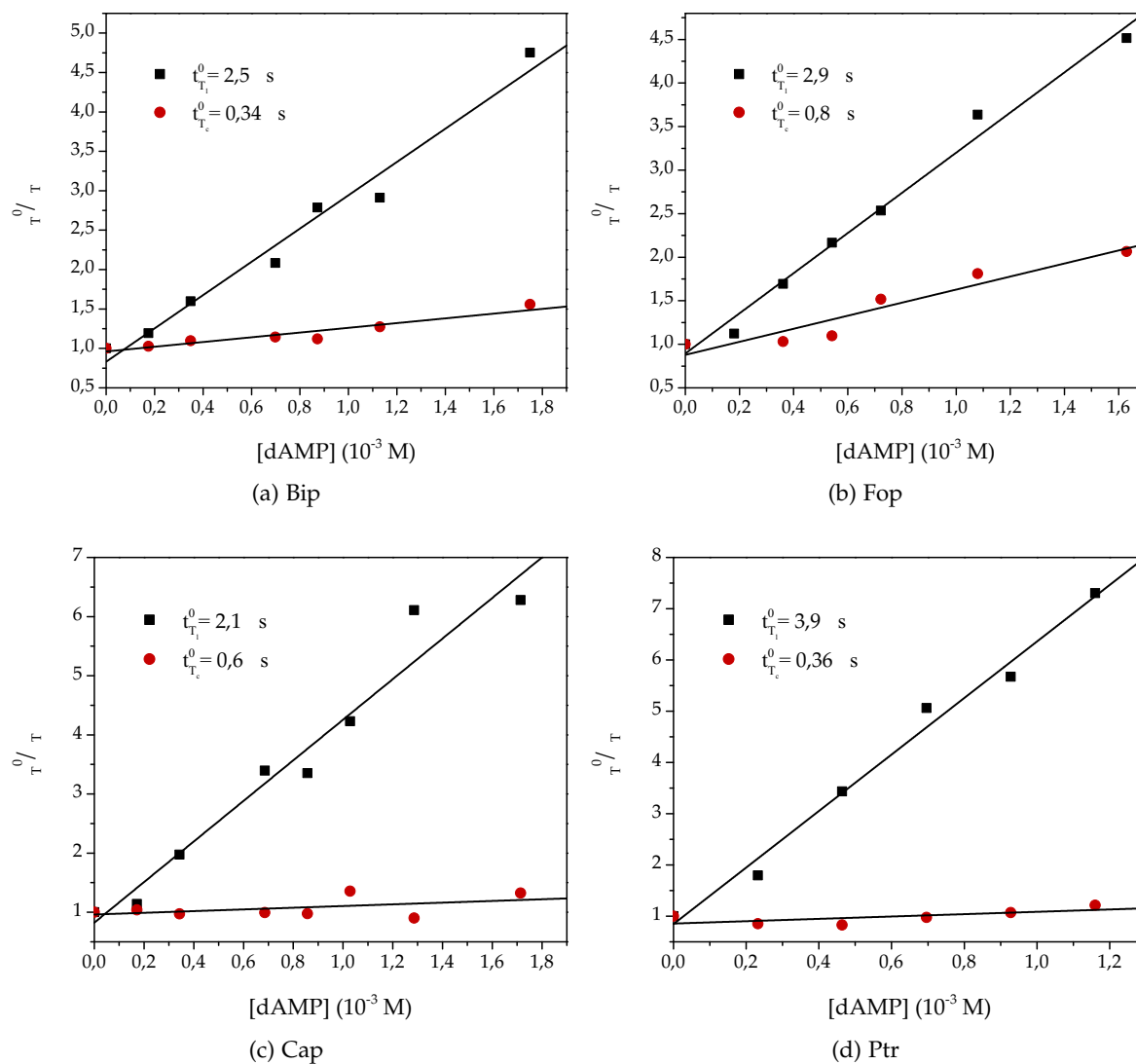


Figura 62: Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes por dAMP. T_c y T_l calculados a partir de los decaimientos registrados en soluciones acuosas saturadas con Ar a pH 5,5 de las pterinas oxidadas estudiadas y concentraciones crecientes de dAMP. exc 355 nm, ana 430 nm, Abs_{355nm} 0,5. Bip 80 M, Fop 55 M, Cap 68 M y Ptr 95 M.

	Bip		Fop	
	T_l	T_c	T_l	T_c
$f_{q_{aire}}^{dAMP}$	0,27	0,1	0,31	0,1
$f_{q_{O_2}}^{dAMP}$	0,12	0,07	0,15	0,07

Tabla 11: Fracción de 3Pt desactivado por dAMP en presencia de O_2 (f_q^{dAMP}) a pH = 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c , utilizando Bip y Fop como sensibilizadores.

9.3 FOTOSENSIBILIZACIÓN POR TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

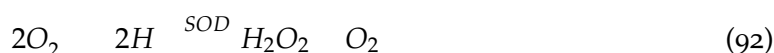
Todos los sensibilizadores presentes en el medio de reacción en los experimentos descritos anteriormente, *Bip*, *Fop*, *Cap* y *Ptr* son buenos sensibilizadores de oxígeno singlete (1O_2) [103]. Sin embargo, como se dijo anteriormente, el sustrato objeto de este estudio tiene una reactividad muy baja frente a esta especie reactiva de O_2 [141]. Por lo tanto, el proceso fotosensibilizado estaría llevándose a cabo por un mecanismo tipo I, es decir por una transferencia electrónica desde *dAMP* hacia el sensibilizador en un estado electrónicamente excitado, formándose los correspondientes pares radicales, el radical anión del sensibilizador (Pt^-) y el radical catión de *dAMP* ($dAMP^+$) (Reacción 91).



En la sección 9.2 se demostró la participación de los estados excitados tripletes en el proceso fotosensibilizado, por lo tanto la transferencia electrónica debería ocurrir desde la molécula de *dAMP* hacia el sensibilizador en el estado excitado triplete.

9.3.1 Irradiación en presencia de superóxido dismutasa

Se conoce que es típico en los mecanismos tipo I que el oxígeno en su estado fundamental reaccione de forma eficiente con el radical anión de las moléculas orgánicas para formar el anión O_2^- [145, 146]. Por lo tanto, se planteó evaluar la participación del O_2^- en el proceso fotosensibilizado inducido por *Bip* y sus fotoproductos. Para ello se realizaron experimentos de fotosensibilización y se midió el consumo del sustrato comparativamente en ausencia y en presencia de 50 U ml^{-1} de SOD (Subsección 5.4.2), esta enzima elimina el anión superóxido del medio catalizando la reacción de dismutación del O_2^- para dar H_2O_2 y O_2 [147, 148], reacción 92.



Se observó un aumento considerable en la velocidad de consumo de *dAMP* en presencia de SOD para ambos sensibilizadores utilizados (Figura 63). Este hecho sugiere, en primer lugar, que el O_2^- no reacciona apreciablemente con *dAMP*, porque al eliminar esta especie reactiva de O_2^- no se observa inhibición en la degradación del sustrato, sino por el contrario un aumento en la velocidad de consumo. Una explicación de éste comportamiento sería que, a partir de la eliminación del O_2^- del medio, se estaría eliminando o impidiendo una vía de recuperación de *dAMP*. Para aclarar este punto, con las hipótesis planteadas y comprobadas hasta el momento, se puede proponer un mecanismo de reacción del proceso fotosensibilizado. Por la absorción de un fotón se genera el 1Pt que, por ISC, se forman los 3Pt . Por transferencia electrónica del sustrato con los 3Pt , se formarían los correspondientes pares radicales, $dAMP^+$ y Pt^- . Este último reacciona eficientemente con el O_2 del medio para generar O_2^- y regenerar el sensibilizador en el

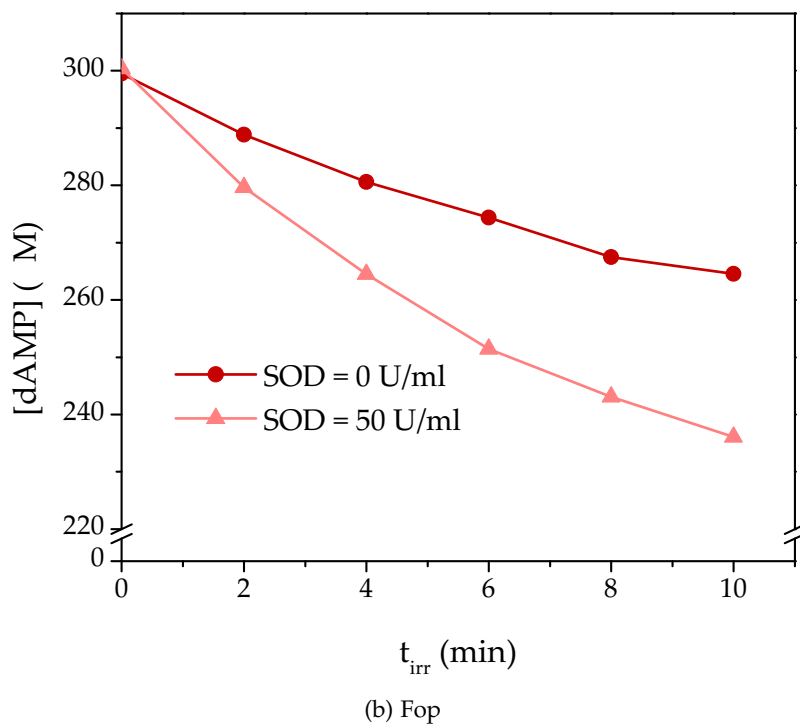
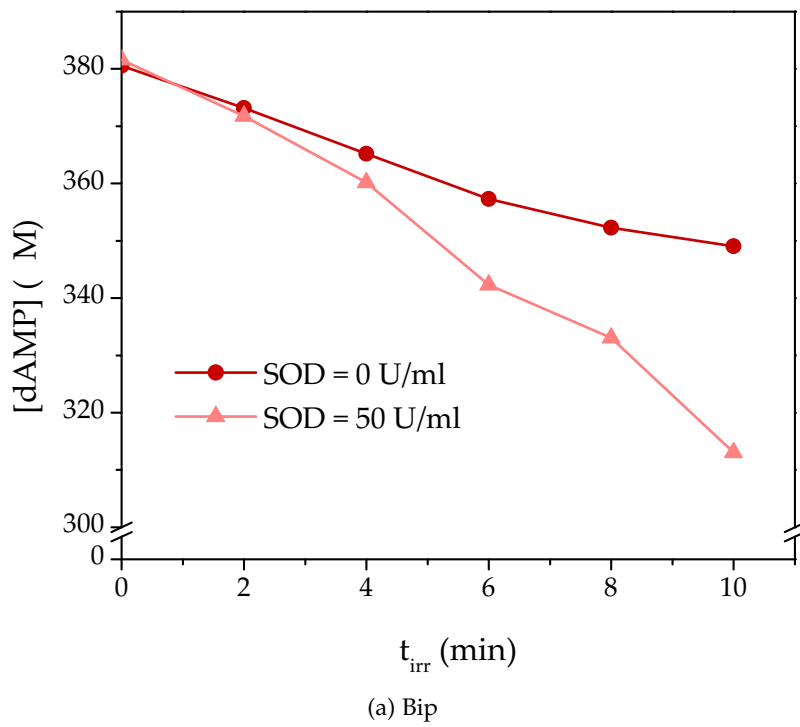


Figura 63: Evolución de la concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire con y sin agregado de SOD, utilizando como sensibilizador: Bip, $dAMP_0 = 380 \text{ M}$, $Bip_0 = 109 \text{ M}$; Fop, $dAMP_0 = 300 \text{ M}$, $Fop_0 = 74 \text{ M}$; $SOD = 50 \text{ U/ml}^{-1}$, $pH = 5.5$.

estado fundamental (reacción 93). Por otro lado, el radical catión dAMP puede reaccionar con el O_2 para dar los reactivos iniciales, dAMP y O_2 (Reacción 94). En presencia de SOD (reacción 92) se estaría impidiendo esta última vía de recuperación, lo cual explica el aumento de la velocidad de consumo de dAMP en dichas condiciones.



9.3.2 Cálculo de la variación de energía libre de Gibbs

Los resultados presentados hasta aquí, apoyan la hipótesis sobre el proceso de degradación del nucleótido dAMP iniciado con la transferencia electrónica desde la molécula de dAMP hacia el estado excitado triplete del sensibilizador. Se puede evaluar la factibilidad termodinámica de este proceso (Reacción 91) a través de la estimación del cambio de la energía libre de Gibbs en condiciones estándar de la reacción de transferencia electrónica fotoinducida ${}_{ET}G^0$. A menudo esta cantidad se puede calcular con bastante precisión a partir de propiedades independientemente determinadas de las especies dadora y aceptora involucradas. Así pues, por ejemplo, para la transferencia electrónica fotoinducida entre un aceptor (3Pt) y un donador neutro (dAMP) para formar un par iónico, el ${}_{ET}G^0$ en un disolvente con constante dieléctrica estática (ϵ_s) se puede calcular aproximadamente aplicando la ecuación 95[149],

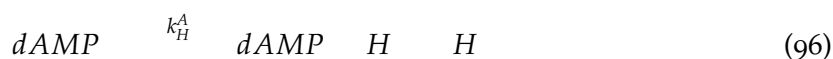
$${}_{ET}G^0 = N_A e E_{dAMP/dAMP} - E_{Pt/Pt} - \frac{e^2}{4\epsilon_0 \epsilon_s} - E_{0,0}^T \quad (95)$$

donde $e = 1,60 \cdot 10^{-19} C$ es la carga del electrón, $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} mol^{-1}$ es la constante de Avogadro, $E_{dAMP/dAMP}$ y $E_{Pt/Pt}$ son los potenciales de electrodo estándar para el donador y el aceptor, respectivamente, $\frac{e^2}{4\epsilon_0 \epsilon_s}$ es el cambio de energía de Gibbs para llevar a los dos iones radicales a una distancia de encuentro r , y $E_{0,0}^T$ es la diferencia de energía electrónica entre el estado excitado triplete y el estado electrónico fundamental. Los valores de potenciales de electrodo estándar han sido reportados para dAMP ($E_{dAMP/dAMP} = 1,18 V$ vs. NHE) [150] y para varios derivados de la familia de las pterinas ($E_{Pt/Pt} = 0,55 V$ vs. NHE) [151, 152]. El término $\frac{e^2}{4\epsilon_0 \epsilon_s}$ se puede despreciar en el caso de trabajar con solventes polares fuertes, con ϵ_s grandes, tales como el agua. El valor de $E_{0,0}^T$ de las pterinas se puede estimar a partir de los espectros de fosforescencia [152] (Sección 8.2). Del cálculo se obtuvo un valor aproximado de ${}_{ET}G^0 = 103,3 KJ mol^{-1}$, el cual resulta en un proceso exergónico y sustenta que la transferencia electrónica desde la molécula de dAMP hacia el estado excitado triplete del sensibilizador ocurre de forma espontánea.

9.3.3 Investigación del radical adenina

Con el objetivo de encontrar evidencia directa de la transferencia electrónica desde el sustrato, dAMP, hacia el sensibilizador se realizaron experimentos utilizando la técnica de LFP para identificar la formación del radical $dAMP^{\cdot}$. En estos experimentos se utilizó Ptr como sensibilizador en lugar de los demás compuestos utilizados en los experimentos anteriores. La elección de este compuesto se debe principalmente a que no se encontraron antecedentes de estudios de LFP de pterinas en presencia de dAMP. Por lo tanto, es indispensable iniciar el estudio de la identificación del radical $dAMP^{\cdot}$ con el compuesto más sencillo y estable dentro de esta familia, y de esta manera, evitar la interferencia debida al consumo del sensibilizador durante la medida.

El radical $dAMP^{\cdot}$ es un ácido fuerte, con un $pK_a \approx 1$ por lo tanto, al pH 5,5 esta especie va a perder un protón para dar el radical neutro $dAMP^{\cdot}H$ (ecuación 96) [41]. Este radical posee características espectroscópicas que permiten su identificación por LFP, un tiempo de vida largo (≈ 100 s), y una banda de absorción intensa alrededor de los 330 nm ($\epsilon_{330} \approx 4940 M^{-1} cm^{-1}$) y otra de menor intensidad a 600 nm [153].



Para realizar la detección del radical $dAMP^{\cdot}H$ por LFP se utilizaron soluciones a pH 5,5 burbujeadas con Ar durante 20 minutos que contenían $97 \mu M$ de Ptr y 2 mM de dAMP. Luego, las soluciones fueron expuestas al pulso del laser y se registraron los espectros de absorción de transientes con una escala de 10 s/división (Sección 7.2). En otro experimento similar se registraron los espectros en la misma escala pero de soluciones que contenían sólo Ptr en igual concentración a las soluciones anteriores. En la Figura 64 se muestran espectros diferencia obtenidos de la resta entre los espectros de absorción de transientes de la solución de dAMP y Ptr y los correspondientes espectros de Ptr sola a diferentes tiempos luego del disparo del láser. Se observa un transiente con un tiempo de vida mucho mayor que el de los tripletes de las pterinas, con una banda de absorción intensa centrada en 330 nm y otra señal de menor intensidad a 600 nm a un tiempo mayor que 65 s. Estas son señales características del radical $dAMP^{\cdot}H$, con lo cual se confirma la transferencia electrónica entre Ptr y dAMP.

En otro grupo de experimentos se registró la señal del transiente a 330 nm de soluciones que contenían Ptr y diferentes concentraciones de dAMP. Las señales se registraron con una escala de 2 s/división para analizar la formación del radical a diferentes concentraciones de nucleótido. En la Figura 65 se muestra una de las trazas de LFP obtenidas para dicho experimento, para una concentración de dAMP de $700 \mu M$. La señal sigue una cinética de primer orden, la cual crece a una determinada velocidad, alcanza un máximo en unos pocos s y se mantiene sin decaer, al menos dentro de la ventana de tiempo analizada. Se realizó el ajuste de las señales registradas a 330 nm aplicando la ecuación 97,

$$A_{330} = A_1 + A_2 \exp^{-kt} \quad (97)$$

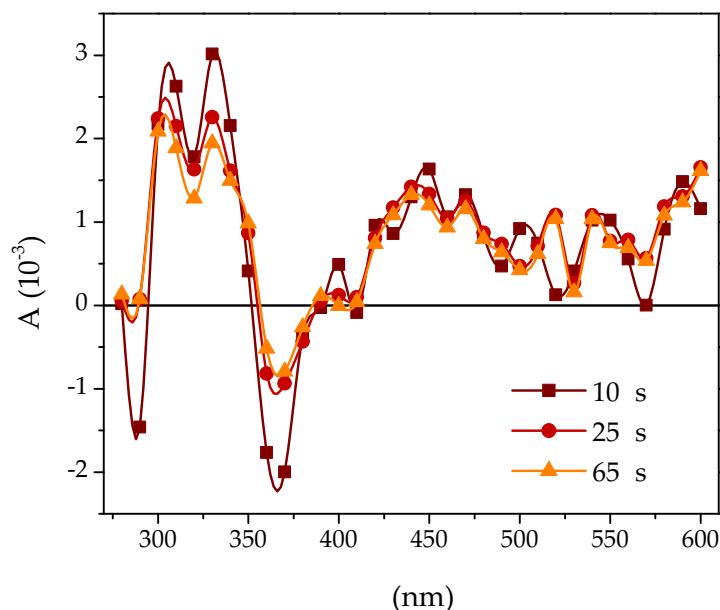


Figura 64: Espectro de absorción de transientes diferencia calculado como la resta entre el espectro registrado en una solución saturada en Ar de Bip (90 μ M) y dAMP (1 mM) menos el espectro de Bip sin agregado de dAMP registrado a pH 5,5. Escala 10 μ s/división ; $P_{tr} = 97$ M; $dAMP = 2$ mM; pH = 5,5.

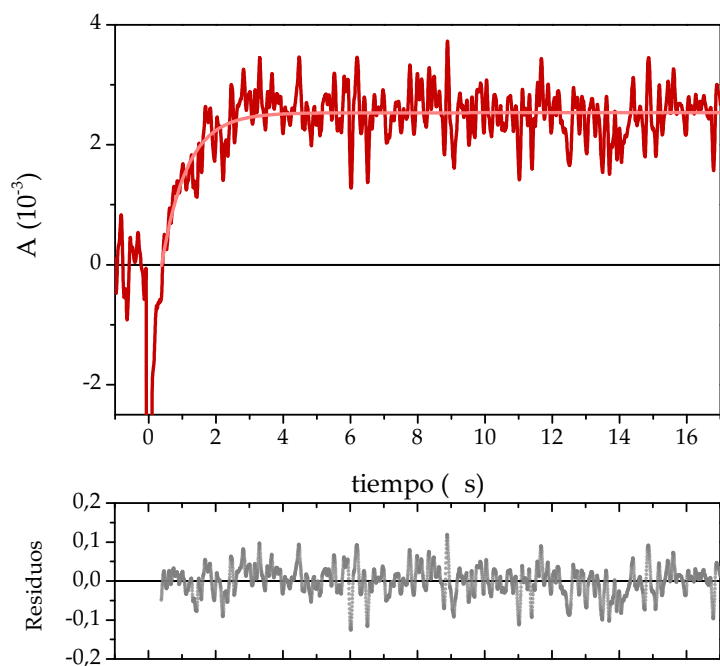


Figura 65: Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical $dAMP^{\cdot-}$ y distribución de los residuos para el ajuste de la señal. Traza registrada en una solución acuosa saturada en Ar a pH = 5,5 conteniendo P_{tr} y dAMP; escala 2 μ s/división; $P_{tr} = 90$ μ M; $dAMP = 700$ μ M.

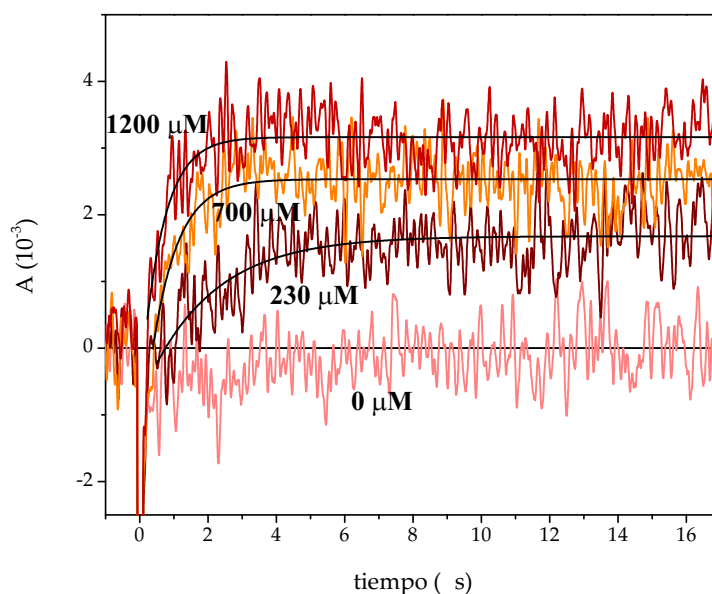


Figura 66: Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical $dAMP\ H$ para diferentes concentraciones de dAMP en soluciones acuosas saturadas en Ar a pH = 5,5; escala 2 s/división; $Ptr_0 = 90\ M$.

donde A_{330} es la variación de la diferencia de absorbancia registrada a 330 nm, A_1 es el valor de A_{330} cuando $t \rightarrow \infty$, A_2 es el factor pre-exponencial, y k es una constante. Dado que A_1 es igual a $\frac{A_{330}}{l} dAMP\ H$, el valor de este parámetro es directamente proporcional a la cantidad de radical formado. Si la señal corresponde efectivamente al radical $dAMP\ H$, a concentración fija de Ptr y a igual energía del láser, la cantidad de radical formado debería aumentar con la concentración de dAMP. Por otro lado, k es igual a la inversa del tiempo que demora en formarse el radical. Por lo tanto, este parámetro dependerá de la concentración inicial de dAMP. En la Figura 66 se muestran las trazas a diferentes concentraciones de dAMP, cuando en el medio solo está presente Ptr, la señal es nula a 330 nm, luego en presencia de dAMP el valor de A_1 aumenta con la concentración de dAMP. A partir del ajuste exponencial se calcularon los valores de k , la inversa de este valor corresponde al tiempo de formación del radical (t_f), el cual disminuye con el aumento de la concentración inicial de dAMP (Figura 67). Considerando que el radical se forma a partir del triplete de Ptr, se pueden comparar los valores de t_f calculados a 330 nm con los τ a 430 nm para la misma concentración de dAMP (Subsección 9.2.4). Estos valores son del orden del τ_1 , es decir que de los dos tripletes que posee la Ptr, solo el de tiempo de vida largo sería el responsable de la formación del radical.

En esta sección se obtuvo evidencia directa de la transferencia electrónica entre Ptr y dAMP a partir de la identificación del radical $dAMP\ H$ por LFP. Estos resultados se pueden extrapolar para los demás compuestos estudiados Bip, Fop y Cap, para los cuales se determinaron las correspondientes $k_{t_T}^{dAMP}$. A partir de los experimentos de irradiación estacionaria, se presentaron evidencias que respaldan la hipótesis que estos compuestos son capaces de fotosensibilizar mediante un mecanismo Tipo I.

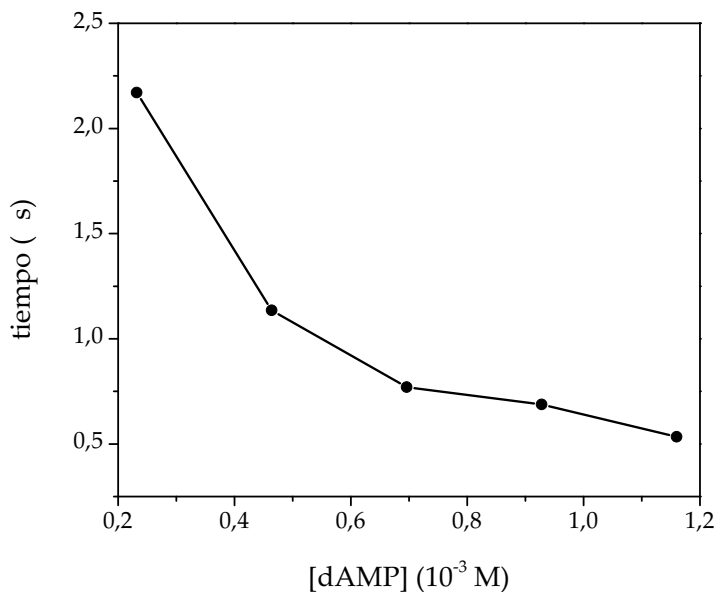
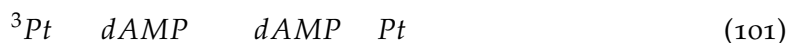
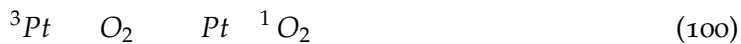


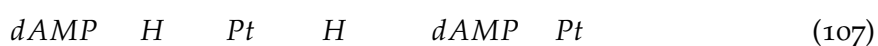
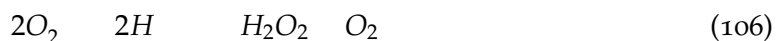
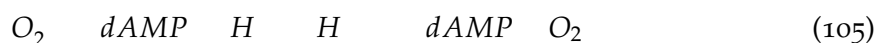
Figura 67: Tiempo de formación del radical *dAMP* H para diferentes concentraciones de *dAMP* en soluciones acuosas saturadas en Ar a pH = 5,5.

9.4 MECANISMO DE REACCIÓN

A lo largo de este capítulo se ha demostrado que durante la irradiación de una solución acuosa aireada conteniendo *Bip* y *dAMP* a pH = 5,5 se produce la degradación del nucleótido, mientras el sensibilizador también se consume para dar *Fop*, el cual, a su vez, se fotooxida subsecuentemente para dar *Cap*. La degradación de *dAMP* experimenta una aceleración cuando en el medio aumenta la concentración de *Fop*. El comportamiento observado muestra que tanto *Bip* como sus fotoproductos son capaces de fotosensibilizar al nucleótido *dAMP*, siendo *Fop* un sensibilizador más eficiente que su precursor *Bip*.

Considerando los resultados descriptos a lo largo del presente capítulo, se propone el siguiente mecanismo para la degradación de *dAMP* fotoinducida por *Bip*.





El mecanismo inicia con la absorción de un fotón por parte de Pt en el estado fundamental, para dar el sensibilizador en el estado singlete excitado (1Pt), que luego por ISC genera los estados excitados tripletes (3Pt). En presencia de O_2 y dAMP existen varias vías competitivas para la desactivación de 3Pt : la desactivación no radiativa para dar Pt en el estado fundamental (reacción 99); la transferencia de energía al O_2 para generar 1O_2 (reacción 100); la desactivación física por dAMP (reacción 101) y la reacción de transferencia electrónica con dAMP que lleva a la formación del par radical $dAMP$ y Pt (reacción 102). Este último reacciona eficientemente con el O_2 del medio para dar O_2 , y regenerar el sensibilizador en el estado fundamental. El radical catión $dAMP$ en medio ácido pierde un protón para dar el radical neutro $dAMP - H$ que, a su vez, puede reaccionar con el radical Pt en una reacción de recombinación que regenera los reactivos iniciales en el estado fundamental (reacción 107). Esta última reacción (107) explicaría la ausencia de consumo del nucleótido que se observa en los experimentos de irradiación estacionaria en condiciones anaeróbicas (Figura 54). El O_2 cumple un rol crucial en el proceso, ya que es indispensable para que se produzca el consumo del nucleótido. Sin embargo, si la concentración supera un cierto valor el proceso se inhibe. En este mecanismo la reacción principal que contribuiría de forma significativa al consumo de dAMP es la reacción 109 entre el radical $dAMP - H$ y el O_2 para dar productos de oxidación. Existiría una concentración de O_2 , no determinada, pero que debería ser menor a la concentración del O_2 en el aire, en donde la eficiencia del proceso es máxima. Por último, el radical $dAMP - H$ puede reaccionar con el O_2 para dar dAMP y O_2 (reacción 105) o bien para oxidar al nucleótido (reacción 108). De estas dos reacciones posibles, la primera debería ser la vía mayoritaria desde el punto de vista cinético, debido a que en presencia de SOD (enzima que cataliza las reacción 106) se observa un aumento en la velocidad de consumo de dAMP, por lo tanto, en la competencia el consumo del nucleótido debido a la reacción con O_2 es menos significativa que la reacción que recupera a dAMP (105).

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIGUANOSINA 5'-MONOFOSFATO POR BIOPTERINA Y SUS FOTOPRODUCTOS

En el capítulo 9 se demostró que *Bip* y sus fotoproductos, *Fop* y *Cap* son capaces de participar en procesos fotosensibilizados mediante un mecanismo tipo I, es decir, mediante una transferencia electrónica. Para probar este hecho se utilizó como sustrato el nucleótido de adenina, ya que justamente dAMP posee una reactividad muy baja frente 1O_2 , pero es susceptible de experimentar oxidaciones por pérdida de un electrón.

En este capítulo se utilizará otro sustrato de interés biológico y adecuado para el estudio de procesos fotosensibilizados, el nucleótido *dGMP*, cuya base nitrogenada es la guanina. Debido a su potencial de oxidación, la guanina es el componente del ADN más sensible a las oxidaciones fotosensibilizadas Tipo I [42]. Por otra parte, esta base nitrogenada es el único componente capaz de reaccionar en forma significativa con el 1O_2 (mecanismo Tipo II). Es decir, este nucleótido es el principal blanco de las oxidaciones fotosensibilizadas [42]. Por otra parte, todas las pterinas oxidadas no conjugadas en solución acuosa y bajo irradiación UV-A generan eficientemente 1O_2 (Sección 4.1). Por consiguiente, si se estudia la fotosensibilización de *dGMP* por *Bip*, se tiene una molécula blanco (*dGMP*) capaz de sufrir fotooxidación a través de los dos mecanismos mencionados y un sensibilizador capaz de actuar también a través de los dos mecanismos.

El objetivo principal de este capítulo es estudiar la fotooxidación de *dGMP* sensibilizada por pterinas de interés biológico, en particular *Bip*, *Fop* y *Cap*; y evaluar la contribución de los dos posibles mecanismos involucrados. En este capítulo se presentan resultados de experimentos en los cuales se irradiaron soluciones acuosas a pH = 5,0-5,5 con radiación UV-A (350 - 10 nm) conteniendo *dGMP* y cada uno de los sensibilizadores. Estas soluciones irradiadas se analizaron por *HPLC* para cuantificar el consumo de los reactivos. Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de *LFP* para estudiar la interacción de los estados excitados tripletes del sensibilizador con el sustrato y para identificar la formación de especies radicalarias. El análisis de los resultados se enfocará en la dilucidación de los mecanismos de reacción y evaluar la competencia entre mecanismos Tipo I y Tipo II.

10.1 BIOPTERINA COMO SENSIBILIZADOR DE *dGMP*

10.1.1 *Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de Bip*

Teniendo en cuenta los resultados presentados en el capítulo 9 y estudios realizados con otros derivados pterínicos [112, 119], se espera que *Bip* sea capaz de fotosensibilizar a *dGMP*. Para evaluar este punto, se irradiaron durante diferentes períodos de tiempo

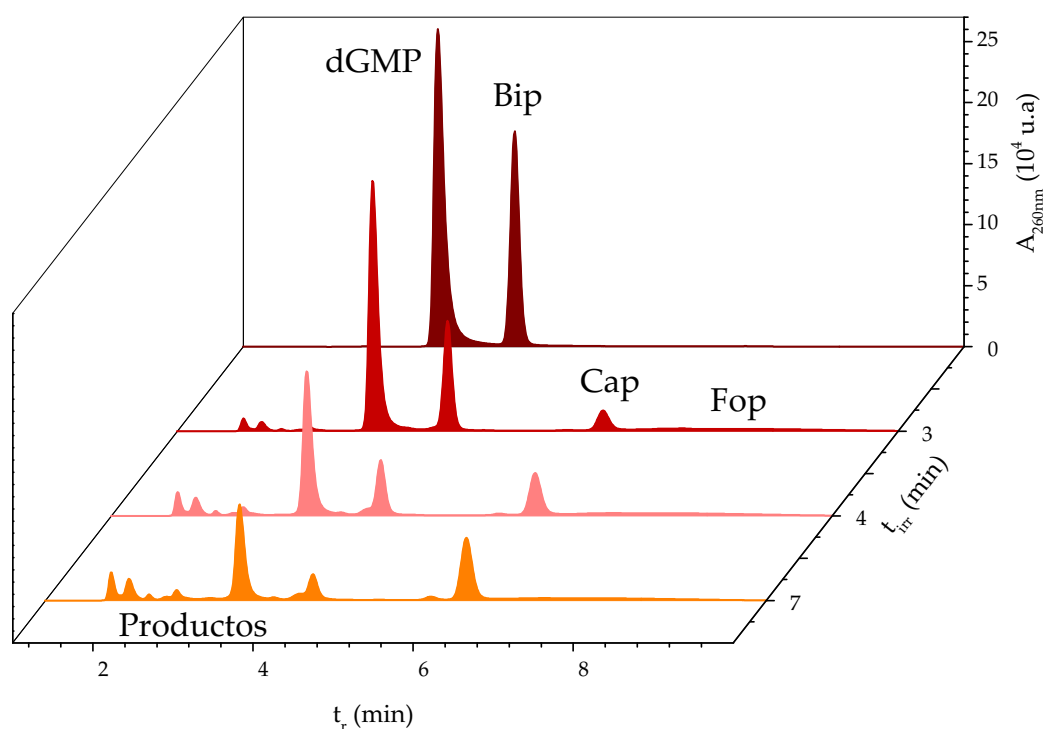


Figura 68: Cromatogramas a distintos tiempos de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con aire que contenían *dGMP* y *Bip*. $dGMP_0 = 134 \text{ M}$; $Bip_0 = 94 \text{ M}$; $pH = 5,5$; $\lambda_{\text{ir}} = 260 \text{ nm}$.

soluciones acuosas ácidas ($pH = 5,5$) estabilizadas en aire que contenían *Bip* (100 M) y *dGMP* (150 M). Al igual que en el estudio con el nucleótido de adenina, no se pudo seguir el proceso fotosensibilizado por espectro fotometría UV-visible, dado que el sensibilizador se consume durante el proceso y por lo tanto los cambios espectrales no pueden ser atribuidos exclusivamente a la reacción fotosensibilizada. Sin embargo, las soluciones irradiadas se pudieron analizar por HPLC para cuantificar el consumo de los reactivos e investigar la formación de productos.

En la Figura 68 se comparan los cromatogramas de las soluciones de *Bip* y *dGMP* para diferentes tiempos de irradiación. Los cromatogramas fueron registrados a diferentes longitudes de onda, pero en la Figura 68 se muestran los cromatogramas detectados a 260 nm , zona del espectro en la cual absorben los reactivos y productos que provienen de la fotoquímica de *Bip*. El pico con $t_r = 2,9$ minutos corresponde a *dGMP*, y *Bip* corresponde al pico con $t_r = 3,4$ minutos. En la Figura 68 se puede apreciar que el área de ambos picos disminuye con el tiempo de irradiación. A su vez, nuevos picos aparecen con t_r menores al de *dGMP*, lo cual estaría indicando la formación de productos más polares que *dGMP*. Estos picos no provienen de la fotoquímica del sensibilizador, dado que los productos que corresponde a este proceso se identificaron utilizando soluciones patrón de las sustancias puras, y corresponden a los picos de $t_r = 6,5$ minutos para *Fop* y $5,2$ minutos para *Cap*. De estos resultados surgen dos puntos importantes, en primer lugar se comprobó que *Bip* es capaz de fotosensibilizar a *dGMP*. En segundo lugar, la presencia del nucleótido

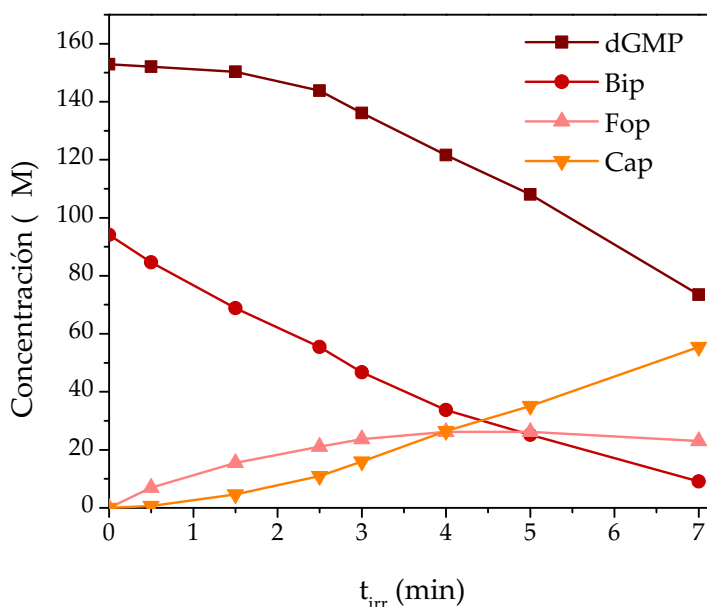


Figura 69: Evolución de la concentración de reactivos y productos en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP y Bip en función del tiempo de irradiación. $dGMP_0 = 153 \text{ M}$; $Bip_0 = 94 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

aparentemente no modifica de forma cualitativa la fotoquímica de Bip; la discusión sobre este comportamiento se retomará en la sección siguiente.

La Figura 69 muestra los cambios en las concentraciones de dGMP, Bip, Fop y Cap, en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosa de Bip y dGMP a pH 5,5 estabilizada en aire. En primer lugar, se observa consumo de dGMP en los minutos iniciales de la reacción, el cual experimenta una aceleración a medida que aumenta el tiempo de irradiación. El pequeño consumo inicial, pero no despreciable, se puede asignar al proceso fotosensibilizado iniciado por Bip, ya que para un período menor a 2 minutos la concentración de Bip disminuyó sólo un 35 % de su valor inicial para dar los productos de fotólisis. Por otro lado la aceleración estaría indicando que el o los productos de fotólisis serían sensibilizadores más eficientes que su precursor. Este comportamiento fue observado para la fotosensibilización de dAMP inducida por Bip.

Con el objeto de obtener mayor información sobre los productos generados durante la fotosensibilización de dGMP se registraron los espectros de absorción de los productos de fotosensibilización (Sección 6.2), los cuales coinciden con estudios publicados sobre fotooxidación directa de dGMP por radiación UV-B y con los espectros de los productos obtenidos para la reacción fotosensibilizada de dGMP inducida por Ptr estudiados previamente (Figura 70) [112, 154].

Para evaluar participación del O_2 en la reacción de fotosensibilización de dGMP por Bip en medio ácido, se realizó la fotólisis de la mezcla en una solución previamente burbujeada con argón. Con fines comparativos, se utilizaron las mismas condiciones de concentración y de irradiación para soluciones equilibradas con aire. En la Figura 71 se muestra el consumo de dGMP relativo a la concentración inicial, utilizando como sensibilizadores

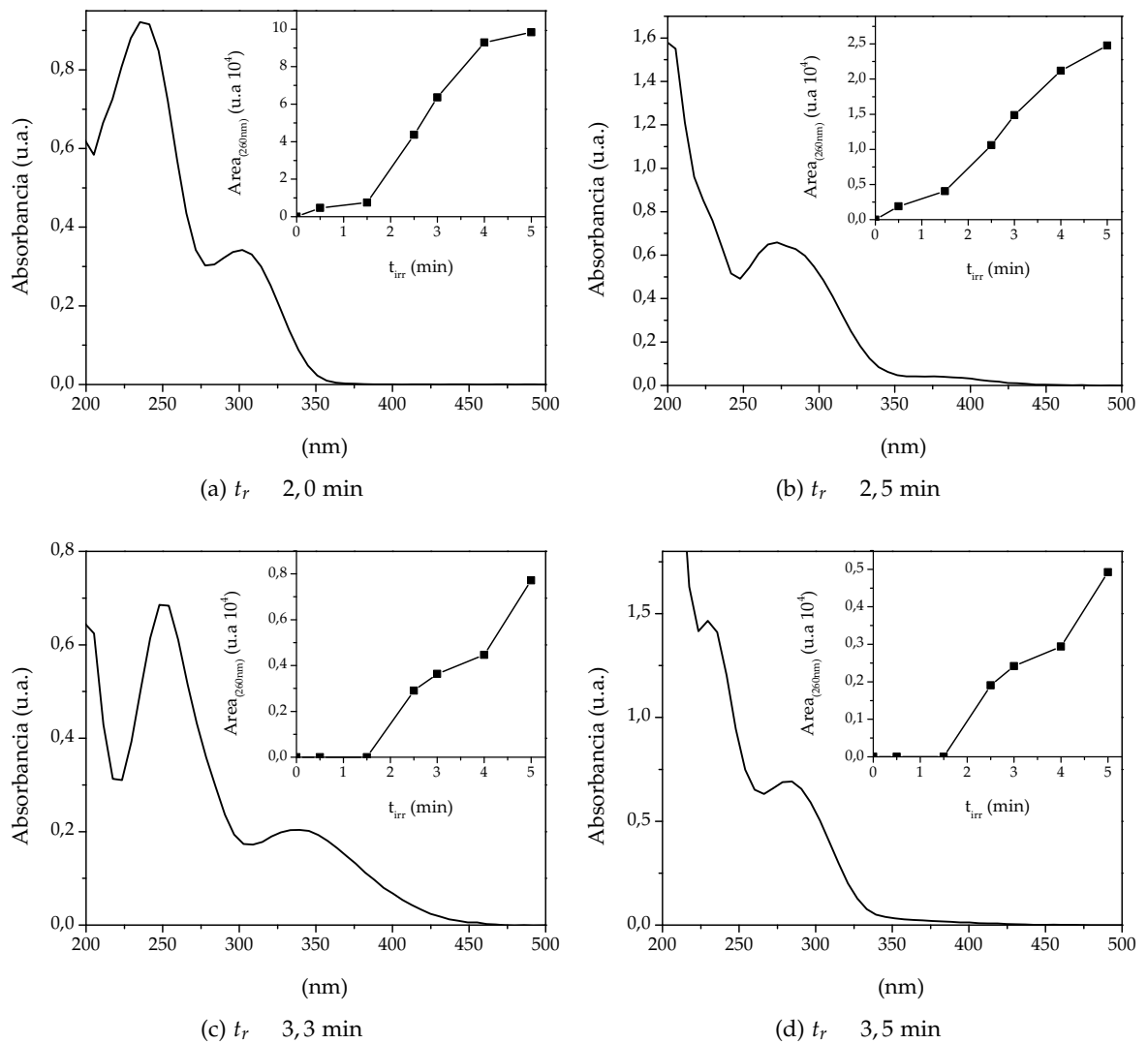
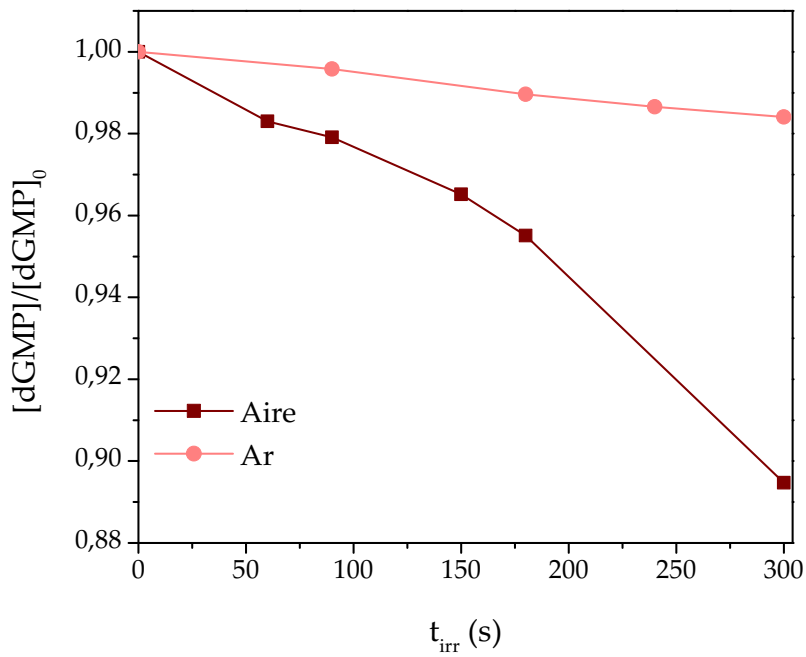
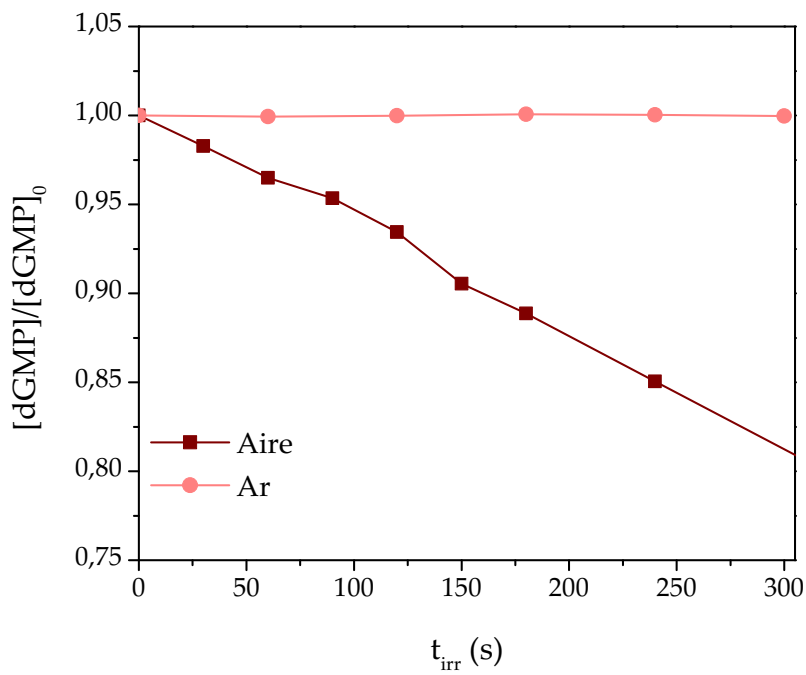


Figura 70: Espectros de absorción de los productos de fotosensibilización de *dGMP* inducida por *Bip*. Los espectros fueron obtenidos de los cromatogramas de una solución irradiada durante 5 min a los correspondientes t_r .



(a) Bip



(b) Fop

Figura 71: Cambios en la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial en soluciones acuosas saturadas en Ar y equilibradas con aire, utilizando como sensibilizador: Bip, $dGMP_0 = 260 M$, $Bip_0 = 151 M$; y Fop, $dGMP_0 = 260 M$, $Fop_0 = 85 M$.

Bip o Fop a pH 5,5 para diferentes concentraciones de O_2 en el medio. La inhibición del proceso fotosensibilizado es prácticamente completa en las soluciones saturadas con Ar para ambos sensibilizadores indicando que el O_2 es indispensable para que la reacción ocurra.

10.1.2 Controles

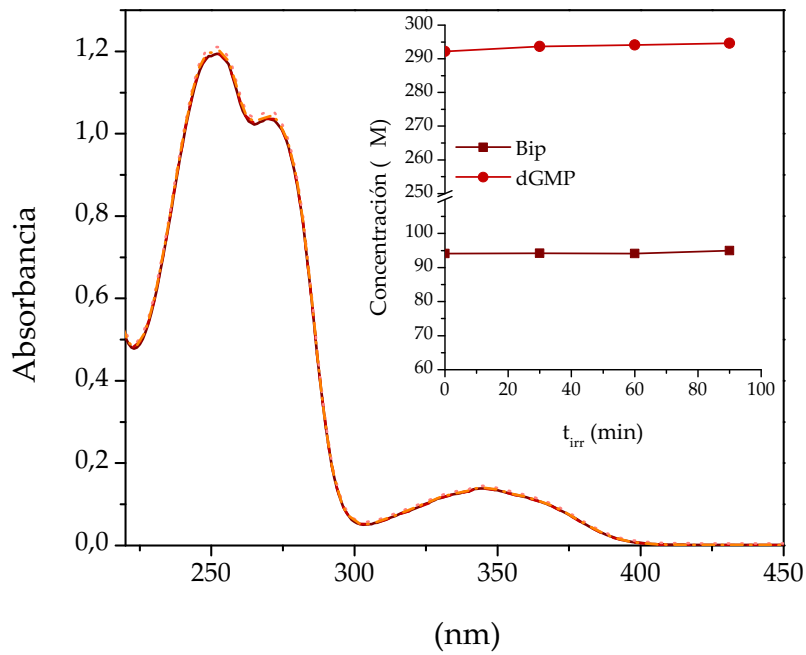
Se llevaron a cabo experimentos de control, similares a los descritos para el estudio de la fotosensibilización de dAMP (Capítulo 9), para descartar que el consumo de dGMP se deba a reacciones térmicas o fotólisis del nucleótido mismo. Se registraron espectros de absorción y se cuantificó por HPLC las concentraciones de los reactivos de soluciones acuosas conteniendo dGMP y el sensibilizador, Bip o Fop, conservada en la oscuridad. Después de una hora no se observaron cambios espectrales, ni en las concentraciones descartando la existencia de una reacción térmica entre dGMP y los sensibilizadores (Figura 72).

El segundo control consistió en irradiar soluciones acuosas de dGMP a 350 nm en ausencia del sensibilizador. A distintos tiempos de irradiación se tomaron los espectros de absorción y se analizaron las soluciones por HPLC. No se observaron cambios espectrales ni variaciones significativas en la concentración dentro del tiempo de irradiación (Figura 73), indicando que no se produjeron cambios químicos en la molécula de dGMP. Esto es lógico ya que el nucleótido no absorbe radiación a la longitud de onda de irradiación (Sección 2.2).

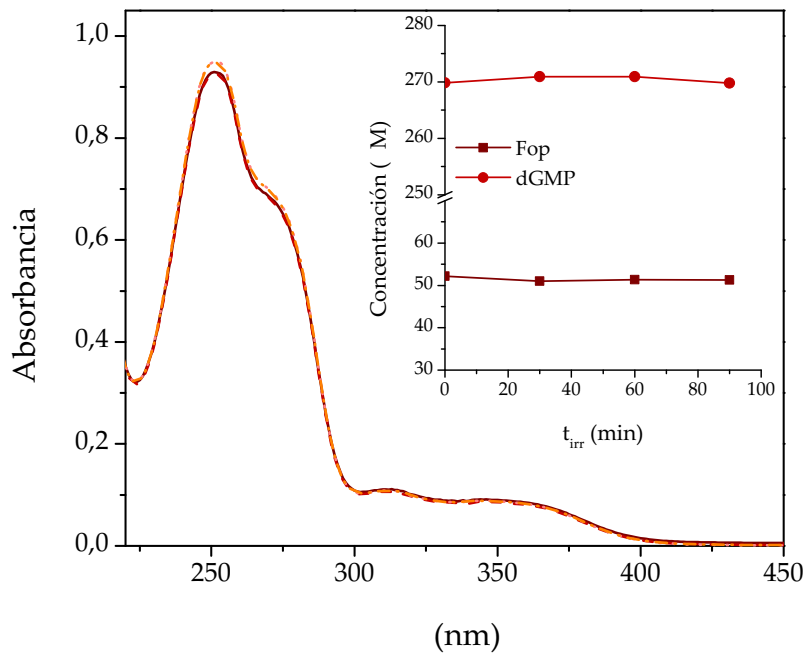
10.1.3 Eficiencia de Bip y sus fotoproductos como fotosensibilizadores

Se realizaron experimentos de fotosensibilización de dGMP utilizando como sensibilizadores a cada uno de los compuestos de la vía de fotooxidación de Bip por separado, incluyendo como control el sensibilizador modelo de esta familia, Ptr. Se irradiaron soluciones acuosas a pH 5,5 estabilizadas con aire compuestas por la misma concentración de dGMP (58 M) y cada uno de los sensibilizadores, en idénticas condiciones geométricas y densidad de flujo de fotones. La absorbancia de los sensibilizadores a 350 nm para cada una de las soluciones fue la misma ($A_{350nm} = 0,35$ con camino óptico 0,4 cm). De esta manera los fotones absorbidos por cada uno de los sensibilizadores fue idéntica y se pudo comparar el efecto de la capacidad fotosensibilizadora de cada uno de los compuestos directamente midiendo la velocidad inicial de consumo de dGMP ($-\frac{dGMP}{t}^{exp}_0$), (Figura 74).

A partir de estos datos se calcularon los rendimientos cuánticos de consumo de dGMP ($^Pt_{dGMP}$) para cada sensibilizador. Para ello se determinó q_p^V , realizando una actinometría para las condiciones de irradiación dadas (Sección 5.3 y 5.6). Se calcularon los valores de $^Pt_{dGMP}$ que se resumen en la Tabla 12 utilizando la Ecuación 110.



(a) Bip



(b) Fop

Figura 72: Espectros de absorción de soluciones que contenían de dGMP y un sensibilizador, Bip o Fop, mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min). Bip: $dGMP_0 = 293 \text{ M}$, $Bip_0 = 94 \text{ M}$; Fop, $dGMP_0 = 270 \text{ M}$, $Fop_0 = 51 \text{ M}$. Inset: Concentración de dGMP y el sensibilizador en función del tiempo determinadas por HPLC. Camino óptico = 0,4 cm; ; pH= 5,5.

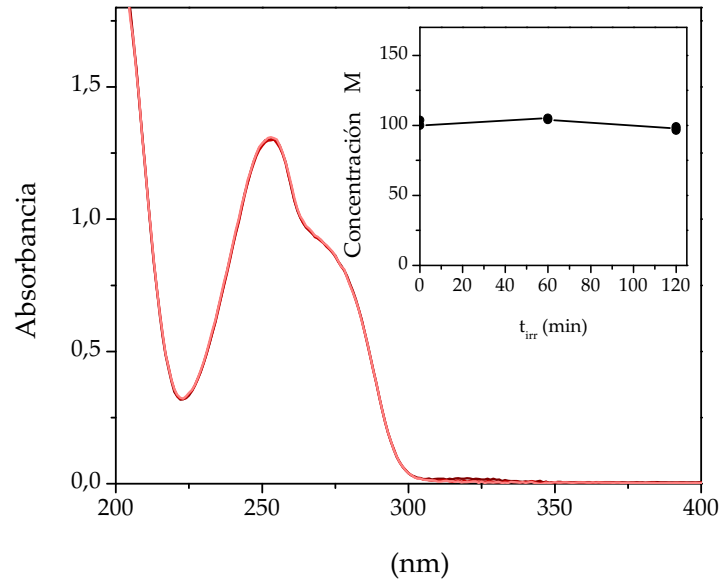


Figura 73: Espectros de absorción de soluciones de *dGMP* expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min). Inset: concentración de *dGMP* en función del tiempo de irradiación determinada por HPLC. $dGMP_0 = 100 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; camino óptico = 1 cm.

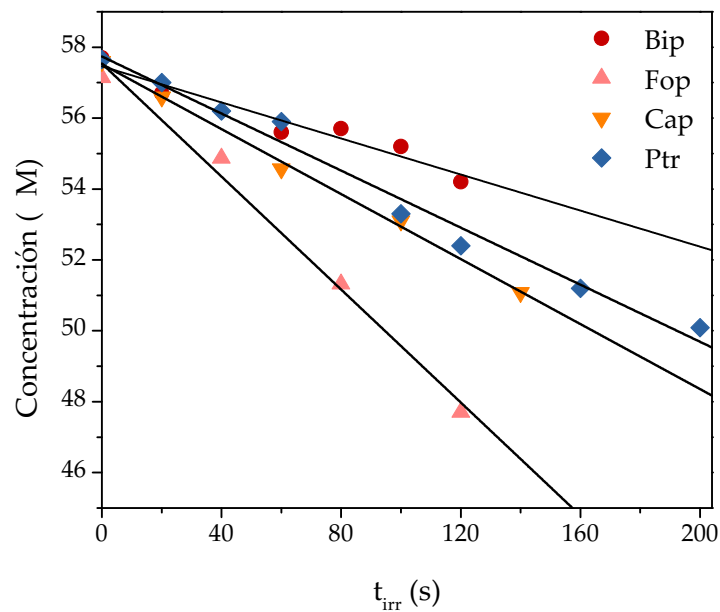


Figura 74: Evolución de la concentración de *dGMP* en función del tiempo de irradiación para soluciones equilibradas con aire a $\text{pH} 5,5$. Fotodegradación mediada por diferentes derivados pterínicos. $Abs_{350 \text{ nm}} = 0,35$; $Bip_0 = 138 \text{ M}$; $Fop_0 = 81 \text{ M}$; $Cap_0 = 121 \text{ M}$; $Ptr_0 = 159 \text{ M}$; $dGMP_0 = 56 \text{ M}$; camino óptico = 0,4 cm.

	Bip	Ptr	Cap	Fop
$Pt_{dGMP}^{10^2}$	0,46	0,02	0,79	0,03
$Pt_{dGMP}^{(pD=5,5)}$	0,34	0,01	0,18	0,02

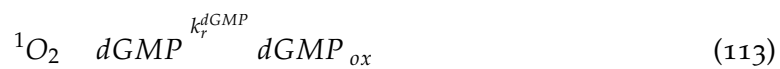
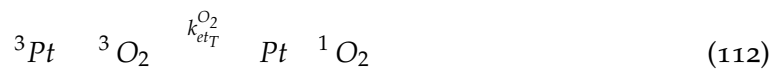
Tabla 12: Rendimiento cuántico de consumo de dGMP (Pt_{dGMP}) a pH= 5,5 y rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Pt) a pD= 5,5; para diferentes derivados pterínicos.

$$Pt_{dGMP} = \frac{\frac{dGMP}{t}^{exp}}{q_p^V} \quad (110)$$

En esta tabla se comparan los valores obtenidos para Pt_{dGMP} con los datos de rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Pt) para cada sensibilizador (Sección 4.1). Claramente Fop es el sensibilizador más eficiente de la serie de compuestos, con un $Fop_{dGMP}^{1,5 \cdot 10^2}$, este valor es el doble que para Cap y Ptr, y tres veces más en comparación con Bip. Por lo tanto, se puede asegurar que la aceleración en la velocidad de consumo de dGMP que se observa en el experimento de la Figura 69 se debe a la formación de Fop que posee mayor capacidad fotosensibilizadora con respecto a Bip. Esta diferencia entre los distintos compuestos en la eficiencia como sensibilizadores frente a dGMP no podría explicarse a partir de los (tabla 12), ya que no hay una tendencia entre estos valores que justifiquen la diferencia en la eficiencia de fotosensibilización de dGMP.

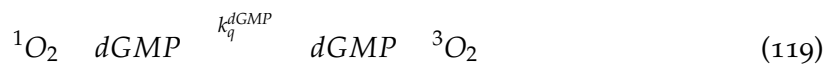
10.2 ROL DEL 1O_2

La contribución de la reacción con 1O_2 a la oxidación de dGMP fotosensibilizada por Bip se estimó considerando el valor reportado en bibliografía de la constante de reacción química ($k_r^{dGMP} = 1,7 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$) entre 1O_2 y dGMP. Suponiendo que el consumo de dGMP observado en los experimentos de irradiación continua se debe exclusivamente a la reacción con el 1O_2 , se puede plantear la ley de velocidad para la reacción 113, y calcular la velocidad de consumo de dGMP por 1O_2 con la Ecuación 114,



$$\frac{dGMP}{t}^{calc} = k_r^{dGMP} {}^1O_2_{ss} \quad (114)$$

donde ${}^1O_2_{ss}$ es la concentración de 1O_2 en estado estacionario durante la irradiación de las soluciones conteniendo un determinado fotosensibilizador pterínico (Pt). Teniendo en cuenta las vías de formación (reacciones 111 y 112) y desactivación del 1O_2 (reacciones 113 a 119),



se puede calcular su valor utilizando con la Ecuación 120, (Subsección 7.1.4),

$${}^1O_2_{ss} = \frac{q_{p, Pt}^V}{k_d + k_p + k_t^{Pt} Pt + k_t^{dGMP} dGMP} \quad (120)$$

donde $k_d = 2,6 \cdot 10^5 s^{-1}$ es la constante de velocidad para la desactivación no radiativa unimolecular de 1O_2 y refleja el efecto del solvente, que en este caso es H_2O ; k_p es la constante de velocidad para la desactivación radiativa unimolecular de 1O_2 , en la mayoría de los solventes $k_p \approx k_d$; k_t^{Pt} y k_t^{dGMP} son las constantes de velocidad de desactivación total de 1O_2 por Pt y dGMP, respectivamente. Considerando los valores previamente reportados para $k_t^{Pt} \approx k_q^{Pt} = 1 \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$ (Sección 3.4), la desactivación de 1O_2 por Pt bajo las condiciones de trabajo es despreciable (es decir $k_t^{Pt} Pt \ll k_d$). Por otro lado, existen trabajos donde se reportó que la desactivación de 1O_2 por dGMP en D_2O a pD 5,5 es exclusivamente química; es decir que $k_t^{dGMP} \approx k_r^{dGMP} = 1,7 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$. Por lo tanto, combinando las Ecuaciones 114 y 120 se puede calcular la velocidad inicial de consumo de dGMP ($\frac{dGMP}{dt}_{0, calc}$) para la reacción entre 1O_2 y dGMP para una dada concentración inicial de nucleótido ($dGMP_0$). Se calculó $\frac{dGMP}{dt}_{0, calc}$ para cada sensibilizador utilizado en el experimento de la Figura 74 y se comparó con la velocidad inicial de consumo experimental, medida a partir de la regresión lineal de los datos obtenidos a partir del análisis por HPLC ($\frac{dGMP}{dt}_{0, exp}$). En la Tabla 13 se comparan los valores obtenidos. En todos los casos, para un dado sensibilizador estudiado la velocidad de consumo experimental es al menos un orden de magnitud mayor a la velocidad de consumo calculada mediante la ecuación 114. Esta comparación sugiere que, a pesar que todos los sensibilizadores generan eficientemente 1O_2 , y que el sustrato reacciona con esta especie, dicha reacción sin ser despreciable no aporta de manera significativa al consumo total del nucleótido en las condiciones experimentales descriptas.

COMPUESTO	$\frac{d\text{GMP}}{t}_0$ calc		$\frac{d\text{GMP}}{t}_0$ exp	
	10^8M s^{-1}			
Ptr	0,38	0,05	4,0	0,2
Bip	0,69	0,07	2,5	0,3
Cap	0,83	0,08	8,0	0,6
Fop	0,55	0,06	4,6	0,2

Tabla 13: Velocidades iniciales de consumo de dGMP experimentales ($\frac{d\text{GMP}}{t}_0$ exp) y calculadas ($\frac{d\text{GMP}}{t}_0$ calc), considerando la reacción entre $^1\text{O}_2$ y dGMP.

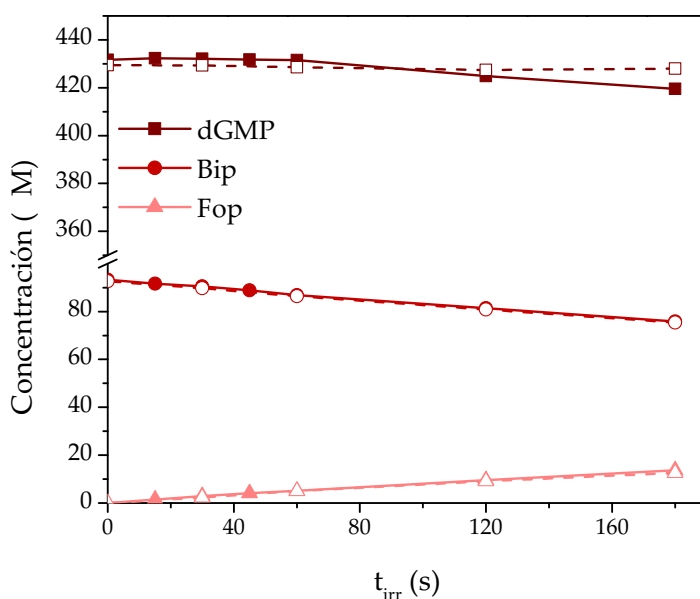


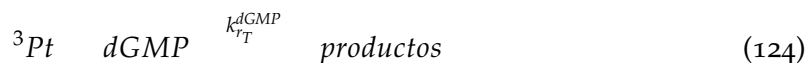
Figura 75: Evolución de la concentración de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación para soluciones de Bip y dGMP equilibradas con aire preparadas en H_2O (símbolos vacíos) $\text{pH} = 5,5$ y D_2O (símbolos llenos) $\text{pD} = 5,5$. $\text{Bip}_0 = 93 \text{ M}$; $\text{dGMP}_0 = 430 \text{ M}$.

Para corroborar esta hipótesis, se realizaron fotólisis comparativas de mezclas conteniendo Bip y dGMP en H_2O y D_2O (Subsección 5.4.3). Se analizó la evolución de las concentraciones de dGMP, Bip y Fop en función del tiempo de irradiación (Figura 75). Dado que el k_d en D_2O es mayor que en H_2O (es decir $k_d^{\text{H}_2\text{O}} < k_d^{\text{D}_2\text{O}}$) [130], la oxidación fotosensibilizada de dGMP por Bip en idénticas condiciones debería ser aproximadamente un orden de magnitud más rápida en el solvente deuterado si el $^1\text{O}_2$ contribuyera significativamente al proceso. No se observó un aumento en la $\frac{d\text{GMP}}{t}_0$ exp al cambiar el solvente de H_2O a D_2O . Estos resultados confirman que la reacción química entre dGMP y el $^1\text{O}_2$, a pesar de no ser despreciable, no parece ser la vía principal responsable de la oxidación fotosensibilizada de dGMP por Bip.

10.3 PARTICIPACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES

Considerando que Fop es el primer producto que proviene de la fotoquímica de Bip y teniendo en cuenta que es el fotosensibilizador más eficiente de la serie estudiada, el análisis y los experimentos que se presentarán en las próximas secciones tendrán como sensibilizadores iniciales a Bip o Fop. El conjunto de experimentos cuyos resultados se presentan en esta Sección son similares a los descriptos para los estudios llevados a cabo con dAMP.

Durante la irradiación y en presencia de dGMP, el sensibilizador, al cual llamaremos Pt en forma general, absorbe un fotón para generar el sensibilizador en el estado S_1 , que luego por ISC pasa al estado T_1 (reacción 111). Desde este estado se van a producir una serie de reacciones competitivas, la transferencia de energía al O_2 (reacción 112), la desactivación con el solvente (reacción 121), la reacción química para dar el IR que en presencia de O_2 genera productos oxidados (reacción 122) y la desactivación física (reacción 123) y química (reacción 124) por dGMP.

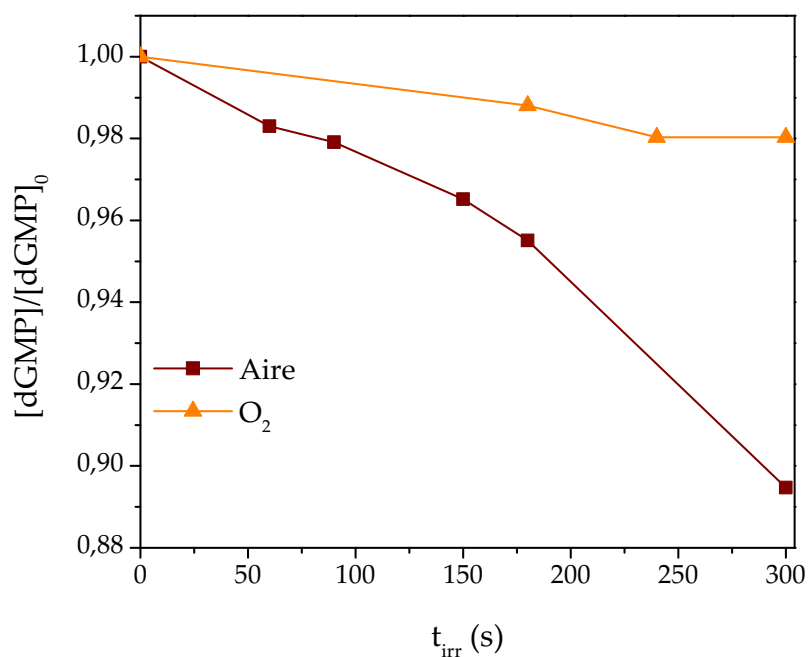


La presente sección se centrará en evaluar la competencia entre las diferentes vías que compiten por la reacción con 3Pt del sensibilizador.

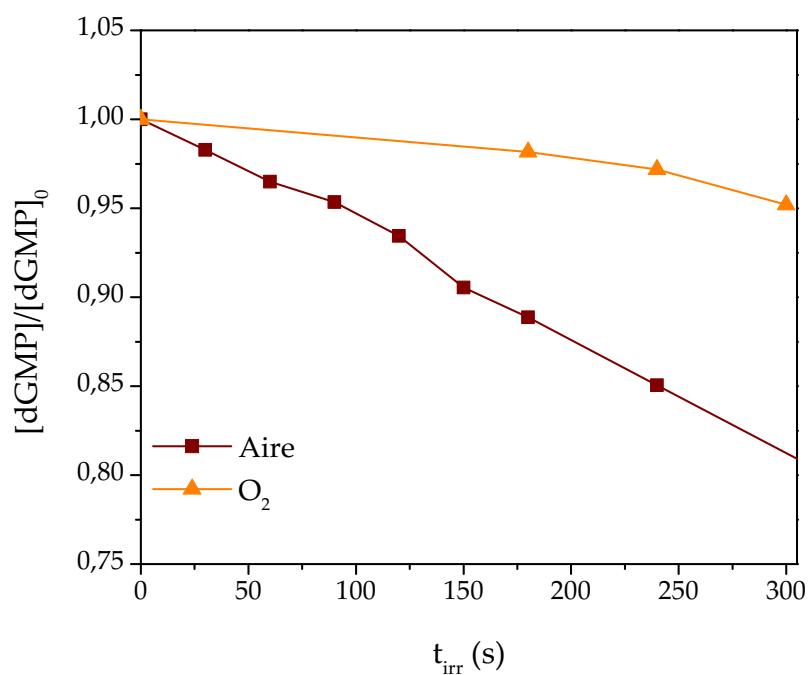
10.3.1 Rol del O_2

En la Figura 76 se muestra el consumo de dGMP relativo a la concentración inicial, utilizando como sensibilizadores Bip o Fop a pH 5,5 para diferentes concentraciones de O_2 . Los perfiles de concentración de dGMP para ambos sensibilizadores utilizados, muestran claramente una disminución en la velocidad de consumo en las soluciones saturadas en O_2 en comparación con las soluciones equilibradas con aire.

Haciendo un análisis análogo al descripto en la subsección 9.2.1, se arriba a una conclusión similar, es decir, el mecanismo del proceso fotosensibilizado de dGMP por Bip y Fop debería involucrar una interacción entre los 3Pt y el nucleótido. Por otro lado, de este comportamiento se puede deducir que, si el 1O_2 tuviera un rol principal en el mecanismo de reacción, la velocidad de consumo de dGMP en soluciones saturadas en O_2 debería ser mayor o igual en comparación a las soluciones equilibradas con aire, lo cual afirma la hipótesis planteada en la Sección 10.2.



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 76: Evolución de la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con O_2 y equilibradas con aire, utilizando como sensibilizadores: Bip, $dGMP_0 = 260 \text{ M}$, $Bip_0 = 151 \text{ M}$; y Fop, $dGMP_0 = 260 \text{ M}$, $Fop_0 = 85 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

10.3.2 Irradiación en presencia de yoduro de potasio

Tal como se mencionó anteriormente, el anión yoduro (I^-) en cierto rango de concentraciones desactiva selectiva y eficientemente los estados excitados tripletes de las pterinas (Sección 5.2). Con el objetivo evaluar la participación de los estados excitados tripletes del sensibilizador en la fotosensibilización de dGMP, se realizaron experimentos comparativos en donde se cuantificó el consumo del nucleótido para soluciones acuosas ácidas (pH 5,5) equilibradas con aire, en presencia y ausencia de KI, utilizando como sensibilizadores Bip o Fop, similares a los descritos para la fotosensibilización de dAMP (Subsección 9.2.2). La Figura 77 muestra el efecto de la presencia de KI (300 μ M) en la velocidad de consumo de dGMP en soluciones acuosas equilibradas en aire utilizando como sensibilizadores Bip y Fop. Para ambos casos el consumo del nucleótido se ve claramente inhibido por la presencia de KI. Este resultado es compatible con el efecto observado sobre el consumo de dGMP en soluciones saturadas en O_2 , y confirma la participación del estado excitado triplete del sensibilizador en la fotosensibilización de dGMP.

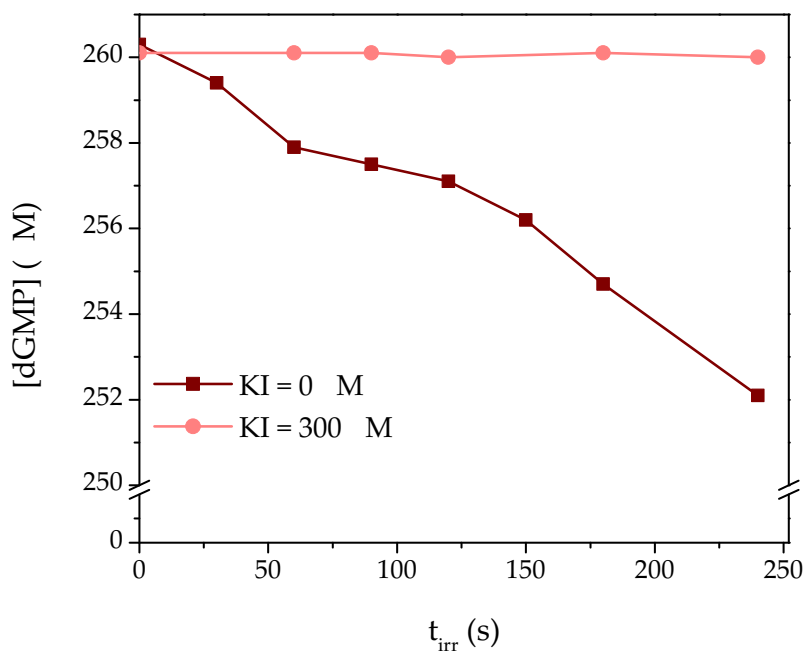
10.3.3 Efecto de la presencia de dGMP en la fotoquímica de Bip

10.3.3.1 Irradiación en presencia de aire

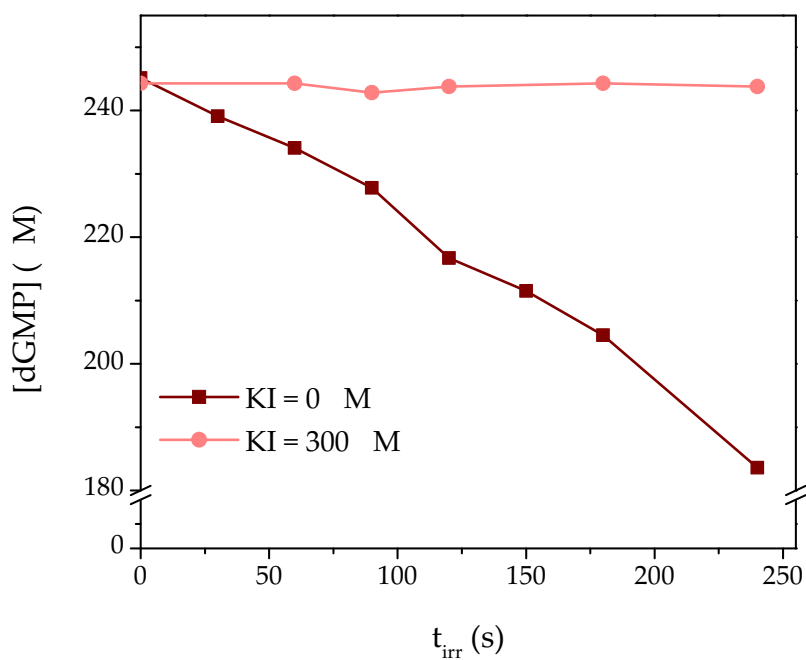
En la Figura 78 se muestran los perfiles de concentración para el consumo de Bip y la formación de sus fotoproductos en soluciones ácidas equilibradas con aire irradiada en ausencia y en presencia de 880 μ M de dGMP. Se observa una inhibición tanto en el consumo de Bip como en la formación de sus productos. Considerando que la fotooxidación de Bip se inicia a partir de los estados excitados tripletes, este resultado indica la interacción de esta especie excitada con dGMP. En la Figura 79 se muestra el efecto sobre la velocidad de consumo de Bip para diferentes concentraciones de dGMP. La disminución en la velocidad de consumo de Bip que se observa con el aumento de la concentración de dGMP está relacionado con la competencia del nucleótido por la desactivación del estado excitado triplete del sensibilizador.

10.3.3.2 Irradiación en ausencia de O_2

Al igual que en el estudio con el nucleótido de dAMP (Subsección 9.2.3.2) se determinó la formación del IR en presencia de dGMP para evaluar la interacción del nucleótido con el estado excitado triplete de Bip en ausencia de O_2 , registrando el aumento de la absorbancia a 480 nm para distintos tiempos de irradiación. Para ello se realizaron experimentos en donde soluciones acuosas saturadas con Ar a pH 5,5 que contenían Bip fueron irradiadas durante 10 minutos en intervalos de 20 segundos en ausencia y en presencia de 300 μ M de dGMP. La Figura 80 muestra los cambios espectrales para las diferentes soluciones irradiadas en ausencia de O_2 . En los insets se muestra el aumento de la absorbancia entre 400 y 700 nm que corresponde a la formación del IR. Al igual que con dAMP,



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 77: Evolución de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con y sin agregado de 300 M de KI, utilizando como sensibilizador: Bip, $dGMP_0 = 260$ M, $Bip_0 = 150$ M; Fop, $dGMP_0 = 245$ M, $Fop_0 = 87$ M; pH= 5,5.

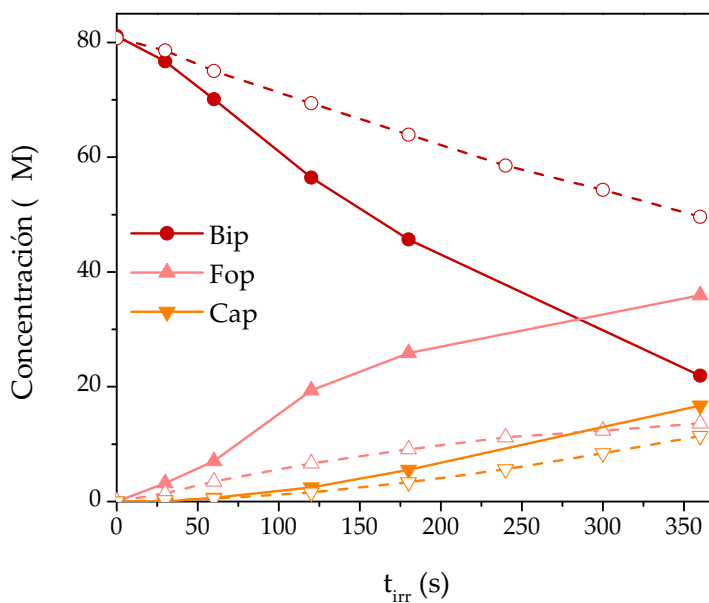


Figura 78: Evolución de la concentración de reactivos y productos en soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip sin (línea cortada) y con agregado de 800 μ M de dGMP (línea continua) a pH 5,5. $Bip_0 = 80 \mu$ M.

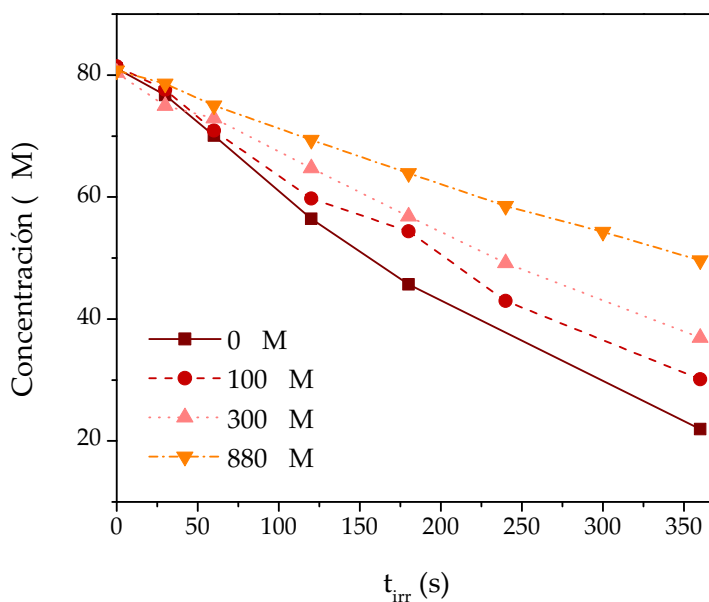
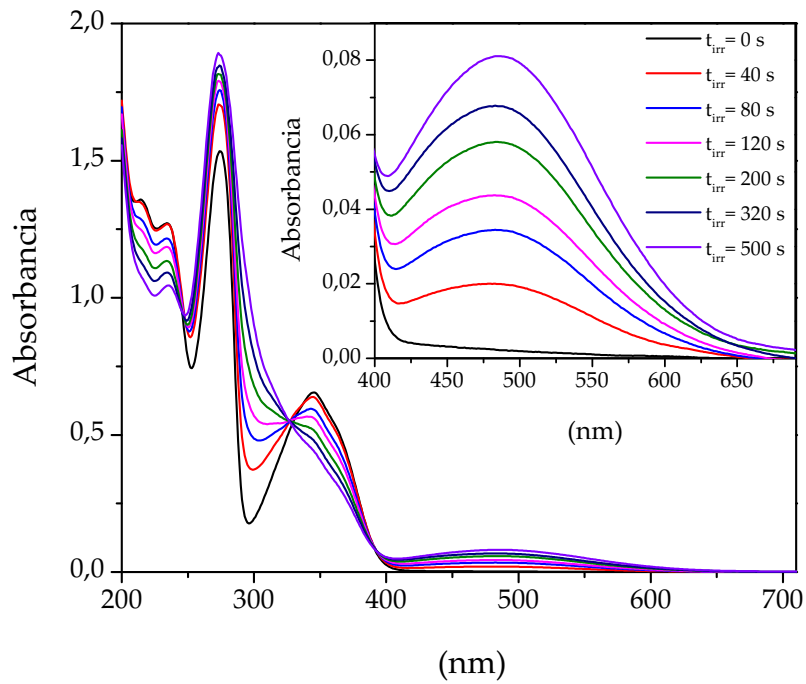
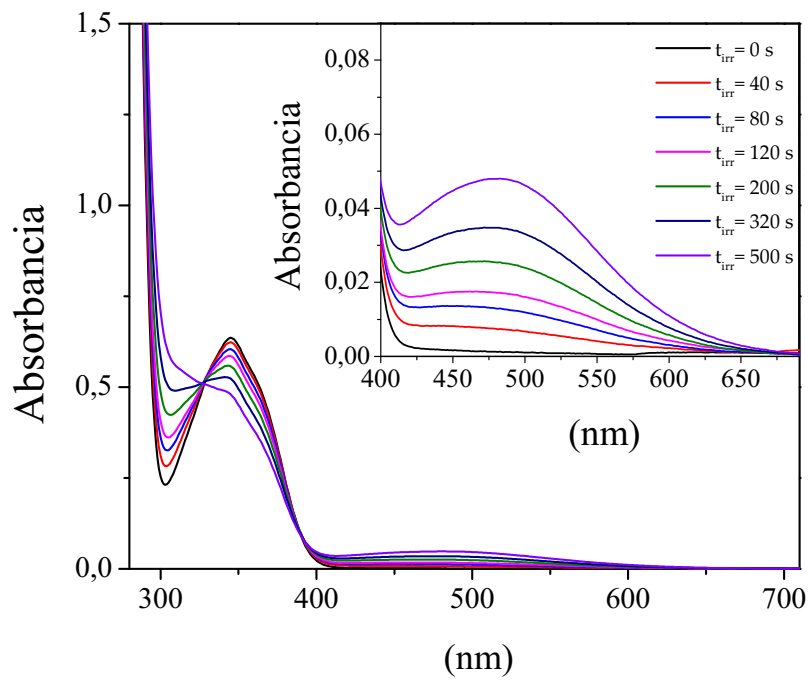


Figura 79: Evolución de la concentración de Bip a diferentes tiempos de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de Bip en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de dGMP.



(a) Sin agregado de dGMP.



(b) Con agregado de 300 M dGMP.

Figura 80: Espectros de absorción a diferentes tiempos de irradiación de soluciones saturadas en Ar de Bip con y sin agregado de dGMP. *Inset*: cambio de la absorbancia entre 400 y 700 nm. Bip = 100 M; dGMP = 300 M; camino óptico = 1 cm.

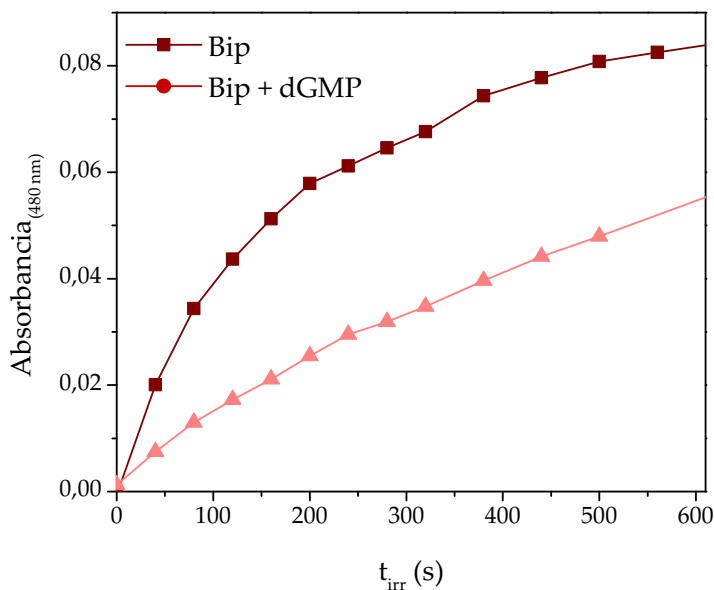


Figura 81: Evolución de la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación de soluciones saturadas con Ar a pH 5,5 de Bip con y sin agregado de dGMP. Bip =100 M; dGMP =300 M; camino óptico = 1 cm.

en presencia del nucleótido, la formación del IR es menor. En la [Figura 81](#) se compara el aumento de la absorbancia a 480 nm en función del tiempo de irradiación para ambas soluciones, allí se puede observar que la formación del IR es marcadamente menor cuando en el medio de reacción está presente dGMP. Este comportamiento se puede adjudicar nuevamente a la competencia de los 3Bip por dGMP en ausencia de O_2 , representada por las reacciones [122](#), [123](#) y [124](#).

10.3.4 Desactivación de los estados excitados tripletes

En esta sección se analizará la interacción de los estados excitados tripletes de los sensibilizadores (en general 3Pt , 3Bip , 3Fop , o 3Cap) con el nucleótido de guanina utilizando la técnica de LFP. Se determinaron las constantes de desactivación total de 3Pt por dGMP ($k_{t_T}^{dGMP}$). Para esto, se registraron las señales de decaimiento de los tripletes a 420 nm (Capítulo 8), en soluciones saturadas en Ar que contenía un determinado sensibilizador y concentraciones crecientes del nucleótido. Una vez obtenidos los valores de τ_T a partir del ajuste biexponencial de las señales (ecuación 80), se realizó un análisis de Stern-Volmer utilizando la Ecuación [125](#)

$$\frac{0}{\tau_T} = 1 + \frac{0}{\tau_T} k_{t_T}^{dGMP} [dGMP] \quad (125)$$

En todos los casos se obtuvieron gráficas lineales para ambos tripletes ([Figura 82](#)) y de la pendiente se calcularon los valores de $k_{t_T}^{dGMP}$ correspondientes para cada compuesto estudiado. En particular, la desactivación del estado excitado triplete de Pt por dGMP se estudiará en el capítulo 11. En la [Tabla 14](#) se resumen los valores de $k_{t_T}^{dGMP}$ obtenidos a

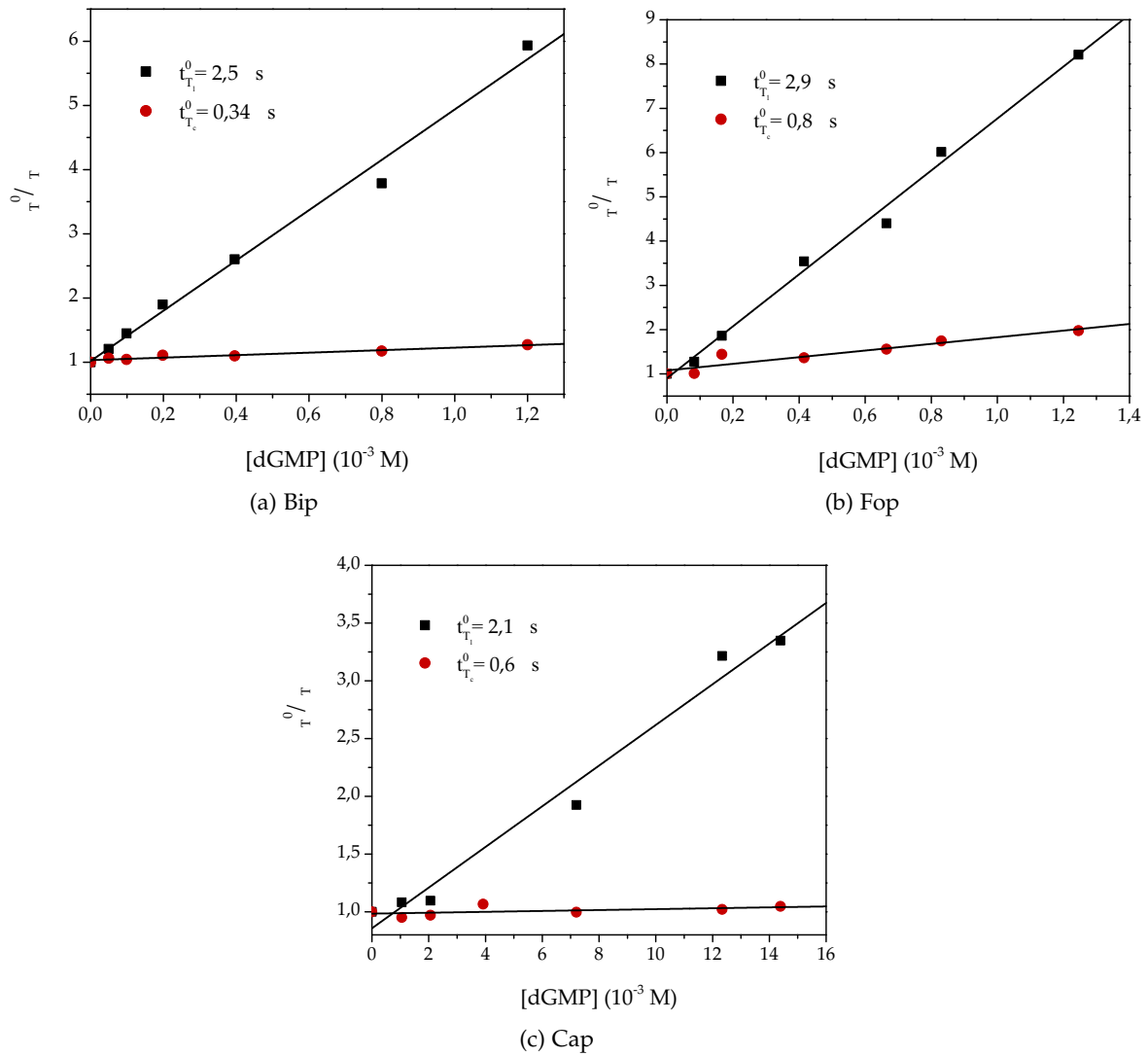


Figura 82: Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes por dGMP. T_c y T_l calculados a partir de los decaimientos registrados en soluciones acuosas saturadas con Ar a pH 5,5 de las pterinas oxidadas estudiadas y concentraciones crecientes de dGMP. exc 355 nm, ana 430 nm, Abs_{355nm} 0,5. Bip 80 M, Fop 55 M y Cap 68 M.

COMPUESTO	$k_{t_T}^{dGMP} 10^9 M^{-1} s^{-1}$			
	T_c		T_l	
Bip	0,6	0,1	1,6	0,3
Fop	0,9	0,2	2,0	0,3
Cap		0,05	0,10	0,05

Tabla 14: Constantes de desactivación de 3Pt por dGMP a pH 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c .

SOLUCIONES	Bip		Fop	
	T_l	T_c	T_l	T_c
$f_{q_{aire}}^{dGMP}$	0,49	0,048	0,36	0,08
$f_{q_{O_2}}^{dGMP}$	0,23	0,041	0,18	0,06

Tabla 15: Fracción de 3Pt desactivado por dGMP en presencia de O_2 (f_q^{dGMP}) a pH 5,5 calculadas para las especies T_l y T_c , utilizando Bip o Fop como sensibilizadores.

pH 5,5 para cada compuesto correspondiente a las dos especies excitadas triplete, T_c y T_l . Los valores resultaron similares, dentro del error experimental, para Bip y Fop, y su vez son del orden a los valores de k_{tT}^{dAMP} determinados en el capítulo 9. En el caso particular de Cap no se pudo calcular el valor de la constante para la especie T_c , mientras que para T_l resultó un orden de magnitud más baja en comparación a los otros dos compuestos.

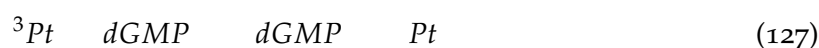
A partir de los valores de k_{tT}^{dGMP} y $k_{qT}^{O_2}$ (Capítulo 8 Tabla 8) es posible evaluar la competencia entre el O_2 y dGMP por la desactivación de 3Pt y, de esta manera, se analizó el efecto del O_2 en la velocidad de la degradación fotosensibilizada de dGMP observada en los experimentos de irradiación continua (Figura 71). La fracción de 3Pt desactivado por dGMP en presencia de O_2 (f_q^{dGMP}) se puede calcular con la Ecuación 126

$$f_q^{dGMP} = \frac{k_{tT}^{dGMP} dGMP}{k_d + k_{qT}^{O_2} O_2 + k_{tT}^{dGMP} dGMP} \quad (126)$$

Para las condiciones de concentración de dGMP utilizadas en los experimentos de la Figura 71, se calcularon los valores de f_q^{dGMP} (Tabla 15) para dos concentraciones de O_2 : soluciones equilibradas con aire $f_{q_{aire}}^{dGMP}$ y soluciones saturadas con O_2 $f_{q_{O_2}}^{dGMP}$. Comparando los valores obtenidos se desprende que, un incremento en la concentración de O_2 reduce significativamente la eficiencia de la desactivación de los 3Pt de ambos sensibilizadores. Esto explica la disminución de la velocidad de consumo del nucleótido observada en los experimentos de irradiación estacionaria en soluciones saturadas en O_2 con respecto a las soluciones equilibradas con aire.

10.4 FOTSENSIBILIZACIÓN POR TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

Habiendo demostrado que un mecanismo Tipo II sin ser despreciable no resulta la vía mayoritaria de consumo del sustrato, el proceso fotosensibilizado entre Bip y dGMP estaría llevándose a cabo por un mecanismo Tipo I. Es decir que, por una transferencia electrónica desde dGMP hacia el sensibilizador en un estado electrónicamente excitado, se formarían los correspondientes pares radicales, el radical anión del sensibilizador (Pt^-) y el radical catión de dGMP ($dGMP^+$), reacción 127.



Se realizó el cálculo del ${}_{ET}G^0$ para dicho proceso, similar al realizado en la subsección 9.3.2 para dAMP. El valor de ${}_{ET}G^0 = 113,9 \text{ KJ mol}^{-1}$ resultó más negativo que el correspondiente a dAMP, lo cual es esperable debido a que dGMP tiene el menor potencial de oxidación de la serie de nucleótidos ($E_{dGMP/dGMP} = 1,21 \text{ V vs. NHE}$) [150]. En conclusión, la reacción 127 resulta termodinámicamente favorable.

10.4.1 Irradiación en presencia de superóxido dismutasa

En esta sección se analizará la participación del anión O_2^- en la reacción fotosensibilizada de dGMP por Bip y Fop. La Figura 83 muestra la velocidad de consumo de dGMP en soluciones irradiadas estabilizadas en aire conteniendo el nucleótido y usando como sensibilizadores Bip o Fop a pH 5,5 en presencia de 50 U ml^{-1} de SOD. Como control se utilizaron soluciones idénticas pero sin el agregado de SOD. Para ambos sensibilizadores utilizados, la velocidad de consumo aumenta considerablemente en presencia de SOD con respecto al control.

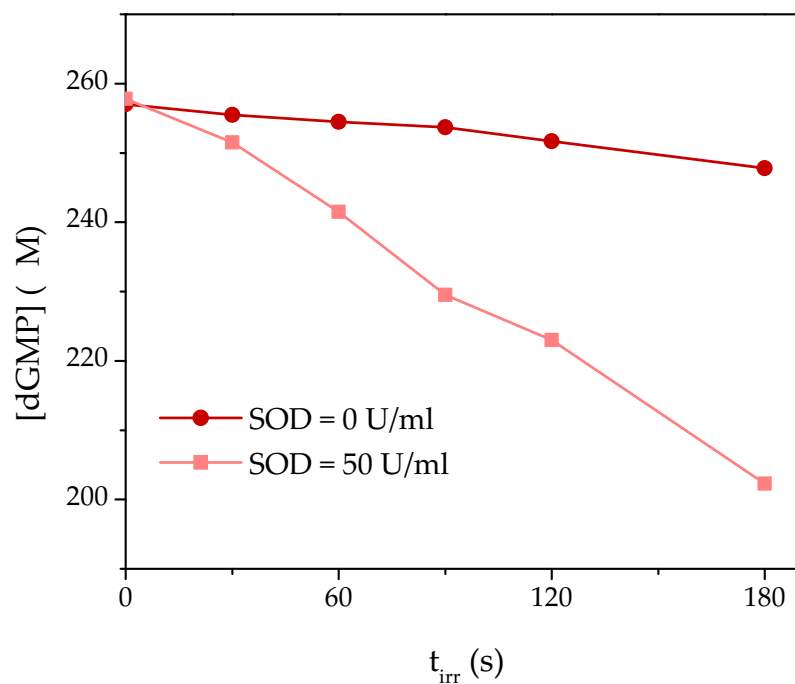
En primer lugar, con este resultado se puede asegurar la participación del O_2^- en el proceso, debido a que se observa un cambio en la velocidad de consumo de dGMP al agregar SOD. Se puede plantear la transferencia electrónica entre el estado excitado triplete del sensibilizador y el nucleótido en el estado fundamental con la consecuente formación de los pares radicales, (reacción 127). A su vez el radical Pt^* reacciona con el O_2 , para dar O_2^- .

Por otro lado, para explicar el aumento de la velocidad de consumo de dGMP en presencia de SOD se debe considerar las posibles reacciones del radical $dGMP^*$. Se conoce que este radical reacciona con O_2 para dar como producto la molécula del nucleótido oxidada. Pero esto no explicaría el aumento de consumo, por que si este fuera el caso, la presencia de SOD eliminaría una vía de consumo de dGMP. La única reacción posible que explicaría este comportamiento es la recombinación de los radicales para dar nuevamente el sustrato en el estado fundamental y O_2 , reacción 128.

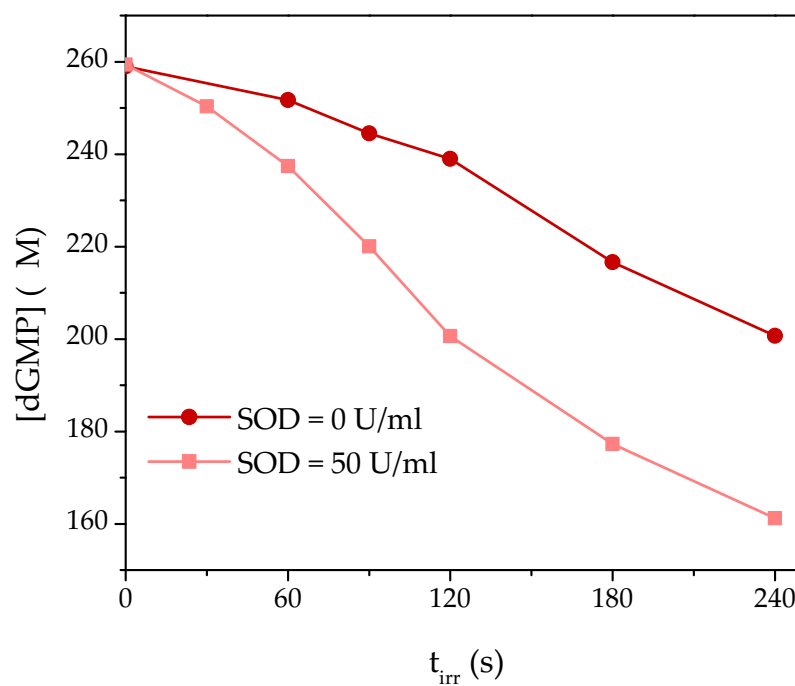


10.4.2 Investigación del radical guanina

La formación del radical de nucleótidos y nucleósidos de guanina como así también de la base nitrogenada (G^*) ha sido ampliamente estudiado mediante las técnicas de radiolisis de pulso y LFP excitando con un laser a 193 nm. Luego de la excitación del laser el radical formado es un ácido relativamente fuerte, por lo tanto a $\text{pH} > 5$ se desprotona para dar el radical neutro (reacción 129). En consecuencia, en las condiciones experimentales utilizadas, si existiera oxidación de dGMP a $dGMP^*$, debería detectarse el radical neutro $dGMP^* + H^+ \rightarrow$.



(a) Sensibilizador: Bip



(b) Sensibilizador: Fop

Figura 83: Evolución de la concentración de *dGMP* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con y sin agregado de 50 U ml^{-1} de SOD, utilizando como sensibilizador: Bip, $d\text{GMP}_0 = 260 \text{ M}$, $\text{Bip}_0 = 150 \text{ M}$; o Fop, $d\text{GMP}_0 = 243 \text{ M}$, $\text{Fop}_0 = 87 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$.

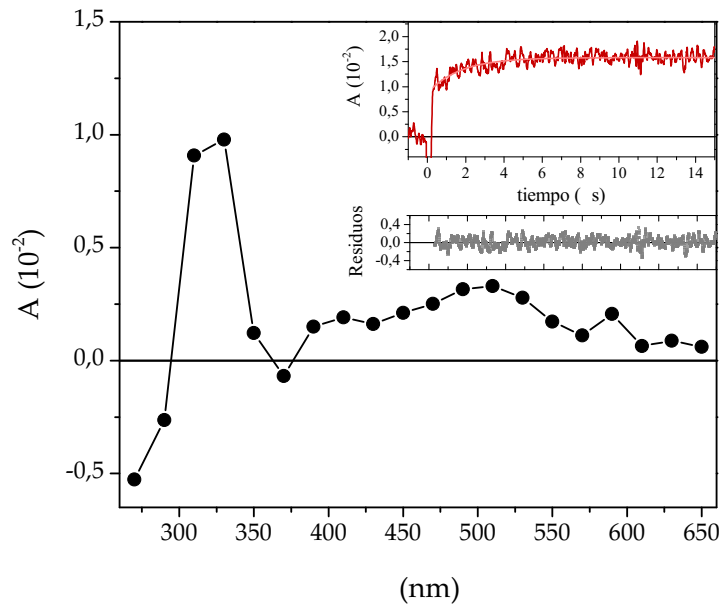
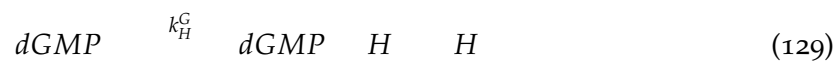


Figura 84: Espectro de absorción de transientes diferencia, calculado como la resta entre el espectro registrado en una solución saturada en Ar de Bip (90 μ M) y dGMP (1 mM) menos el espectro de Bip sin agregado de dGMP registrados a pH 5,5, 10 μ s luego del disparo del láser. Inset: crecimiento del radical $dGMP^{\cdot-}$ y su ajuste, con la correspondiente distribución de los residuos, registrado 2 μ s después del láser, $\lambda = 320$ nm.



Este radical neutro resultante posee características particulares que posibilitan su detección por la técnica de LFP en diferentes sistemas. Posee una banda con un máximo aproximadamente a 320 nm ($\epsilon_{320} = 6800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y un tiempo de vida mayor a 100 μ s [153].

Con el objetivo de encontrar evidencia directa de la transferencia electrónica entre el sustrato y el sensibilizador se realizaron experimentos excitando a Bip con el tercer armónico de un láser de Nd-YAG (355 nm) y registrando espectros de transientes en presencia y ausencia de 1 mM de dGMP a pH 5,5. Se registraron las señales entre 280 y 600 nm con una escala de 10 μ s/división. Considerando que el tiempo de vida de los tripletes de las pterinas está en el orden de los 3 μ s, con esta escala nos aseguramos que el triplete terminó de decaer. Cabe aclarar que estos espectros fueron registrados utilizando un sistema en flujo para evitar la degradación de las muestras, debido a que Bip es fotoquímicamente inestable y se oxida en presencia de O_2 y bajo radiación UV-A. Además, se realizaron controles a través de la medida de los espectros UV-visible antes y después de registrar el espectro de transientes para controlar que no hubieran cambios en los espectros de absorción, y de esta manera verificar que no hubiera un consumo significativo de Bip durante el experimento. El espectro que se muestra en la Figura 84 se calculó a partir de la diferencia entre el espectro de una solución de Bip y otra que contenía Bip en presencia de 1 mM de dGMP registrados en ausencia de O_2 . Se puede observar la banda de absorción característica del radical $dGMP^{\cdot-}$ a 320 nm y se determinó un tiempo

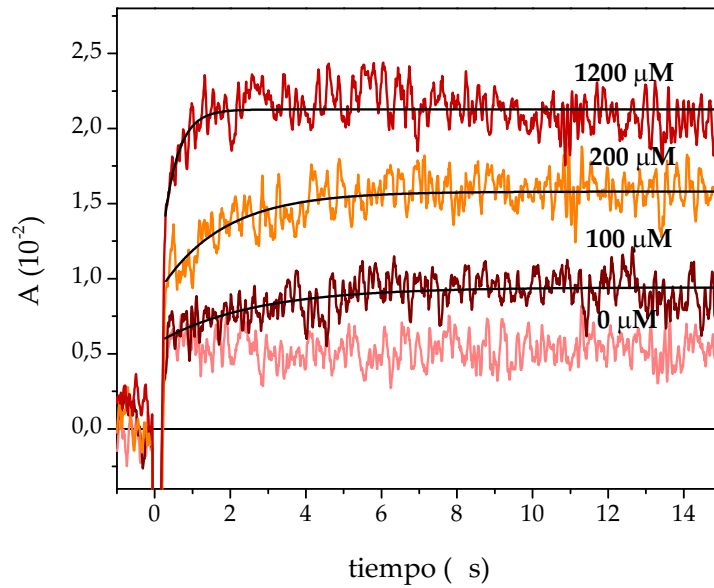


Figura 85: Crecimiento de la señal del radical *dGMP H* registrado a 320 nm en soluciones saturadas con Ar a pH 5,5 que contenían *Bip* y concentraciones crecientes de *dGMP*, 2 s después del disparo del láser. $Bip_0 = 90 \text{ M}$.

de vida promedio mayor a 100 s. Este resultado confirma la transferencia electrónica fotoinducida entre *Bip* y *dGMP*.

La formación de *dGMP H* se puede monitorear registrando la evolución temporal del cambio de absorbancia a 320 nm luego del pulso del laser. En el *inset* de la Figura 84 se muestra la formación del radical, la cual sigue una cinética de primer orden y cuya señal aumenta con un determinado tiempo de formación hasta llegar a un plateau. Se registraron las trazas a dicha longitud de onda para diferentes concentraciones de *dGMP*, las trazas obtenidas se ajustaron aplicando la Ecuación 130 similar a la utilizada en la Subsección 9.3.3,

$$A_{320} = A_1 + A_2 \exp^{-kt} \quad (130)$$

donde A_{320} es la variación de la diferencia de absorbancia registrada a 320 nm, A_1 es el valor de A_{320} cuando $t \rightarrow \infty$, A_2 es el factor pre-exponencial, y k es una constante. Dado que A_1 es igual a $\frac{G}{320} l [dGMP]_0$, el valor de este parámetro es directamente proporcional a la cantidad de radical formado. Por otro lado, k es igual a la inversa del tiempo que demora en formarse el radical, y va a depender de la concentración inicial de *dGMP*. Al igual que el comportamiento observado para *dAMP*, todas las trazas de la Figura 85 en presencia de *dGMP* muestran una disminución del t_f del radical dependiente de la concentración de *dGMP* y a su vez muestran un incremento del parámetro A_1 , lo cual implica que hay un aumento en la cantidad de radical formado. Se determinaron los tiempos de formación del radical, con el valor de $1/k$, para cada concentración de nucleótido. Al comparar estos valores con los T_i de *Bip* registrado a 420 nm para las mismas concentraciones de *dGMP* (Figura 86), los tiempos de vida de formación del radical resultaron iguales, dentro del error experimental, al valor del T_i de *Bip* para

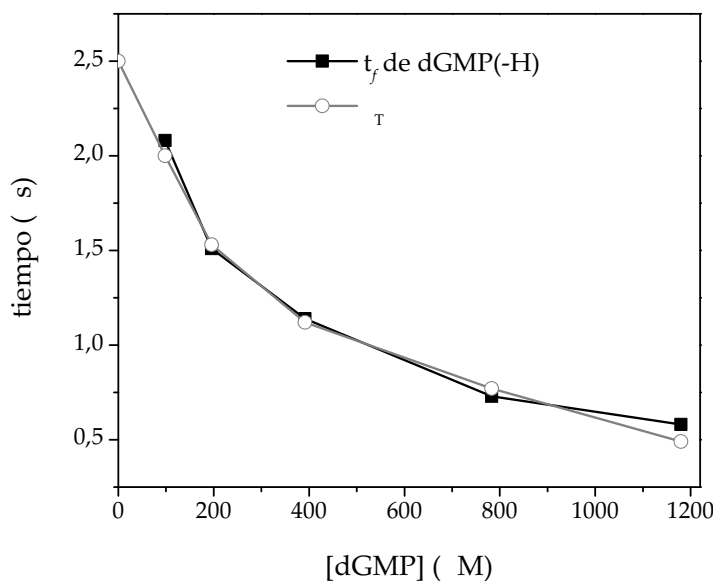


Figura 86: Tiempo de formación del radical $dGMP(-H)$ (t_f) y tiempo de vida del triplete de Bip (T) para diferentes concentraciones de dGMP en Ar a pH 5,5, registrado a 320 nm y 420 nm respectivamente. $Bip_0 = 90 \text{ M}$.

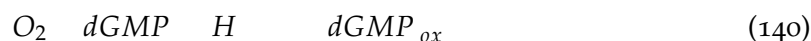
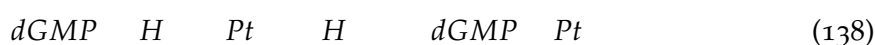
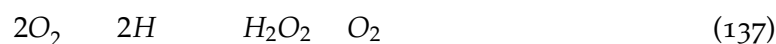
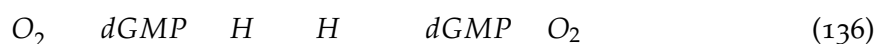
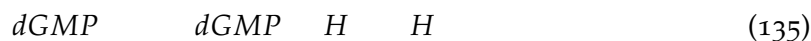
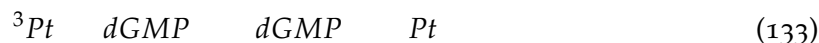
cada concentración de dGMP, registrados a 320 y 420 nm respectivamente. Este resultado indica claramente que el radical de dGMP se forma exclusivamente por la transferencia electrónica a partir del estado excitado triplete de Bip, excluyendo la participación del estado excitado singulete considerando que el tiempo de vida de este estado excitado es de 9,1 ns (Sección 4.1). Por último, es importante resaltar que Bip posee, al igual que las demás pterinas estudiadas, dos tiempos de vida de triplete. A través de estos resultados se puede confirmar que sólo uno de ellos es responsable del proceso fotosensibilizado y corresponde al tautómero lactama, de tiempo de vida largo.

10.5 MECANISMO DE REACCIÓN

A lo largo de este capítulo se estudiaron las propiedades fotosensibilizadoras de Bip y sus fotoproductos Fop y Cap utilizando como sustrato el nucleótido de guanina, dGMP. En primer lugar, se comprobó que los tres compuestos estudiados son capaces de fotoinducir la degradación de dGMP en soluciones acuosas equilibradas con aire a pH ácido, siendo Fop el sensibilizador más eficiente. Se probó que para que la reacción ocurra es indispensable la presencia O_2 . Sin embargo la contribución de una oxidación mediada por el 1O_2 no tiene un aporte significativo.

En base a los resultados presentados se plantea el siguiente mecanismo de reacción.





El proceso inicia con la absorción de un fotón por parte del sensibilizador y la formación del estado excitado singlete que luego por ISC genera los estados excitados tripletes (reacción 131). Esta especie excitada puede reaccionar con O_2 para generar 1O_2 por transferencia de energía (reacción 132). Por transferencia electrónica desde *dGMP* hacia 3Pt se generan los correspondientes pares radicales. En solución ácida *dGMP* se deprotona rápidamente para generar el radical neutro (reacción 133 y 135). Las vías que producen consumo del sustrato provienen de las reacciones entre *dGMP* + H y O_2 (reacción 140), y paralelamente entre *dGMP* en el estado fundamental y el 1O_2 (reacción 141), esta última reacción, sin ser despreciable, no resulta ser la vía de consumo mayoritaria en las condiciones experimentales utilizadas. Por último, el O_2 puede reaccionar con *dGMP* + H para regenerar a *dGMP* (reacción 136) o bien dar productos oxidados (reacción 139). La primer reacción sería la vía principal de reacción del O_2 debido a que al eliminar esta especie se observa un aumento del consumo del nucleótido.

MECANISMO GENERAL DE FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXIGUANOSINA 5'-MONOFOSFATO POR PTERINAS OXIDADAS

En la sección 4.3 se explicó que, estudios previos sobre la fotosensibilización de nucleótidos púricos por *Ptr* propusieron un mecanismo de Tipo I como el predominante para *dAMP* y *dGMP* en soluciones acuosas neutras o ligeramente ácidas. Este mecanismo, que se inicia con la transferencia electrónica desde el sustrato al estado excitado triplete de *Ptr*, se encuentra resumido en las ecuaciones 34 a 39. En los capítulos 9 y 10, se demostró que dicho mecanismo es también el predominante para la fotosensibilización de los mencionados sustratos por las pterinas de interés biomédico (*Bip*, *Fop* y *Cap*).

Sin embargo, el mecanismo no se conoce en profundidad y varios interrogantes quedan por resolver para poder plantear un conjunto general de procesos que permitan explicar con detalle los resultados experimentales observados. Con este objetivo se realizó una nueva serie de experimentos de irradiación estacionaria y con resolución temporal cuyos resultados se presentan en el presente capítulo.

Estos estudios se realizaron con *Ptr* como sensibilizador y *dGMP* como sustrato oxidable en medio ácido (pH 5,5). Se eligió este sistema considerando que *Ptr* es la molécula más sencilla y fotoquímicamente más estable de ésta familia. Con respecto al sustrato, tal como se mencionó anteriormente, *dGMP* es una molécula capaz de reaccionar tanto por mecanismo Tipo I como por un mecanismo Tipo II.

En particular, algunos de los interrogantes que se intentarán responder son los siguientes: i) si el proceso se desencadena con una reacción de transferencia electrónica en la cual no participa el O_2 , ¿por qué es necesaria la presencia del mismo para que la degradación del nucleótido tenga lugar?; ii) si la reacción entre *dGMP* y el 1O_2 es muy rápida, ¿por qué la oxidación por esta especie reactiva no contribuye significativamente al consumo global del nucleótido?; iii) ¿por qué la eliminación del O_2 , especie reactiva que se sabe reacciona con el radical guanina, conduce a un aumento del consumo del nucleótido?; iv) ¿cuáles son los productos de la reacción fotosensibilizada de *dGMP* por *Ptr* y cómo varía su distribución al cambiar las condiciones experimentales?.

Para responder estas preguntas se combinaron técnicas espectroscópicas y analíticas con el análisis cinético. Utilizando la técnica de *LFP* se estudió la interacción de los estados excitados tripletes del sensibilizador con el sustrato, la formación de especies radicalarias y la cinética de desaparición de dichas especies. Por otro lado, se estudió la interacción del 1O_2 con el sustrato empleando técnicas espectroscópicas de emisión en el *NIR*. Por último, la identificación de los productos de reacción del proceso fotosensibilizado, como así también el análisis de su distribución en diferentes condiciones experimentales, se realizó utilizando un equipo *UPLC-MS/MS*.

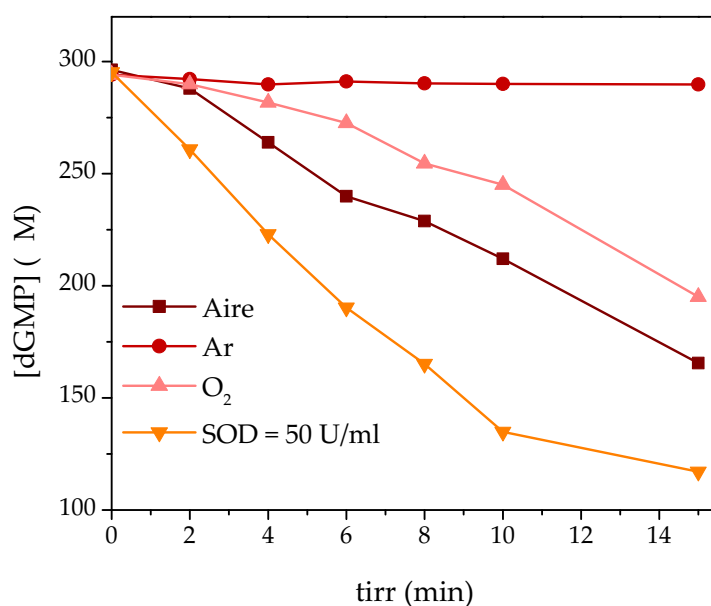


Figura 87: Evolución de la concentración de *dGMP* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas que contienen *Ptr* y *dGMP*. Experimentos realizados con soluciones equilibradas con aire, libres de O_2 , saturadas con O_2 y equilibradas con aire en presencia de SOD. $Ptr_0 = 100 \text{ M}$, $dGMP_0 = 295 \text{ M}$, $SOD = 50 \text{ U/ml}$.

11.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA REACCIÓN FOTOSENSIBILIZADA

En primer lugar, se realizó una serie de experimentos de irradiación estacionaria tendientes a reproducir el comportamiento descrito en la literatura para el sistema en estudio. Por consiguiente, se llevaron a cabo irradiaciones de soluciones acuosas conteniendo *Ptr* (100 M) y *dGMP* (300 M) bajo diferentes condiciones experimentales y se compararon los correspondientes perfiles de concentración del nucleótido obtenidos por HPLC. La Figura 87 muestra los resultados obtenidos bajo irradiación continua a 350 nm de soluciones bajo las siguientes condiciones: soluciones equilibradas con aire, saturadas con O_2 o Ar y equilibradas con aire en presencia de SOD. Los perfiles de concentración de *dGMP* mostraron que, el O_2 es necesario para que la degradación del nucleótido tenga lugar, ya que en anaerobiosis no hay consumo. Sin embargo, en soluciones saturadas con O_2 , la velocidad de consumo de *dGMP* fue mucho menor con respecto a las soluciones equilibradas con aire. Por otra parte, la presencia de SOD causó un aumento significativo en la tasa de consumo de *dGMP*.

En otra serie de experimentos se cuantificó el consumo de *dGMP* en forma comparativa en soluciones irradiadas de *Ptr* y el nucleótido preparadas en H_2O y D_2O en medio ácido (Subsección 5.4.3). Aunque el valor de la velocidad de consumo de *dGMP* aumentó ligeramente al cambiar el solvente de H_2O a D_2O (Figura 88), el efecto isotópico observado es menor al esperado si la reacción ocurriese únicamente mediante un mecanismo de fotooxidación Tipo II. Estos resultados sugieren que la reacción química entre *dGMP* y el

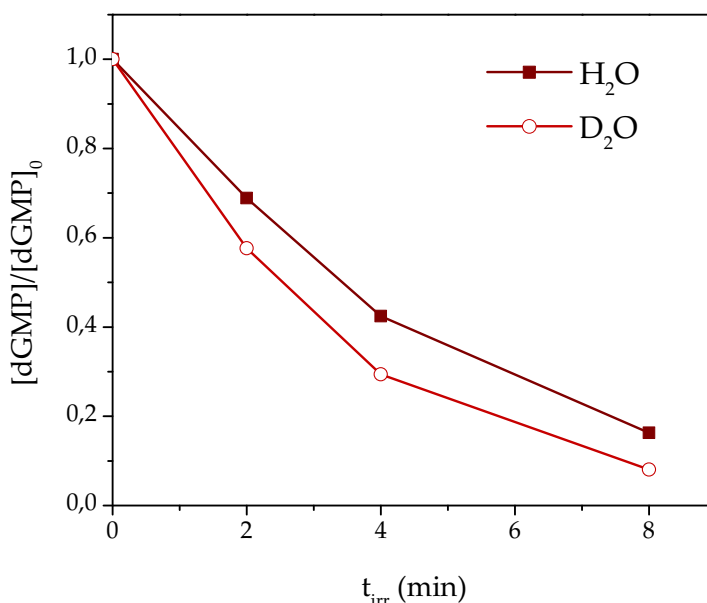


Figura 88: Evolución de la concentración de dGMP relativa a la concentración inicial en soluciones de Ptr y dGMP equilibradas con aire preparadas en H₂O (símbolos llenos) a pH = 5,5 y D₂O (símbolos vacíos) a pD = 5,5. $Ptr_0 = 150 M$; $dGMP_0 = 200 M$.

¹O₂, a pesar de no ser despreciable, no es la vía principal de la oxidación fotosensibilizada por Ptr.

Los resultados presentados en las Figuras 87 y 88 son análogos a los expuestos en el capítulo 10 para otros derivados pterínicos. Además son compatibles con los antecedentes de bibliografía [114]. Es decir, el comportamiento observado para la degradación de dGMP fotoinducida por Ptr, cuyo mecanismo se pretende dilucidar en este capítulo, es el esperado considerando los estudios previos.

11.2 DESACTIVACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES

En el capítulo 10 se determinó que dGMP desactiva los estados excitados tripletes de Bip y sus fotoproductos. Antes de iniciar el estudio del mecanismo de la oxidación de dGMP fotosensibilizada por Ptr, se realizaron experimentos de LFP similares a los presentados en la subsección 10.3.4 para los demás derivados pterínicos, con el objetivo de evaluar la eficiencia de la interacción del nucleótido con los ³Ptr. Tal como se describió en la subsección 8.1.2, Ptr presenta dos ³Ptr, los cuales se denominarán (T_c y T_l), con los siguientes tiempos de vida: $T_c = 0,36 s$ y $T_l = 3,6 s$. Se registraron los decaimientos de los ³Ptr a 430 nm en soluciones acuosas saturadas con Ar que contenían Ptr y diferentes concentraciones de dGMP, las cuales se ajustaron con ecuaciones biexponenciales (ecuación 80) y se realizó un análisis de Stern-Volmer utilizando la ecuación 125.

Las gráficas de Stern-Volmer obtenidas mostraron un comportamiento lineal (Figura 89). De la pendiente de éstas gráficas se calcularon los valores de $k_{t_r}^{dGMP}$ correspondiente a cada triplete, $k_{t_c}^{dGMP} = 2,0 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$ y $k_{t_l}^{dGMP} = 5,4 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$. Estos

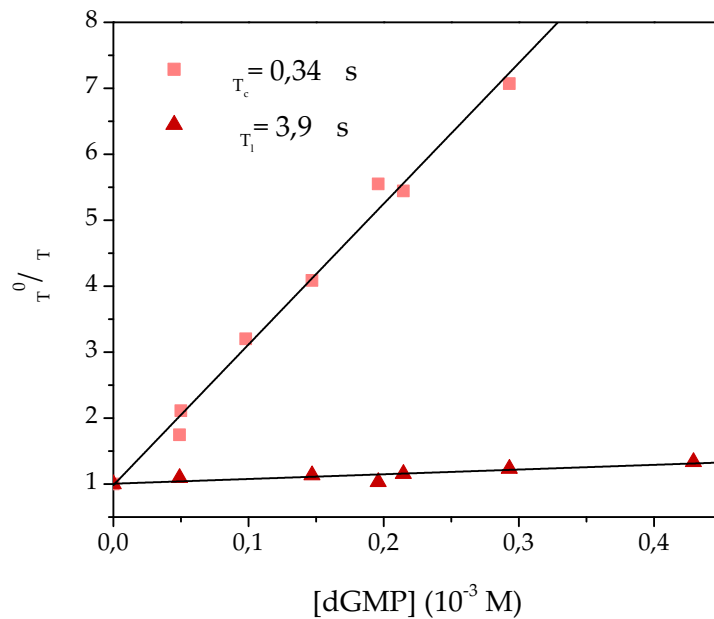


Figura 89: Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de los 3Ptr por dGMP. T_c y T_l calculados a partir de los decaimientos registrados en soluciones acuosas saturadas con Ar a pH 5,5 de Ptr y concentraciones crecientes de dGMP. λ_{exc} 430 nm, A_{355} 0,5. Ptr 100 M

valores son similares a los obtenidos para Bip y Fop (Subsección 10.3.4), y además se encuentran en el orden de lo reportado en la literatura para la constante de desactivación de 3Ptr por guanosina a pH 9 [100]. Este resultado es una evidencia directa de la interacción de ambos estados excitados tripletes del sensibilizador con el nucleótido.

De manera análoga al cálculo realizado con Bip, a partir de los valores de k_{tr}^{dGMP} y $k_{qT}^{O_2}$ (Capítulo 8, Tabla 8) se evaluó la competencia entre el O_2 y dGMP por la desactivación de los 3Ptr . De esta manera, se analizó el efecto de la variación de la concentración de O_2 en la velocidad de la degradación fotosensibilizada de dGMP observada en los experimentos de irradiación continua. Se calculó entonces la fracción de los 3Ptr desactivados por dGMP en presencia de O_2 (f_q^{dGMP}) con la ecuación 126 para las condiciones de concentración de dGMP y O_2 utilizadas en los experimentos de la Figura 87. Los valores de $f_{q_{aire}}^{dGMP}$ y $f_{q_{O_2}}^{dGMP}$ obtenidos fueron 0,56 y 0,23 para T_l , mientras que para T_c fueron iguales a 0,17 y 0,14; en las soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 , respectivamente. Comparando los valores se puede concluir que, un incremento en la concentración de O_2 reduce significativamente la desactivación de los 3Pt por dGMP para la especie con T_l , mientras que la que posee el T_c no se ve afectado significativamente. Este efecto explica la disminución de la velocidad de consumo del nucleótido observada en los experimentos de irradiación estacionaria en soluciones saturadas en O_2 con respecto a las soluciones equilibradas con aire.

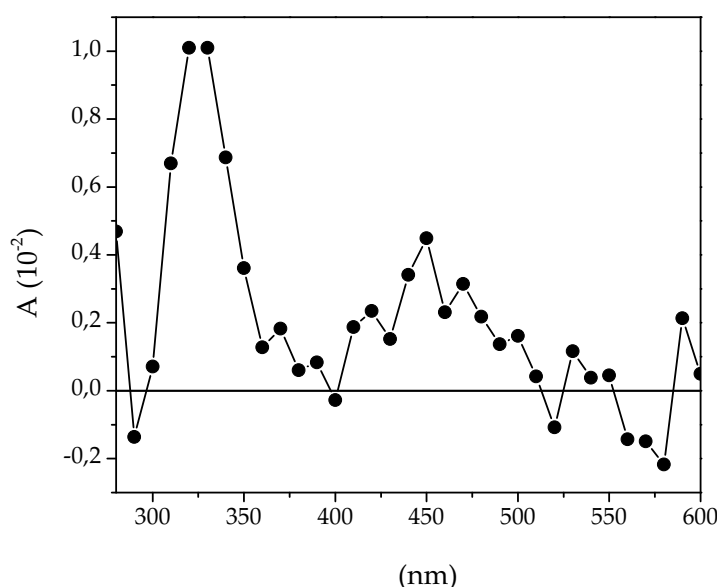


Figura 90: Espectro de absorción de transientes diferencia, calculado como la resta entre el espectro registrado en una solución saturada en Ar de Ptr (100 μ M) y dGMP (2 mM) menos el espectro de Ptr sin agregado de dGMP registrados a pH 5,5, 10 μ s luego del disparo del láser.

11.3 INVESTIGACIÓN DEL RADICAL GUANINA

En estudios previos se determinó la generación del radical $dGMP^{\cdot-}$ a partir de Ptr por la técnica de LFP [112]. Por otro lado en el capítulo 10 se detectó la formación de este mismo radical pero utilizando Bip como sensibilizador. En experimentos similares se investigó la formación del radical $dGMP^{\cdot-}$ en una solución que contenía dGMP y Ptr en ausencia de O_2 . Se registró un transiente de tiempo de vida largo y con una banda de absorción centrado en 320 nm (Figura 90). Este resultado confirma la formación del radical y, a su vez, la existencia de un proceso de transferencia electrónica.

11.3.1 Cinética de formación del radical guanina

Tal como se explicó en la subsección 10.4.2, la formación de $dGMP^{\cdot-}$ se puede monitorear registrando la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser. Ajustando las señales obtenidas con la ecuación 130 se puede calcular el t_f del radical como la inversa de la constante k . Por otro lado, el valor de A_1 será proporcional a la concentración de $dGMP^{\cdot-}$ alcanzada una vez que se completa la reacción de transferencia electrónica.

En una primera serie de experimentos se registraron las señales de crecimiento para diferentes concentraciones de dGMP en soluciones de Ptr (100 μ M). En todos los casos las señales se ajustaron con una cinética de primer orden (ecuación 130) y mostraron un aumento de la cantidad de $dGMP^{\cdot-}$ formado al aumentar la concentración de dGMP inicial (Figura 91). A partir del ajuste de estas señales se calcularon los valores de t_f para

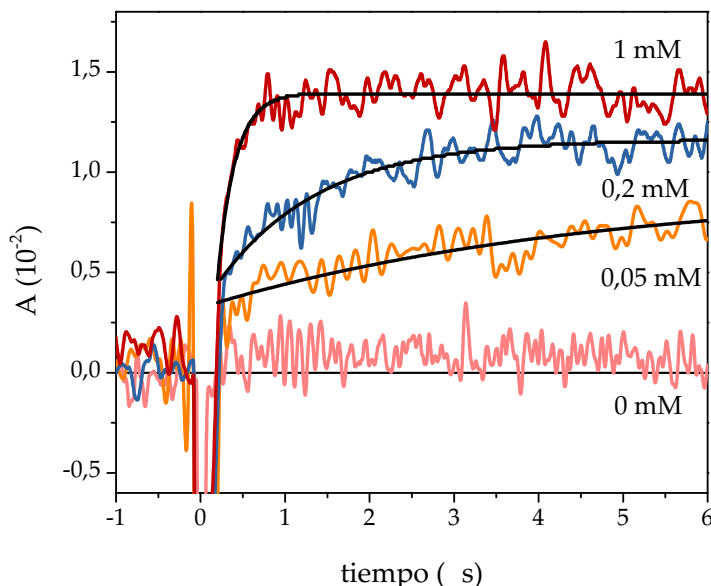


Figura 91: Crecimiento de la señal de *dGMP* H en soluciones saturadas en Ar de Ptr y *dGMP* monitoreado siguiendo la evolución temporal de A_{320} luego del pulso del láser para diferentes concentraciones de *dGMP*, las cuales se indican junto a cada traza. Ptr $100 \text{ } \mu\text{M}$.

cada concentración de *dGMP*, y se observó que los mismos disminuyen con el aumento de la concentración del nucleótido y resultaron iguales, dentro del error experimental, a los valores de τ_1 de Ptr registrados a 430 nm (Figura 92). Teniendo en cuenta que el τ_F de Ptr es igual a 7,6 ns, se puede descartar la participación del estado excitado singlete en el proceso. Por lo tanto, los resultados indican claramente que, en estas condiciones experimentales, la formación del radical *dGMP* H se debe exclusivamente a la transferencia electrónica desde *dGMP* hacia T_1 de Ptr.

En otra serie de experimentos de LFP se analizó la señal de formación del radical *dGMP* H registrada a diferentes concentraciones de O_2 para concentraciones fijas de nucleótido (1 mM) y Ptr (100 μM). Se puede apreciar en la Figura 93 (a) que al aumentar la concentración de O_2 la cantidad de radical *dGMP* H formado es menor, efecto que se visualiza en el valor de A_{320} a tiempo infinito. En todos los casos la formación del radical siguió una cinética de primer orden; sin embargo, el t_f se vio reducido por la presencia del O_2 . Del ajuste de las señales se obtuvieron los valores de t_f del radical *dGMP* H para cada concentración de O_2 . Teniendo en cuenta la comparación realizada en la Figura 92, los valores de t_f calculados reflejan la desactivación del T_1 de Ptr por O_2 . A partir de estos datos y realizando un análisis de Stern-Volmer (Figura 93 (b)) se puede calcular un valor de $k_{qT_1}^{O_2} = 4,2 \cdot 10^9 \text{ } M^{-1} \text{ s}^{-1}$, el cual resultó similar, dentro del error experimental, al obtenido para la desactivación de los 3Ptr por O_2 (Capítulo 8, Tabla 8).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en los párrafos precedentes, se pueden proponer las reacciones competitivas 144 a 149 para el 3Ptr , que en las condiciones experimentales utilizadas, corresponde a la especie T_1 .

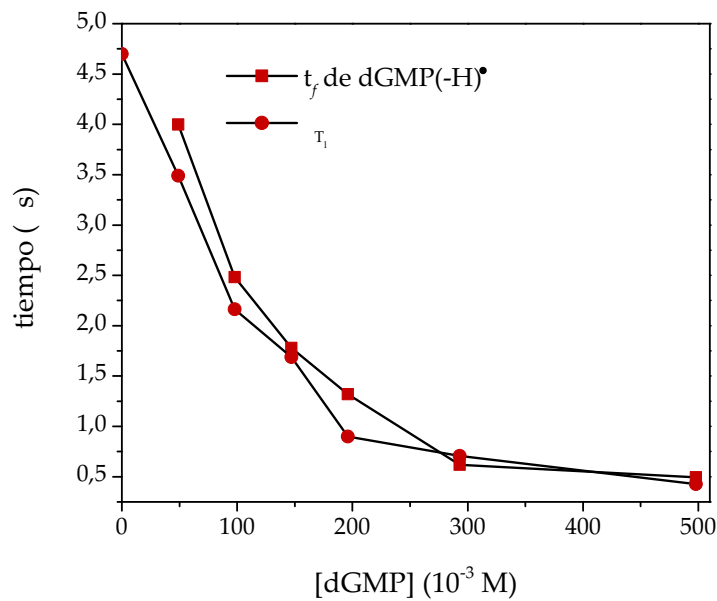


Figura 92: Tiempo de formación del radical $dGMP(-H)^\bullet$ (t_f) y tiempo de vida del triplete de Ptr , correspondiente a la especie T_1 , para diferentes concentraciones de $dGMP$ en Ar a pH 5,5, registrado a 320 nm y 420 nm respectivamente. $Ptr = 100 M$.

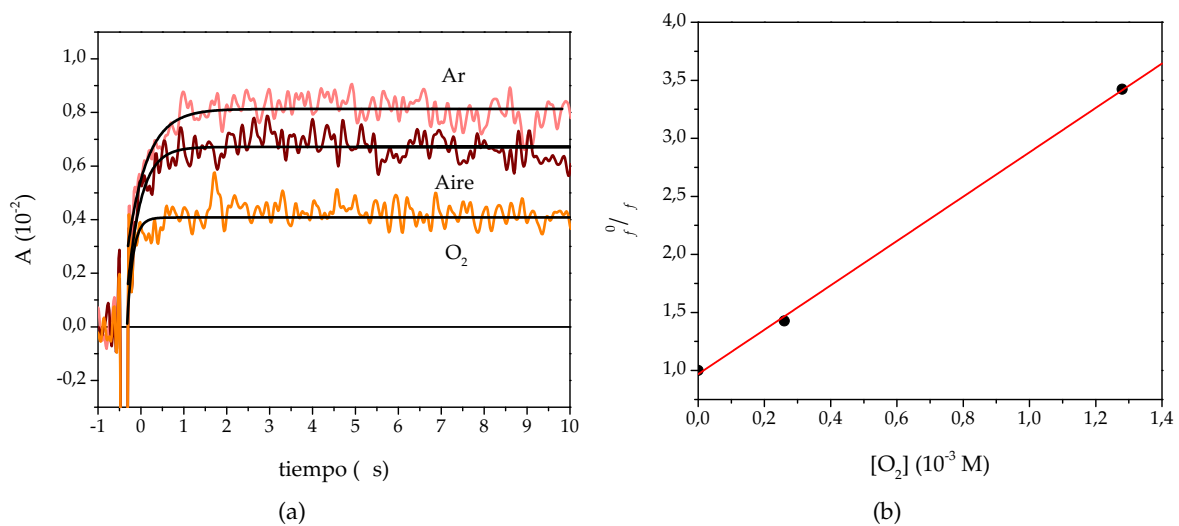
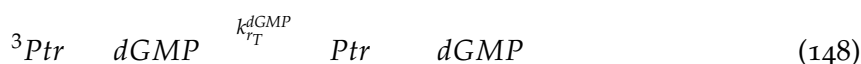
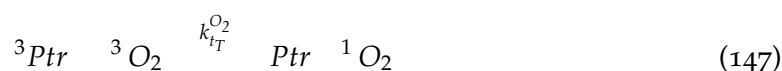


Figura 93: (a) Formación del radical $dGMP(-H)^\bullet$ registrada a partir de la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser a diferentes concentraciones de O_2 , $Ptr = 100 M$, $dGMP = 1 mM$. (b) Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de 3Ptr por O_2 en presencia de $dGMP$, calculado a partir del tiempo de formación de $dGMP(-H)^\bullet$.



Luego de la excitación de la Ptr en el estado fundamental y la formación del estado excitado triplete, 3Ptr (reacciones 142 y 143), éste participa en diversas reacciones competitivas. En primer lugar existen reacciones de desactivación unimolecular como por ejemplo, la disipación de la energía en forma radiativa (reacción 145) y no radiativa (reacción 144); aunque la primera es despreciable a temperatura ambiente. Por otro lado, existen reacciones que conducen a la degradación fotoquímica del sensibilizador (reacción 146), en el caso particular de Ptr estas reacciones son despreciables. Sin embargo, para otras pterinas oxidadas (por ejemplo Bip o Fop) se deben tener en cuenta estos procesos. Otra reacción que compite por 3Ptr es la transferencia de energía al O_2 (reacción 147). También debe considerarse la transferencia electrónica desde dGMP (reacción 148, k_{rT}^{dGMP}), para dar los correspondientes pares iones radicales y la desactivación física por la retrotransferencia de electrones sin salir de la caja de solvente que restablece a dGMP y Ptr en sus niveles de oxidación originales (reacción 149, k_{btT}^{dGMP}) [155, 6, 156]. Cabe aclarar que k_{tT}^{dGMP} determinada en los experimentos de LFP corresponde a la suma de las constantes de velocidad de desactivación química y desactivación por retrotransferencia de electrones ($k_{tT}^{dGMP} = k_{rT}^{dGMP} + k_{btT}^{dGMP}$). De acuerdo a este esquema de reacción, para una dada concentración inicial de dGMP la cantidad de radical formado depende de la concentración de O_2 del medio debido a la competencia entre la reacciones 147 y 148.

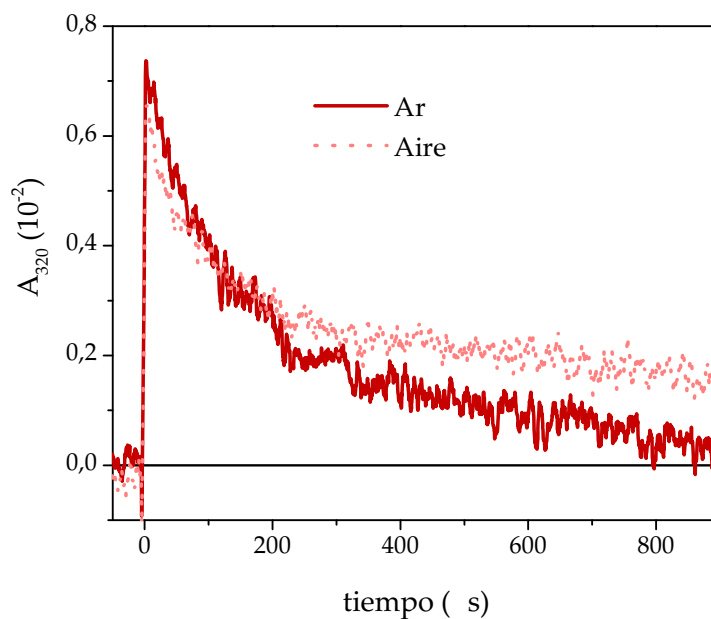


Figura 94: Decaimiento del radical $dGMP \ H$ registrada a partir de la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser en ausencia y en presencia de O_2 . $Ptr = 100 \text{ M}$, $dGMP = 1 \text{ mM}$.

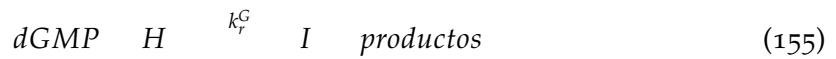
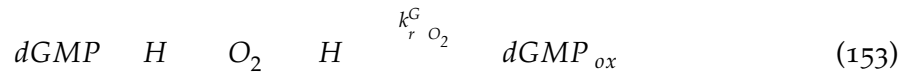
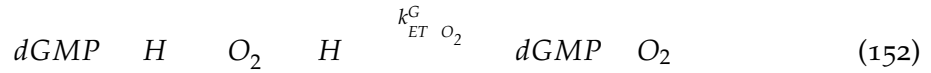
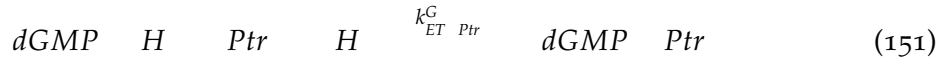
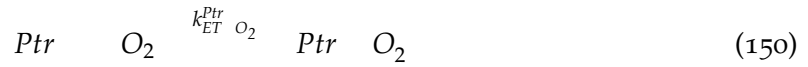
11.3.2 Destino del radical guanina

Una vez que el radical $dGMP \ H$ se forma, el descenso de la concentración del mismo también puede ser monitoreado registrando la señal a 320 nm en función del tiempo, pero usando escalas de tiempo mucho mayores, porque tal como se mencionó anteriormente, una de las características de este radical es que posee un $t_{1/2}$ del orden de los 100 s. Sin embargo, la cinética de decaimiento del radical va a depender de las condiciones experimentales. Por consiguiente, en esta sección se presentará un análisis cinético de las trazas obtenidas variando las condiciones experimentales, del cual se extraerá información para contribuir a dilucidar los mecanismos de reacción.

11.3.2.1 Reacciones en ausencia y presencia de O_2

La Figura 94 muestra la evolución del A_{320} en función del tiempo luego del disparo del láser, en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 que contienen Ptr (100 M) y $dGMP$ (1 mM). En condiciones anaeróbicas, el valor de A cuando el tiempo tiende a infinito registrado a 320 nm y a otras longitudes de onda fue prácticamente cero, esto sugiere que no hay formación de un producto estable a partir de $dGMP \ H$ en ausencia de O_2 , lo cual es compatible con lo observado en los experimentos de irradiación estacionaria, es decir, no se observa consumo del nucleótido cuando soluciones libres de O_2 que contienen Ptr y $dGMP$ se exponen a la radiación UV-A (Figura 87). Por otro lado, los valores de A residual cuando el tiempo tiende a infinito registrados a diferentes longitudes de onda, pero en presencia de O_2 , sugieren la formación de fotoproductos. Lo

cual también coincide con el consumo del nucleótido observado en los experimentos de irradiación estacionaria (Figura 87). Para interpretar estos resultados, se deben plantear las posibles reacciones en las que pueden estar involucrados los radicales formados.



Se conoce que el radical anión *Ptr* reacciona con el O_2 de forma eficiente para generar el anión O_2^- (reacción 150). Por su parte, el radical *dGMP* + *H* puede participar en varias vías competitivas. Puede ser reducido por el radical *Ptr* para recuperar *dGMP* en el estado fundamental (reacción 151). Por otro lado, está reportado en bibliografía que el O_2^- reacciona muy rápidamente con el radical guanina de acuerdo a dos vías competitivas: por un lado la reacción que restituye a *dGMP* a través de una reacción de transferencia electrónica (reacción 152) [35] y la reacción de adición generando como producto principal imidazolona (IdZ) (reacción 153). Simultáneamente, *dGMP* + *H* puede reaccionar con O_2 para formar productos oxigenados (reacción 154); sin embargo, esta reacción es muy lenta [157]. Alternativamente *dGMP* + *H* podría participar en una serie de reacciones independientes del O_2 para dar otros productos (reacción 155), aunque este tipo de proceso no ha sido descrito en la literatura.

En condiciones anaeróbicas, la recombinación de los radicales *dGMP* + *H* y *Ptr* es la única reacción posible que da como resultado las moléculas de *Ptr* y *dGMP* en el estado fundamental (reacción 151). Por lo tanto, si *dGMP* + *H* no participa en ningún otro tipo de reacción, se debería esperar la recombinación total de los radicales para recuperar completamente los reactivos iniciales. La relación estequiométrica entre *dGMP* + *H* y *Ptr* es 1:1, por lo tanto, la señal del radical *dGMP* + *H* debería seguir una cinética de decaimiento de orden dos, dada por la ecuación 156. Considerando que la concentración inicial de ambos radicales es la misma, la ley de velocidad para la reacción 151 se puede expresar con la ecuación 157.

$$v = \frac{dGMP + H}{t} = k_{ET}^G [Ptr] [dGMP + H] \quad (156)$$

$$v = \frac{d[GMP-H]}{dt} = k_{ET}^G [Ptr] [dGMP-H]^2 \quad (157)$$

Tal como se dijo anteriormente, la concentración de $dGMP-H$ es directamente proporcional al A_{320} , por la ley de Lambert-Beer se puede calcular la concentración aplicando la ecuación 158

$$A_{320} = \epsilon_{320} l [dGMP-H] \quad (158)$$

donde $\epsilon_{320} = \frac{G_{320}}{Ptr_{320}}$. Suponiendo que $\frac{Ptr_{320}}{G_{320}}$ se puede reemplazar A_{320} por $dGMP-H$ conociendo el $\frac{G_{320}}{Ptr_{320}}$. Reordenando e integrando la ecuación 156 entre la concentración de radical inicial ($dGMP-H_0$) y a un tiempo "t" ($dGMP-H_t$), se obtiene la ecuación integrada de la velocidad para una reacción de orden 2, ecuación 160.

$$\frac{dGMP-H_t}{dGMP-H_0} = \frac{dGMP-H}{dGMP-H_0} \frac{1}{2} k_{ET}^G [Ptr] t \quad (159)$$

$$\frac{1}{dGMP-H_t} - \frac{1}{dGMP-H_0} = k_{ET}^G [Ptr] t \quad (160)$$

Realizando un análisis similar pero suponiendo que la única reacción posible para el radical $dGMP-H$ fuera la reacción con el O_2 disuelto (reacción 154), se puede realizar el siguiente razonamiento. En soluciones equilibradas con aire la concentración de O_2 es aproximadamente $2,7 \cdot 10^{-4} M$, por otro lado para una concentración de 1 mM de dGMP, concentración en la cual se desactivan más del 90% de los 3Ptr por el nucleótido, se obtiene un valor de $A_{320_0} = 0,0075$, lo cual equivale a una concentración de $dGMP-H = 1 \cdot 10^{-6} M$ (ecuación 158), dos ordenes de magnitud menor que la concentración de O_2 en el medio. Por lo tanto, la ley de velocidad para la reacción 154 se puede expresar como una reacción de pseudo primer orden con respecto al radical (ecuación 162),

$$v = \frac{d[GMP-H]}{dt} = k_r^G [O_2] [dGMP-H] \quad (161)$$

$$v = \frac{d[GMP-H]}{dt} = k_1 [dGMP-H] \quad (162)$$

con $k_1 = k_r^G [O_2]$. Se puede calcular $dGMP-H$ utilizando la ecuación 158, pero con $\epsilon_{320} = \frac{G_{320}}{Ptr_{320}}$. Nuevamente, suponiendo que $\frac{Ptr_{320}}{G_{320}}$ y considerando que $\frac{G_{320}}{Ptr_{320}}$ se puede reemplazar A_{320} por $dGMP-H$ conociendo el $\frac{G_{320}}{Ptr_{320}}$. Reordenando e integrando la ecuación 162, se obtiene la ecuación integrada de la velocidad para una reacción de pseudo primer orden (ecuación 164).

$$\frac{dGMP-H_t}{dGMP-H_0} = \frac{dGMP-H}{dGMP-H_0} e^{-k_1 t} \quad (163)$$

$$\ln \frac{dGMP-H_t}{dGMP-H_0} = -k_1 t \quad (164)$$

Nótese que la ecuación 164 también sería válida incluso si la reacción con O_2 fuera despreciable y otras reacciones de pseudo primer orden contribuyeran al consumo de $dGMP$ H , pero en ese caso k_1 sería igual a la sumatoria de todas las vías de consumo (k_1).

Por otro lado, el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) se define como el tiempo en el cual la concentración inicial de una especie disminuye en un 50%. Se puede calcular el valor de $t_{1/2}$ reemplazando $dGMP$ H $t = \frac{dGMP}{2} \frac{H}{H_0}$ en las ecuaciones 160 y 164, y llegar a dos expresiones de $t_{1/2}$ para cada tipo de cinética.

- Cinética de orden 1, ecuación 165

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} = \frac{0,693}{k_1} \quad (165)$$

- Cinética de orden 2, ecuación 166

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{ET}^{G} \text{Ptr} \cdot dGMP \cdot H_0} \quad (166)$$

Se registraron los decaimientos a 320 nm de soluciones saturadas en Ar que contenían Ptr y *dGMP* (Figura 95 (a)). Las trazas registradas se graficaron como A_{320}^1 en función del tiempo presentando una dependencia lineal. Para confirmar que los decaimientos no se ajustan a una cinética de orden 1, los mismos datos se analizaron graficando el $\ln A_{320}$ en función del tiempo (Figura 95 (b)). Por el contrario, este tratamiento de los datos no sigue un comportamiento lineal. Tal como se puede apreciar en la distribución de los residuos aplicando uno u otro análisis (Figura 95 (c) y (d)), queda claro que $dGMP$ H luego de su formación, se consume siguiendo una cinética de orden 2.

Por último, para una serie de decaimientos registrados a 320 nm en soluciones saturadas en Ar que contenían una concentración fija de Ptr (100 M) y diferentes concentración de *dGMP* entre 50 y 500 M , se calcularon los valores de $t_{1/2}$ y a partir de los valores de A_{320} máximos, se calcularon las concentraciones de $dGMP$ H inicial ($dGMP$ H_0). La dependencia del $t_{1/2}$ con $dGMP$ H_0^{-1} (Figura 96) resultó ser lineal, lo cual es compatible con una cinética de orden 2 (ecuación 166). De la pendiente de esta gráfica se pudo calcular el valor de la constante de reacción de transferencia electrónica entre $dGMP$ H y Ptr $k_{ET}^{G} \text{Ptr} = 1,03 \cdot 10^{10} M^{-1} s^{-1}$, la cual resultó ser del orden difusional. De esta manera, se confirma que bajo condiciones anaeróbicas la reacción correspondiente a la recombinación de $dGMP$ H con Ptr es la única reacción que consume los radicales para producir los reactivos iniciales en el estado fundamental y, por lo tanto, no se observa consumo neto del sustrato, esto es consistente con lo observado en los experimentos de irradiación estacionaria en soluciones saturadas con Ar (Figura 87).

Por otro lado, en presencia de O_2 , $dGMP$ H se consume a través de varias vías competitivas con diferentes cinéticas, las reacciones 151 a 155 que consumen al radical y la reacción 150 que elimina a Ptr, todas en conjunto contribuyen a la disminución de la velocidad de la reacción de recombinación. Por lo tanto, los decaimientos registrados en

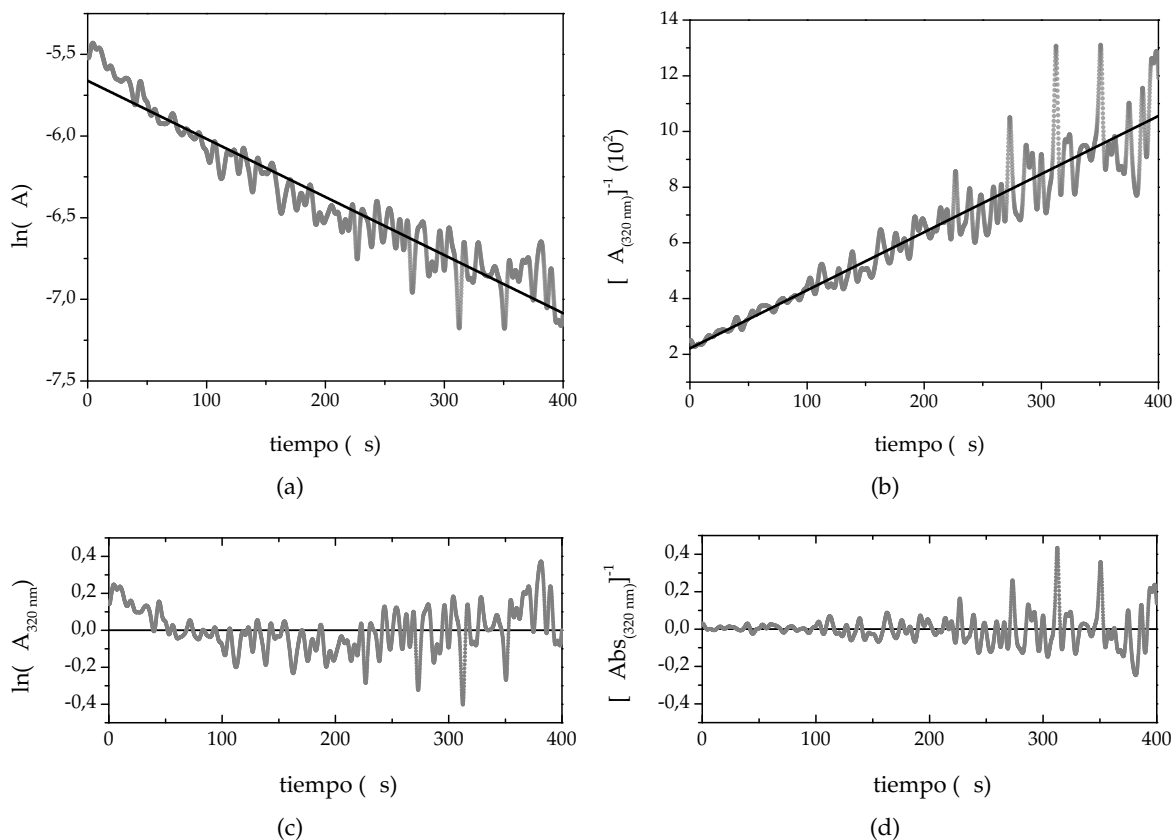


Figura 95: Decaimiento del radical *dGMP* *H* registrado a partir de la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser en soluciones libre de O_2 . $P_{tr} = 100 M$, $dGMP = 200 M$. (a) $\ln A$ vs. tiempo; (b) Variación de A^{-1} vs. tiempo; (c) distribución de los residuos para el ajuste lineal de los datos según una cinética de orden 1 y (d) una cinética de orden 2.

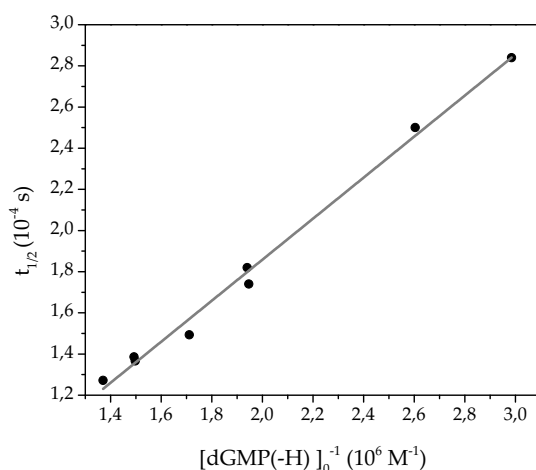


Figura 96: Variación del $t_{1/2}$ del radical *dGMP* *H* con la inversa de la concentración de *dGMP* *H* en soluciones libres de O_2 . $P_{tr} = 100 M$.

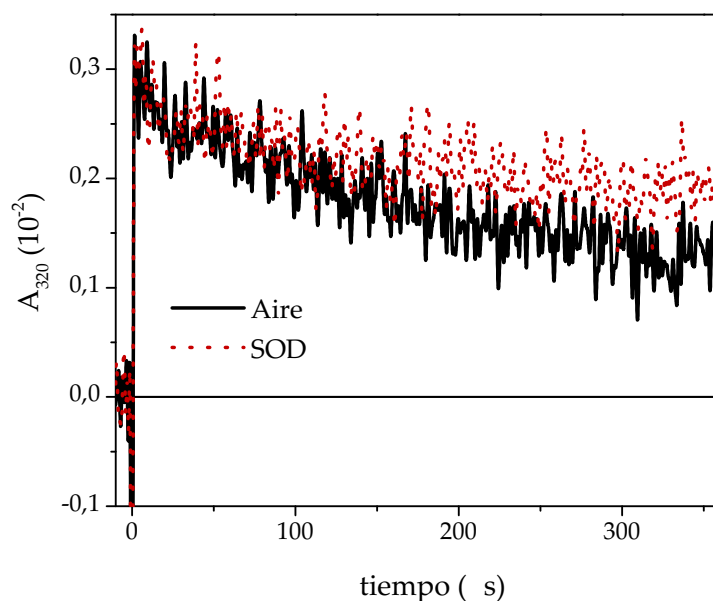


Figura 97: Decaimiento del radical *dGMP* H registrado a partir de la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser en una solución de Ptr y *dGMP* equilibrada con y sin agregado de SOD. Ptr 100 M, *dGMP* 1 mM, SOD 50 U/ml.

dichas condiciones no se comportan según una cinética de primer ni de segundo orden (Figura 97).

11.3.2.2 Reacciones en presencia de superóxido dismutasa

La reacción 150 genera O_2^- que, en principio, también puede reaccionar con *dGMP* H (reacciones 152 y 153). Para evaluar la participación del anión O_2^- en el mecanismo de fotosensibilización de *dGMP*, se llevaron a cabo experimentos de LFP con soluciones equilibradas con aire que contenían Ptr y *dGMP* en ausencia y en presencia de SOD (Subsección 5.4.2).

El valor de A_{320} cuando el tiempo tiende a infinito fue mayor en presencia de SOD con respecto al control en aire y sin SOD (Figura 97), este resultado sugiere una mayor formación de productos de degradación de *dGMP* cuando el O_2^- se elimina del medio de reacción. Este resultado explica por qué en los experimentos de irradiación estacionaria se observa un aumento en la velocidad de consumo del nucleótido en presencia de SOD con respecto a las soluciones irradiadas en ausencia de la enzima (Figura 87).

El análisis de las trazas en presencia de SOD reveló que el decaimiento del *dGMP* H sigue una cinética de primer orden en dichas condiciones. En la Figura 98 se muestra el análisis cinético aplicando las ecuaciones 164 y 160 para una traza registrada en una solución que contenía Ptr y *dGMP* (100 M) en presencia de SOD (50 U/ml). En este caso, cuando se graficó la señal como $\ln A_{320}$ en función del tiempo, la señal se ajustó perfectamente a un comportamiento lineal. Por otro lado, la gráfica de A_{320}^{-1} como función del tiempo no mostró un comportamiento lineal. El comportamiento descrito puede apreciarse en la distribución de los residuos para ambos tratamientos (Figura 98 (c) y (d)).

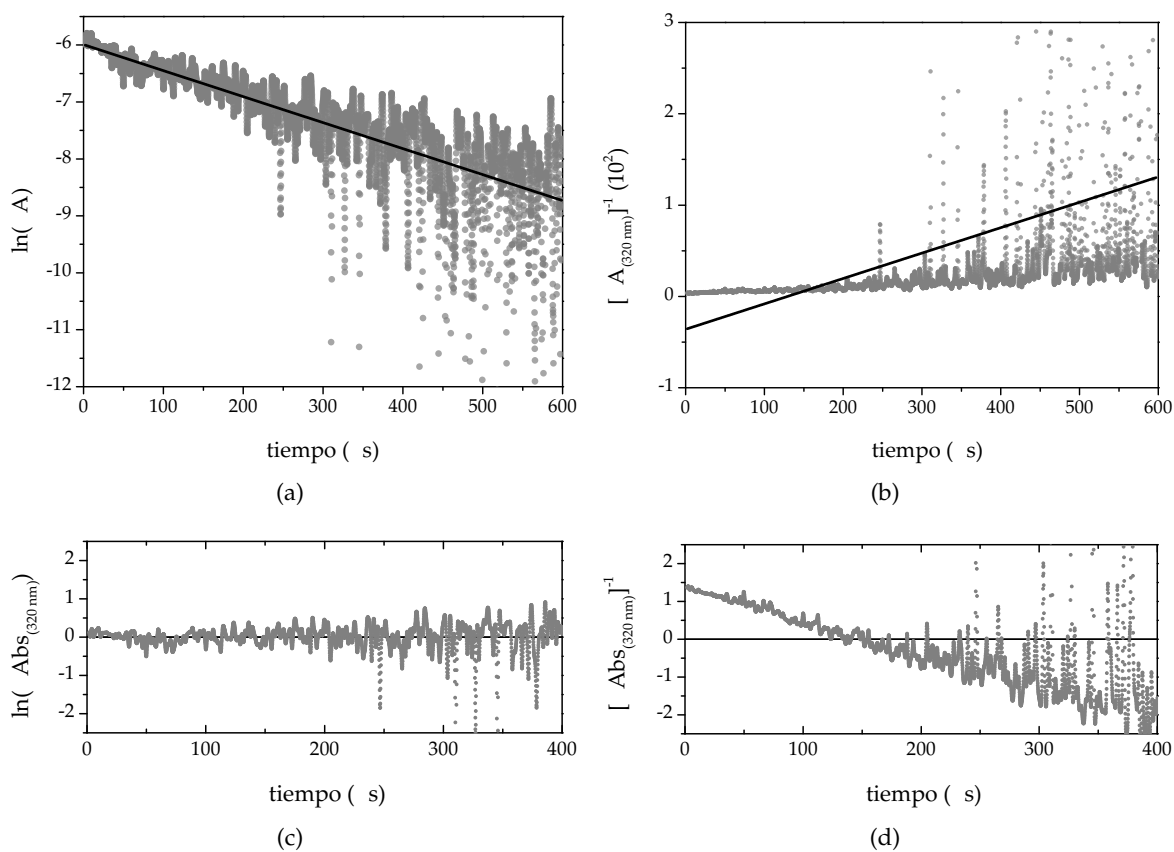


Figura 98: Decaimiento del radical $dGMP-H$ registrada a partir de la evolución temporal del A_{320} luego del pulso del láser en soluciones equilibradas con aire y con el agregado de SOD, $\lambda_{exc} = 355\text{ nm}$, $P_{tr} = 100\text{ M}$, $dGMP = 100\text{ M}$, $SOD = 50\text{ U/ml}$. (a) $\ln A$ vs. tiempo; (b) variación de A^{-1} vs. tiempo; (c) distribución de los residuos para el ajuste lineal de los datos según una cinética de orden 1 y (d) una cinética de orden 2.

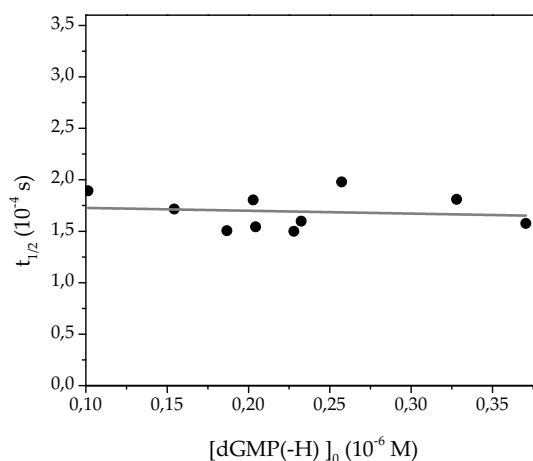


Figura 99: Variación del $t_{1/2}$ del radical $dGMP^{\cdot-}H$ en función de la concentración inicial de $dGMP^{\cdot-}H$ en soluciones equilibradas con aire y con el agregado de 50 μ/ml de SOD. $Ptr = 100 M$.

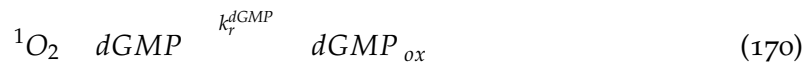
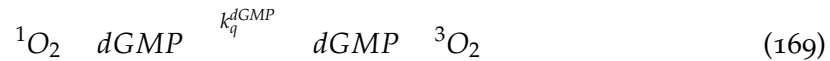
De forma análoga a los experimentos de LFP realizados en ausencia de O_2 , se analizó la variación del $t_{1/2}$ para diferentes concentraciones iniciales de $dGMP^{\cdot-}H$, dando un valor constante alrededor de 175 μs (Figura 99). Lo cual es compatible con una cinética de primer, según lo descrito por la ecuación 165. Esta reportado en literatura que la constante para la reacción química entre $dGMP^{\cdot-}H$ y O_2 es muy baja, del orden de $10^2 M^{-1} s^{-1}$ o menor [157]. Por lo tanto, debería existir una reacción para el radical $dGMP^{\cdot-}H$ independiente del O_2 (reacción 155) que explique el comportamiento de primer orden observado en experimentos resueltos en el tiempo y de irradiación continua en soluciones equilibradas con aire y en presencia de SOD (Figura 87).

11.4 ROL DEL 1O_2

Luego de haber analizado las vías de reacción probables para las especies radicalarias involucradas en el proceso, es necesario analizar el otro mecanismo en el que puede participar el sustrato, su reacción con 1O_2 . De acuerdo con los resultados presentados en la sección 11.2, bajo irradiación continua, la concentración en estado estacionario de 1O_2 producida por Ptr debería ser menor en presencia de $dGMP$, no solo debido a la desactivación del 1O_2 por $dGMP$, sino también debido a la desactivación de 3Ptr por el nucleótido. Este último efecto va a depender de la concentración de O_2 del medio. Para explorar este punto se plantearon experimentos en estado estacionario y resueltos en el tiempo en los cuales se midió la emisión de fosforescencia del 1O_2 en el NIR en soluciones de Ptr y $dGMP$ preparadas en D_2O a $pD = 5,5$ (Subsección 7.1.4).

La generación fotosensibilizada de 1O_2 por Ptr involucra la transferencia energía desde 3Ptr hacia el O_2 disuelto en el medio (reacción 147). Una vez formado y en ausencia de otra especie, el 1O_2 se relaja al estado fundamental a través de la desactivación no radiativa por choques con el solvente o por una vía radiativa emitiendo un fotón (reac-

ciones 167 y 168). En presencia del nucleótido, el 1O_2 se puede relajar por desactivación física (k_q^{dGMP} , reacción 169) y/o por una reacción química del 1O_2 con dGMP (k_r^{dGMP} , reacción 170), siendo la constante de desactivación total la suma de estos dos procesos ($k_t^{dGMP} = k_q^{dGMP} + k_r^{dGMP}$). Se ha demostrado que la componente de desactivación física casi despreciable, es decir que $k_t^{dGMP} \approx k_r^{dGMP}$ [114].



En una primera serie de experimentos se registraron los decaimientos de la emisión de fosforescencia de 1O_2 a 1270 nm en soluciones que contenían una concentración constante de Ptr (200 μ M) y concentraciones de dGMP variables entre 0 - 800 μ M. Estos experimentos se realizaron en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 . En ambas condiciones y dentro del rango de concentraciones de dGMP utilizado, todos los decaimientos siguieron a una cinética de primer orden (Figura 100) y se ajustaron con la ecuación 171, (Subsección 7.1.4).

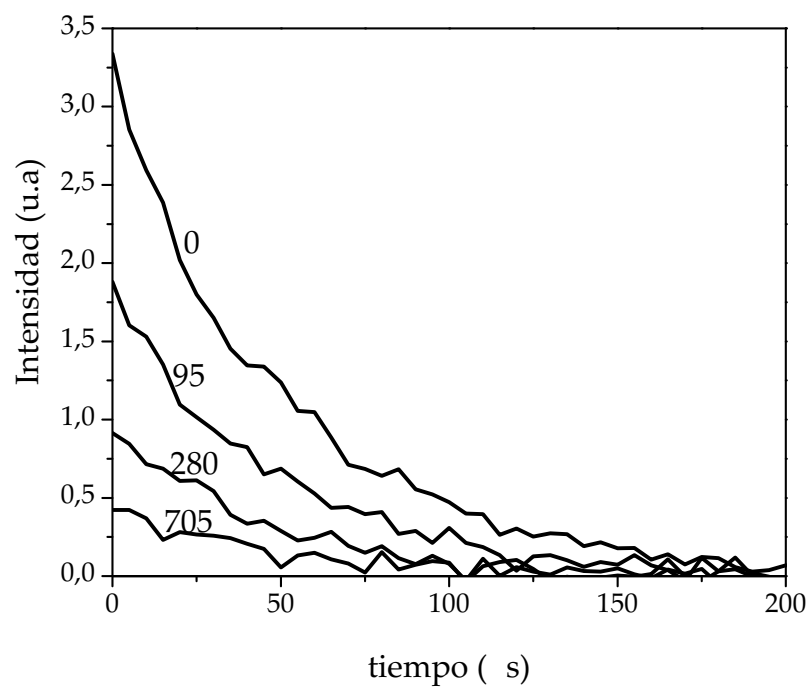
$$S_t = S_i \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (171)$$

En la Figura 100 se puede observar que, tanto S_i (proporcional a la concentración inicial de 1O_2) como τ se reducen en presencia de dGMP en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 . Con estos datos se puede calcular k_t^{dGMP} con la ecuación 172 (Sección 1.1.2).

$$\frac{1}{\tau} = k_t^{dGMP} + k_d \quad (172)$$

Los valores de k_t^{dGMP} obtenidos de los gráficos de Stern-Volmer de la Figura 101 fueron igual a $1,0 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $7,4 \pm 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para soluciones saturadas con O_2 y equilibradas con aire, respectivamente. A pesar del mayor porcentaje de error en la determinación de la k_t^{dGMP} en las soluciones equilibradas con aire debido a la baja intensidad de la señal a concentraciones mayores que 250 μ M (Figura 100), estos valores son similares, dentro del error experimental, y a su vez coinciden con el valor de k_t^{dGMP} reportado previamente ($1,7 \pm 0,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [114].

Tal como se mencionó antes, S_i decrece con el aumento de la concentración de dGMP, siendo este efecto mucho más pronunciado en soluciones equilibradas con aire con respecto a las saturadas con O_2 . Este resultado confirma que la desactivación de 3Ptr por dGMP (reacciones 148 y 149, Figura 89) compete con la transferencia de energía desde



(a) Soluciones equilibradas con aire.

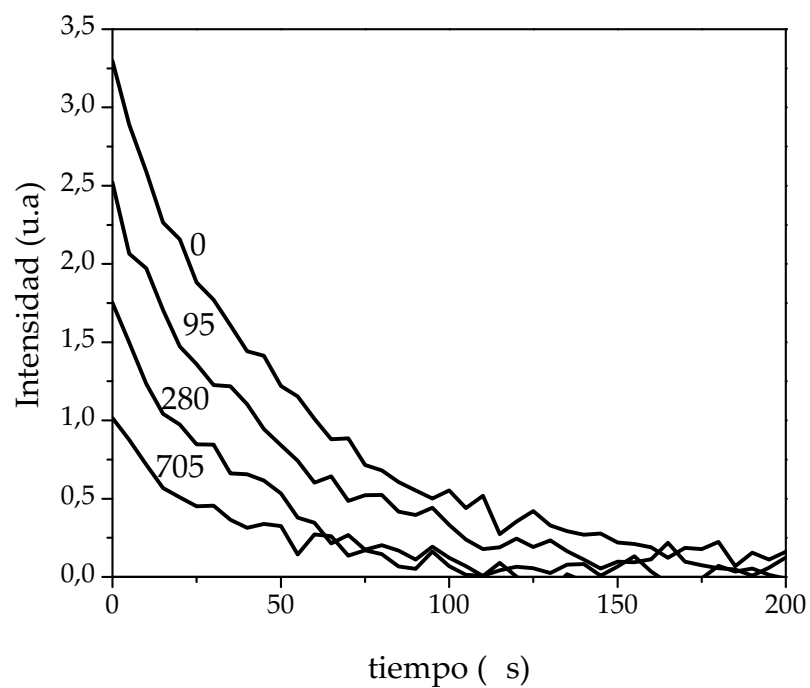
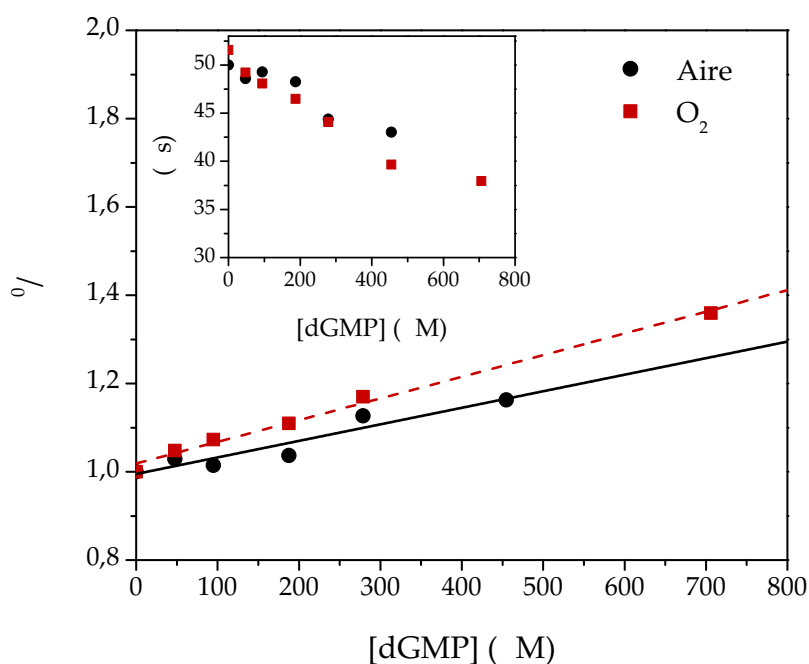
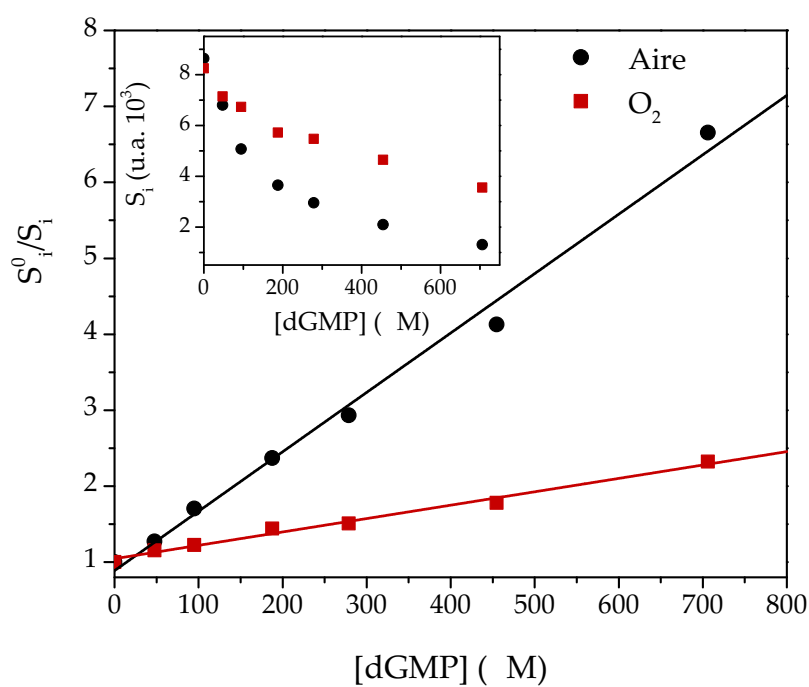
(b) Soluciones saturadas con O_2 .

Figura 100: Decaimientos de la señal de fosforescencia de 1O_2 registrados a 1270 nm en soluciones de Ptr y diferentes concentraciones *dGMP* para soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 . Experimentos realizados en D_2O , pD 5,5; *exc* 340 nm; Ptr 200 M.



(a)



(b)

Figura 101: Gráficas de Stern-Volmer: (a) para el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ (τ), calculado analizando los decaimientos de la emisión NIR del $^1\text{O}_2$ (ecuación 171) y, (b) para la concentración inicial del $^1\text{O}_2$, estimada a partir del factor pre-exponencial (S_i , ecuación 171). Experimentos realizados en D_2O , pD 5,5; λ_{exc} 340 nm; P_{tr} 200 M.

${}^3P_{tr}$ al O_2 (reacción 147). Por lo tanto, el τ_{et} en las condiciones experimentales, dependerá de la concentración de *dGMP*. Como se explicó en la subsección 7.1.4, en ausencia de *dGMP*, el τ_{et}^0 está dado por la ecuación 65. En presencia de un desactivador como *dGMP*, τ_{et} disminuye y, por ende, también lo hará τ_T . La ecuación 65 se convierte en la ecuación 173 en presencia del nucleótido.

con

$$\tau_{et} = \frac{k_{etT}^{O_2} {}^3O_2}{k_{dT} + k_{tT}^{O_2} {}^3O_2 + k_{tT}^{dGMP} dGMP} \quad (173)$$

donde τ_{et} es la eficiencia de la transferencia de energía entre el triplete del sensibilizador y el O_2 para producir 1O_2 en presencia de *dGMP*.

El cociente entre τ_{et}^0 y τ_{et} , lleva a la ecuación 174,

$$\frac{\tau_{et}^0}{\tau_{et}} = \frac{k_{dT} + k_{tT}^{O_2} {}^3O_2}{k_{dT} + k_{tT}^{O_2} {}^3O_2 + k_{tT}^{dGMP} dGMP} \quad (174)$$

donde,

$$\tau_T^0 = \frac{1}{k_{dT} + k_{tT}^{O_2} {}^3O_2} \quad (175)$$

τ_T^0 es el tiempo de vida del triplete del sensibilizador en presencia de O_2 pero en ausencia de *dGMP*. S_i es proporcional a la concentración inicial de 1O_2 al tiempo $t = 0$ y, por lo tanto, proporcional a τ_T^0 . Esto permite calcular la desactivación de ${}^3P_{tr}$ por *dGMP* analizando la variación S_i con la concentración del nucleótido (ecuación 176).

$$\frac{S_i^0}{S_i} = \frac{\tau_T^0}{\tau_T} = 1 + \frac{k_{tT}^{dGMP} dGMP}{k_{dT} + k_{tT}^{O_2} {}^3O_2} \quad (176)$$

De acuerdo con la ecuación 176, la gráfica de Stern-Volmer de $\frac{S_i^0}{S_i}$ vs. *dGMP* será lineal tanto en soluciones equilibradas con aire como saturadas con O_2 , (Figura 101 (b)). Teniendo en cuenta los valores de τ_T^0 medidos para soluciones equilibradas en aire y saturadas con O_2 (1,4 ns y 0,4 ns, respectivamente, Capítulo 8), se calculó k_{tT}^{dGMP} de las pendientes de las gráficas de Stern-Volmer de la Figura 101 (b), dando valores iguales a $5 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ y $4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ para soluciones equilibradas en aire y saturadas con O_2 , respectivamente. A su vez, estos valores son similares, dentro del error experimental, al obtenido en los experimentos de LFP en los cuales se midió τ_{T_i} para distintas concentraciones de *dGMP* (Sección 11.2). Cabe destacar en este punto de la discusión, que el valor de k_{tT}^{dGMP} resulta dos ordenes de magnitud mayor que $k_{tT}^{dGMP} = 1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, es decir, el nucleótido reacciona mucho más rápidamente con ${}^3P_{tr}$ que con 1O_2 .

En otro grupo de experimentos, se registraron los espectro de emisión de fosforescencia de 1O_2 de soluciones en D_2O (pD=5,5) que contenían una concentración de *Ptr* constante (200 nM) y diferentes concentraciones de *dGMP* (0-800 nM). Tal como se observó en

los experimentos resueltos en el tiempo (Figura 100) la presencia de $dGMP$ produjo una disminución de la intensidad de fosforescencia del 1O_2 , sin modificación del máximo de emisión (Figura 102). Nuevamente, la disminución en la intensidad de la emisión fue mucho más pronunciada en las soluciones equilibradas en aire con respecto a las saturadas con O_2 . Este comportamiento es esperado teniendo en cuenta la competencia entre el O_2 y $dGMP$ por 3Ptr (reacciones 147 a 149) y está de acuerdo con los resultados presentados en la Figura 101 (b).

Bajo irradiación continua, la intensidad de emisión de fosforescencia (I_p) determinada como la integral bajo la curva del espectro de fosforescencia, es proporcional a la concentración de 1O_2 en estado estacionario ($^1O_{2\ ss}$). Teniendo en cuenta las reacciones involucradas en la producción (reacciones 142, 143 y 147) y desactivación del 1O_2 (reacciones 167 a 170) y aplicando la hipótesis de estado estacionario para las concentraciones de estados excitados, $^1O_{2\ ss}^0$ en ausencia y en presencia de $dGMP$ ($^1O_{2\ ss}$) puede ser expresado con las ecuaciones 74 y 73 deducidas en la subsección 7.1.4.

En un solvente dado y a una concentración constante de sensibilizador, es decir, a flujo de fotones absorbidos por Ptr constante, el análisis de Stern-Volmer para la desactivación de I_p por $dGMP$ conduce a la ecuación 177 que se deduce de la combinación de las ecuaciones 172 y 176,

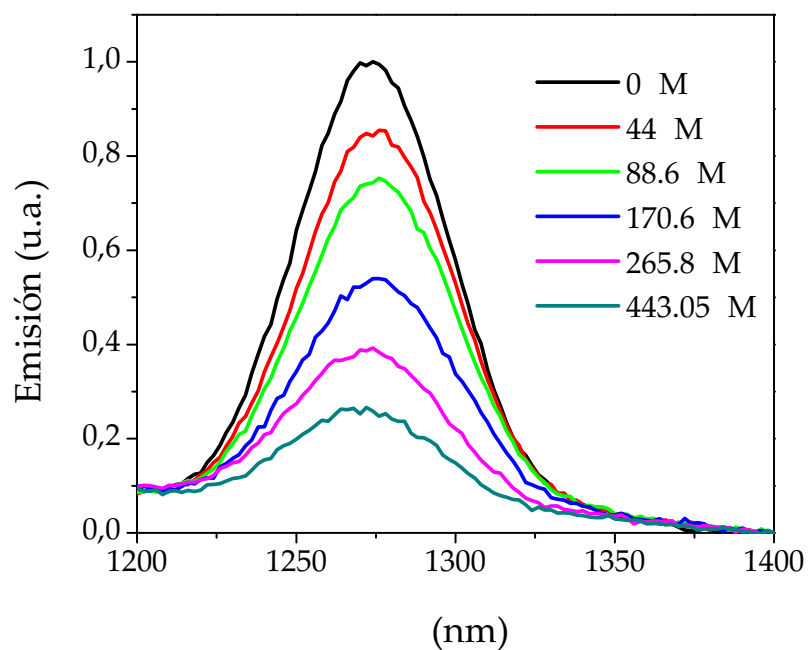
$$\frac{I_p^0}{I_p} = \frac{{}^1O_{2\ ss}^0}{{}^1O_{2\ ss}} = \frac{0}{1} + \frac{0}{1} \frac{{}^0k_t^{dGMP} dGMP}{{}^0k_t^{dGMP} dGMP + 1} \quad (177)$$

donde el superíndice "0" refiere a los valores correspondientes en ausencia de $dGMP$ en soluciones equilibradas en aire o saturadas con O_2 . En vista a los valores obtenidos para los tiempos de vida y constantes de desactivación, está claro que la desactivación total de la emisión del 1O_2 va a estar gobernada por la desactivación de 3Ptr por $dGMP$ y no por la desactivación del 1O_2 por dicha especie, es decir, ${}^0k_t^{dGMP} > {}^0k_t^{dGMP}$. Por lo tanto, una gráfica de I_p^0/I_p vs. $dGMP$ será prácticamente lineal (Figura 103) con una pendiente cercana al valor de ${}^0k_t^{dGMP}$, es decir, similar a las pendientes calculadas en la Figura 172. Por último, los valores de I_p^0/I_p calculados aplicando la ecuación 177 son muy similares a los obtenidos experimentalmente.

11.5 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE REACCIÓN QUÍMICA ENTRE 3Ptr Y $dGMP$

Teniendo en cuenta la vía de formación y las de desactivación de 3Ptr en presencia de O_2 y $dGMP$ (reacciones 142 a 149) y aplicando la hipótesis de estado estacionario para las concentraciones de estados excitados se obtiene la ecuación 178.

$$q_p^V = T k_{d_T} {}^3Ptr_{ss}$$



(a) Soluciones equilibradas con aire.

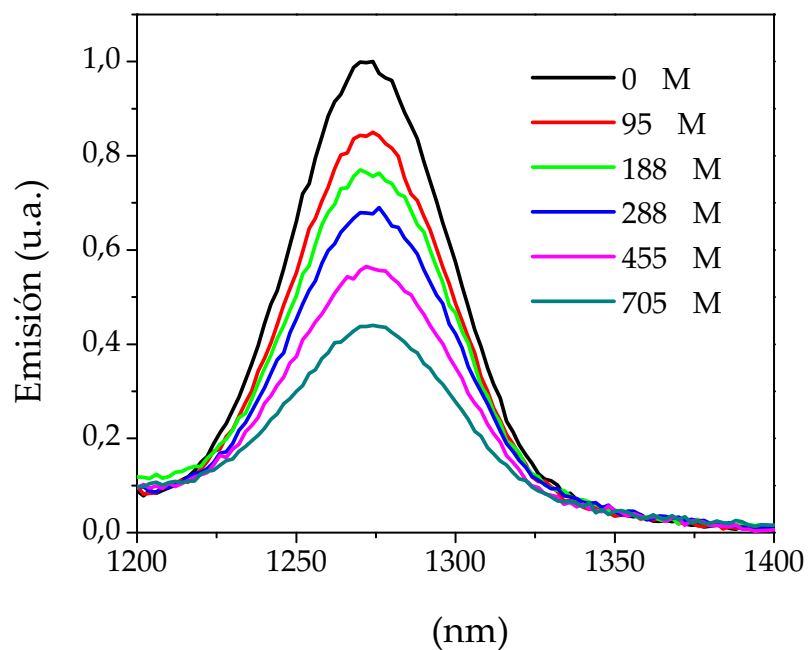
(b) Soluciones saturadas con O_2 .

Figura 102: Espectros de emisión de fosforescencia de 1O_2 registrados en soluciones de Ptr sin y con el agregado de diferentes concentraciones de *dGMP*. Soluciones de Ptr y *dGMP* equilibradas con aire y saturadas en O_2 . Experimentos realizados en D_2O , pD 5,5; exc 340 nm; Ptr 200 M.

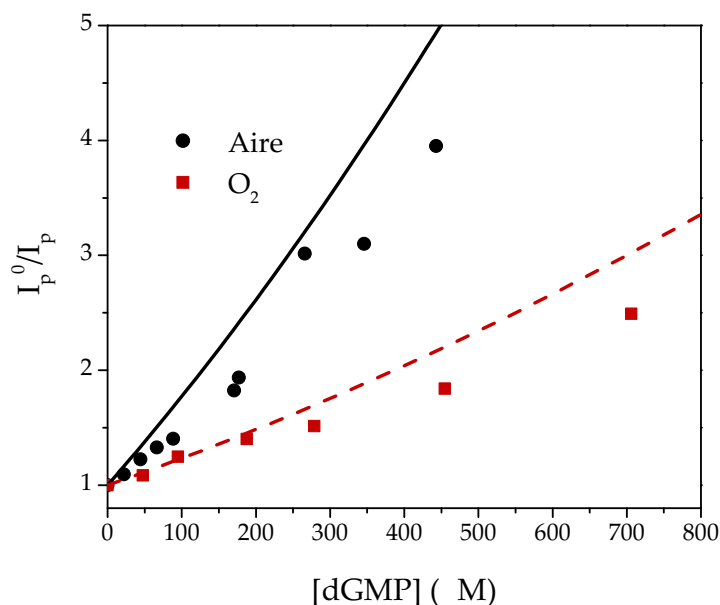


Figura 103: Gráfica de Stern-Volmer para la desactivación de la intensidad de fosforescencia de 1O_2 por dGMP. Puntos: valores obtenidos experimentalmente para soluciones equilibradas en aire y saturadas con O_2 . Líneas: representan los valores de I_p^0/I_p calculados con la ecuación 177 utilizando los valores estimados para tiempos de vida y constantes de desactivación bimolecular. Experimentos realizados en D_2O , pD 5,5, λ_{exc} 340 nm; $[Ptr] = 200$ M.

$$k_{qT}^{O_2} \text{ } ^3Ptr_{ss} \text{ } O_2 = k_{tT}^{dGMP} \text{ } ^3Ptr_{ss} \text{ } dGMP \quad (178)$$

A partir de la ecuación 178 se puede obtener una expresión para la concentración de 3Ptr en una solución de Ptr irradiada en forma estacionaria en distintas condiciones experimentales (intensidad de radiación, concentraciones de Ptr, O_2 o dGMP).

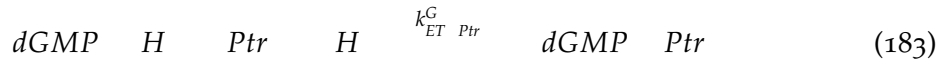
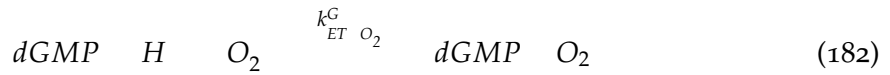
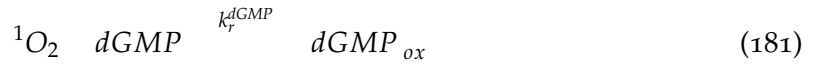
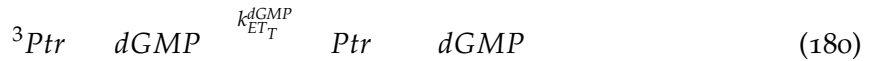
$$q_{p,T}^V = k_{dT} + k_{qT}^{O_2} \text{ } ^3Ptr_{ss} + k_{tT}^{dGMP} \text{ } ^3Ptr_{ss} \text{ } dGMP$$

$$q_{p,T}^V = \frac{1}{T} \text{ } ^3Ptr_{ss} + k_{tT}^{dGMP} \text{ } ^3Ptr_{ss} \text{ } dGMP$$

$$\text{ } ^3Ptr_{ss} = \frac{q_{p,T}^V}{\frac{1}{T} + k_{tT}^{dGMP} \text{ } dGMP} \quad (179)$$

Se puede calcular la concentración de 3Ptr en estado estacionario ($^3Ptr_{ss}$) aplicando la ecuación 179, donde $\frac{1}{T}$ es el tiempo de vida de 3Ptr a una determinada concentración de O_2 .

De todas las reacciones que se han presentado hasta ahora existen dos que producen consumo de dGMP (reacciones 180 y 181) y dos que regeneran el nucleótido (reacciones 182 y 183)



Por lo tanto, bajo irradiación continua la velocidad inicial de consumo de *dGMP* medida experimentalmente ($\frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{exp}$) se puede expresar con la ecuación 184.

$$\begin{aligned} \frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{exp} &= k_{ET}^{dGMP} {}^3\text{Ptr}_{ss} d\text{GMP} + k_r^{dGMP} {}^1\text{O}_2_{ss} d\text{GMP} \\ &+ k_{ET}^G \text{O}_2 \text{O}_2_{ss} d\text{GMP} + \text{H} \\ &+ k_{ET}^G \text{Ptr} \text{Ptr} d\text{GMP} + \text{H} + \text{H} \end{aligned} \quad (184)$$

Se realizaron experimentos de fotosensibilización irradiando en forma estacionaria soluciones que contenían *Ptr* (100-120 μM) y dos concentraciones iniciales de *dGMP* (10 μM y 1,55 mM) en presencia de SOD (50 U/ml) y se cuantificó el consumo del nucleótido por HPLC. Se calcularon los valores de $\frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{exp}$ a partir de las pendientes de la primera parte de los perfiles de concentración (Figura 104). En estas condiciones experimentales la reacción 182 se elimina por la presencia de SOD. Por otro lado, la reacción 181 se puede despreciar dado que $k_r^{dGMP} \ll k_{tT}^{dGMP}$, sin embargo, se puede calcular el aporte de la reacción de *dGMP* con ${}^1\text{O}_2$ ($\frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{calc}$) aplicando la ecuación 114 (Subsección 7.1.4). La reacción de recombinación de radicales se elimina en presencia de O_2 , ya que el radical *Ptr* y en general el radical anión de las moléculas orgánicas reacciona de forma muy eficiente con esta especie para formar el anión superóxido (O_2^-) [145, 146] (reacción 150). Por lo tanto, la ecuación 184 se reduce a (ecuación 185), y reemplazando la ${}^3\text{Ptr}_{ss}$ por la expresión deducida anteriormente (ecuación 179), se obtiene la ecuación 186 para el cálculo de $\frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{exp}$.

$$\frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{exp} = k_{ET}^{dGMP} {}^3\text{Ptr}_{ss} d\text{GMP} + \frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{calc} \quad (185)$$

$$k_{ET}^{dGMP} \frac{q_p^V}{\frac{1}{\text{O}_2} T} \frac{1}{k_{tT}^{dGMP} d\text{GMP}} d\text{GMP} + \frac{d\text{GMP}}{t} \Big|_0^{calc} \quad (186)$$

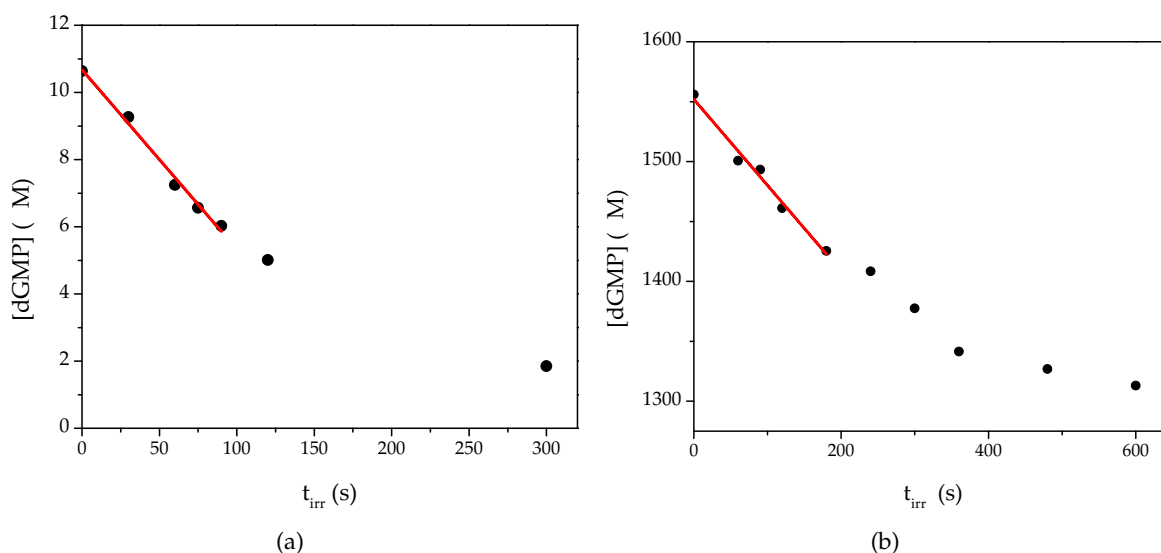


Figura 104: Evolución de la concentración de $dGMP$ con el tiempo de irradiación para soluciones de Ptr y $dGMP$. Experimentos realizados con soluciones equilibradas con aire en presencia de SOD . (a) $dGMP_0 = 11 M$, $Ptr_0 = 120 M$; (b) $dGMP_0 = 1555 M$, $Ptr_0 = 100 M$, $SOD = 50 U/ml$, $pH = 5.5$.

Para la concentración de $dGMP$ más baja utilizada en el experimento de la Figura 104 (a), se puede considerar que, $k_{t_T}^{dGMP} \frac{dGMP}{t} = \frac{1}{\tau_{O_2}} q_{p,T}^V$ por lo cual, $^3Ptr_{ss} = q_{p,T}^V \tau_{O_2}$. De esta manera, conociendo la velocidad de consumo de $dGMP$ en dichas condiciones, se puede calcular $k_{ET_T}^{dGMP}$ aplicando la ecuación 187.

$$k_{ET_T}^{dGMP} = \frac{\left(\frac{dGMP}{t}\right)_{exp}}{\left(\frac{dGMP}{t}\right)_{calc}} = \frac{1}{q_{p,T}^V \tau_{O_2} \frac{O_2}{dGMP}} \quad (187)$$

El valor de τ_{O_2} no se determinó experimentalmente pero se puede aproximar al valor de τ_{O_2} , dado que en trabajos previos se determinó este parámetro en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 y resultó ser prácticamente igual en ambas condiciones; el valor de $q_{p,T}^V$ se determinó realizando una actinometría (Sección 5.6) y τ_{O_2} se determinó en los experimentos de LFP (Subsección 8.1.3). Reemplazando todos los valores correspondientes al experimento de la Figura 104 (a), se obtuvo un valor para $k_{ET_T}^{dGMP}$ de $1,6 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$ que corresponde a un valor del orden difusional.

Por otro lado, a concentraciones de $dGMP$ altas, $k_{t_T}^{dGMP} \frac{dGMP}{t} = \frac{1}{\tau_{O_2}}$ y la formación de 1O_2 es prácticamente nula debido a la desactivación de 3Ptr por $dGMP$ (Sección 11.4). Por lo tanto, en las condiciones experimentales de la Figura 104 (b) la expresión para calcular $k_{ET_T}^{dGMP}$ se reduce a la ecuación 188. La cual arrojó un valor de $k_{ET_T}^{dGMP} = 1,3 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$ igual, dentro del error experimental, al calculado para el experimento a baja concentración de $dGMP$.

$$k_{ET_T}^{dGMP} = \frac{\left(\frac{dGMP}{t}\right)_{exp}}{\left(\frac{dGMP}{t}\right)_{calc}} = \frac{k_{t_T}^{dGMP}}{q_{p,T}^V} \quad (188)$$

La desactivación de 3Ptr por *dGMP* se puede dividir esquemáticamente en dos procesos diferentes. Uno químico que produce la oxidación del nucleótido (reacción 180) y otro físico en el cual la molécula de *dGMP* permanece inalterada (reacción 189).



La constante de desactivación calculada por LFP (Sección 11.2) evalúa la desactivación total resultado de la suma de los dos procesos ($k_{tT}^{dGMP} + k_{ET}^{dGMP} + k_{qT}^{dGMP}$). Por consiguiente, comparando los valores de k_{ET}^{dGMP} con los de k_{tT}^{dGMP} se concluye que solo alrededor del 30% de la desactivación de 3Ptr por *dGMP* corresponde al proceso de transferencia electrónica.

11.6 ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES IRRADIADAS POR UPLC-MS

Con el objeto de investigar los productos de la reacción fotosensibilizada, se realizó un estudio empleando la técnica UPLC, acoplada a espectrometría de masa por ionización *electrospray* (UPLC-MS) (Sección 6.3). En este estudio se registraron y compararon los cromatogramas obtenidos en soluciones equilibradas con aire irradiadas y no irradiadas de *dGMP* y *Ptr*. Por otro lado, el equipo tiene acoplado dos detectores, un detector PDA y un segundo detector MS en tándem que ayuda a la identificación de los productos. Con este equipo se registraron los espectros de masas (espectros MS) y masas en tándem (MS/MS) obtenidos por ionización *electrospray* en modo iónico positivo (*ESI*⁺) y modo iónico negativo (*ESI*⁻).

11.6.1 Investigación de los productos de reacción por UPLC-MS

La Figura 105 muestra los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de *Ptr* y *dGMP* equilibradas con aire en medio ácido (pH 5,5) sin irradiar y luego de 10 min de irradiación, utilizando el detector PDA acoplado al UPLC y fijo a 250 nm como λ_{ana} . La Figura 105 (a) correspondiente a la mezcla sin irradiar muestra dos picos, con $t_r = 2,4$ min y $t_r = 2,6$ min, los cuales son asignados a *Ptr* y *dGMP*, respectivamente. Nótese que los t_r difieren de aquellos registrados en los cromatogramas realizados con el equipo HPLC-PDA, lo cual es lógico dado que, como se explicó anteriormente, el equipo, la columna, y el flujo de la corrida cromatográfica son diferentes. En la Figura 105 (b) se muestra el cromatograma obtenido a partir de la muestra de *Ptr* y *dGMP* irradiada durante 10 min, donde se observa una disminución significativa del área del pico correspondiente a *dGMP* y la aparición de varios picos que se podrían asignar a los productos de la reacción fotosensibilizada, dado que la *Ptr* no se consume durante la reacción. El grupo de picos que eluyen con t_r menores al de *dGMP*, es una mezcla de varios productos mientras que el pico con $t_r = 3,4$ min correspondería a un único producto, cuya pureza se determinó

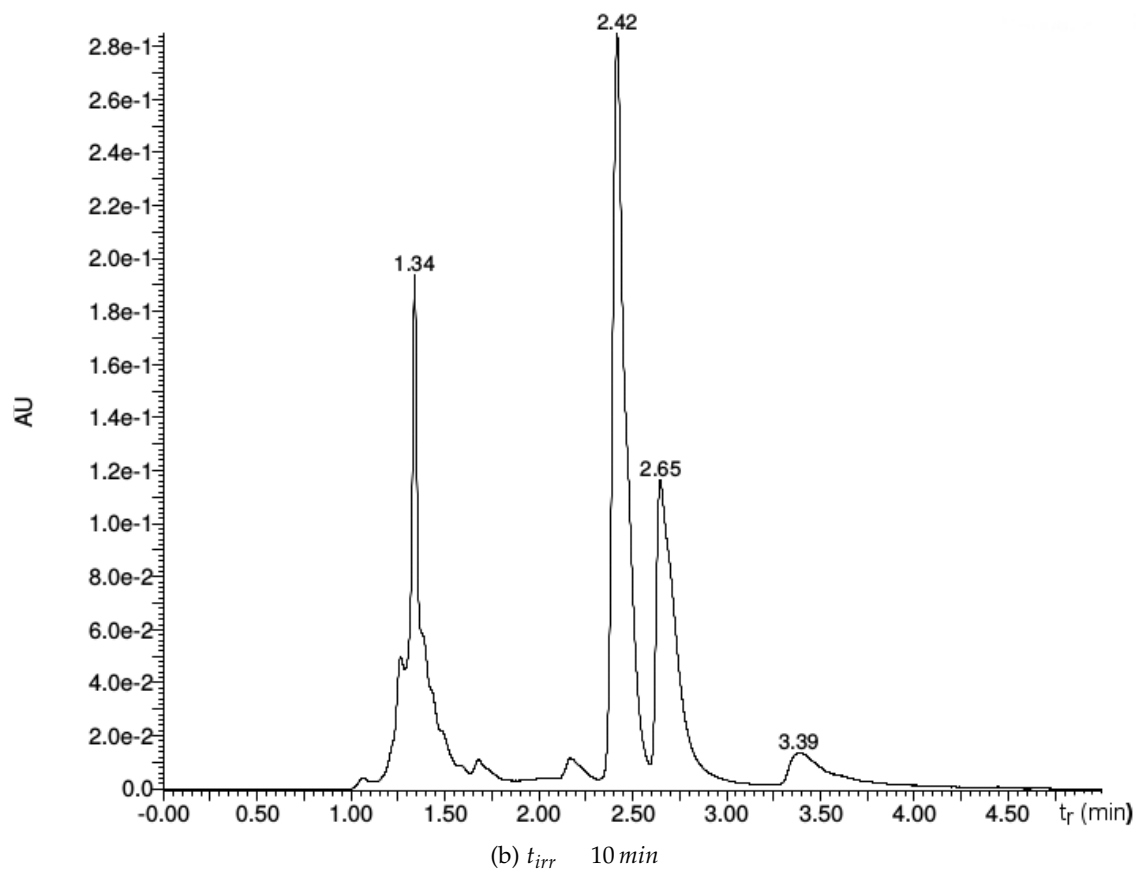
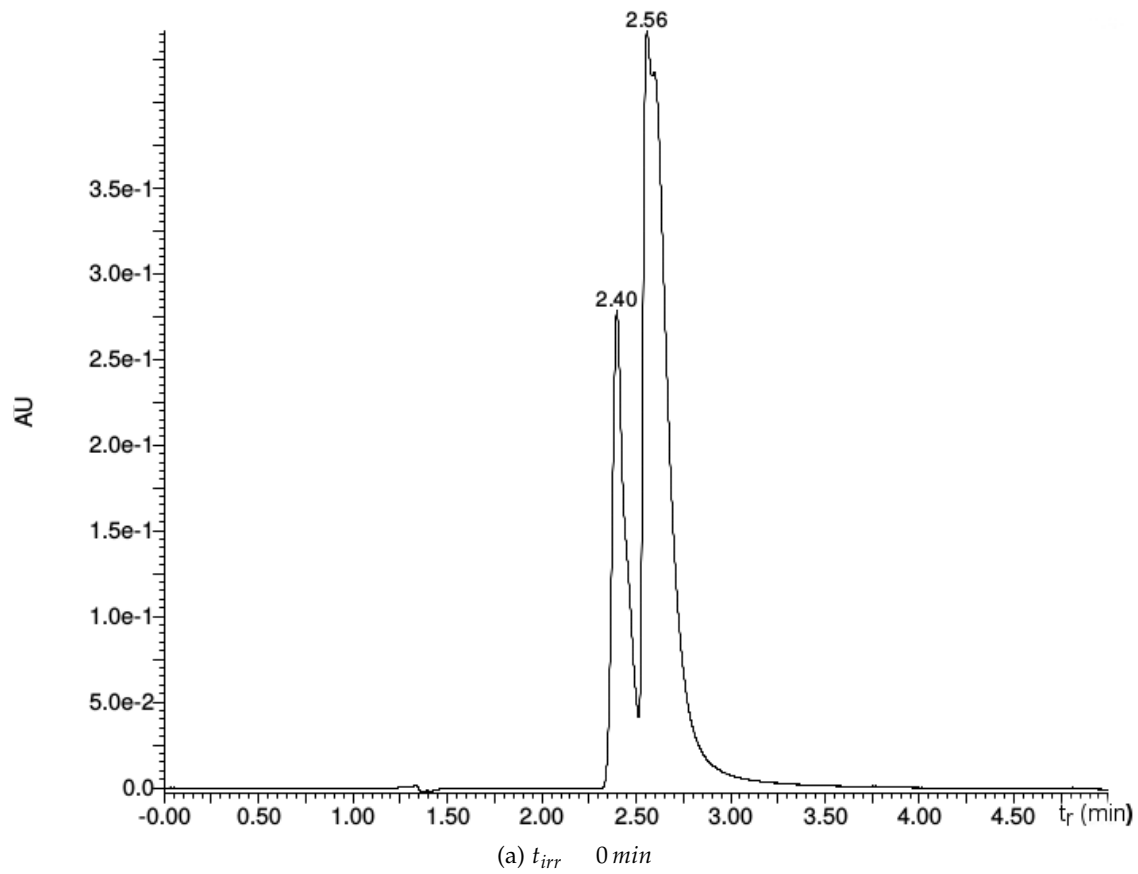


Figura 105: Cromatogramas registrados a diferentes tiempos de irradiación para soluciones equilibradas en aire de dGMP y de Ptr . $\lambda_{ana} = 250$ nm; $dGMP_0 = 300$ M; $Ptr_0 = 150$ M.

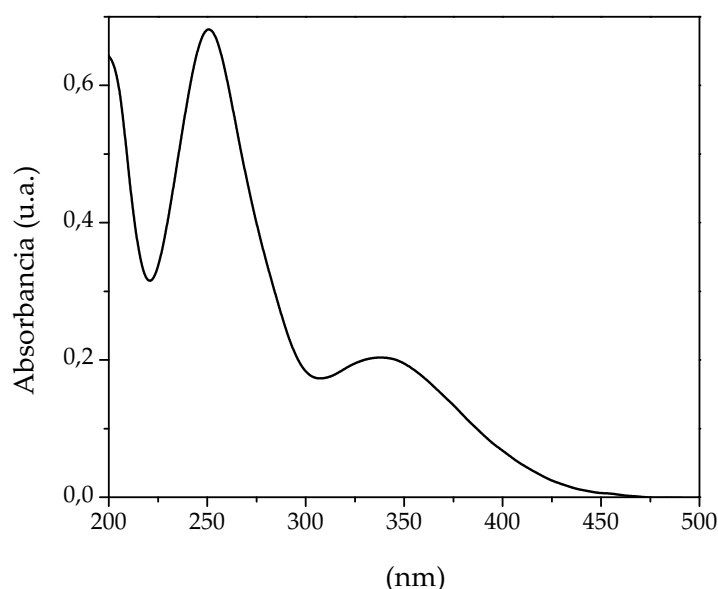


Figura 106: Espectro de absorción del producto con $t_r = 3,4$ minutos extraído un cromatograma registrado con una solución de Ptr y *dGMP* luego de 10 min de irradiación.

considerando que el espectro de absorción no se modifica a lo largo del tiempo en el que eluye el compuesto [Figura 106](#).

En la [Figura 107](#) se presentan los espectros MS *ESI* de los picos observados en los cromatogramas para la solución sin irradiar. En el pico de $t_r = 2,4$ min, se detectó el ion molecular intacto de Ptr ($M^+H = \text{Ptr}^+H$) a $m/z = 164,0565$ Da y además el ion molecular más K ($M^+K = \text{Ptr}^+K$) a $m/z = 202,0129$ Da). Con respecto al pico con $t_r = 2,6$ min, en el espectro MS se detectó el ion molecular intacto de *dGMP* ($M^+H = \text{dGMP}^+H$) a $m/z = 348,0707$ Da y además el ion molecular formando un aducto con K ($M^+K = \text{dGMP}^+K$) a $m/z = 386,01787$ Da.

Haciendo un análisis similar pero utilizando las soluciones irradiadas, se determinaron cinco productos con t_r menores que *dGMP*. De los cromatogramas se extrajeron los espectros MS correspondientes a cada uno de los t_r ([Figura 141](#)) y la [Tabla 16](#) resume los valores de m/z para cada producto. Por razones de simplicidad se nombraron los diferentes productos haciendo referencia a su peso molecular. En los espectros se detectaron los iones moleculares de cada producto y el correspondiente aducto con K para algunos de ellos. Se puede apreciar que la intensidad de los picos son muy variables, esto depende de varios factores, principalmente de la concentración y de la facilidad con la que la especie se ioniza.

Con el equipo UPLC-MS además de registrar los espectros MS de los compuestos, se puede utilizar este detector para registrar los cromatogramas en modo MS. Éstos serán una representación gráfica de la intensidad producida por los iones que llegan al detector, de un determinado valor de m/z , en función del tiempo de retención. En la [Figura 109](#) se muestran los cromatogramas en modo MS para cada producto de una solución de Ptr y *dTMP* equilibrada con aire luego de 10 minutos de irradiación. Todos los cromatogramas,

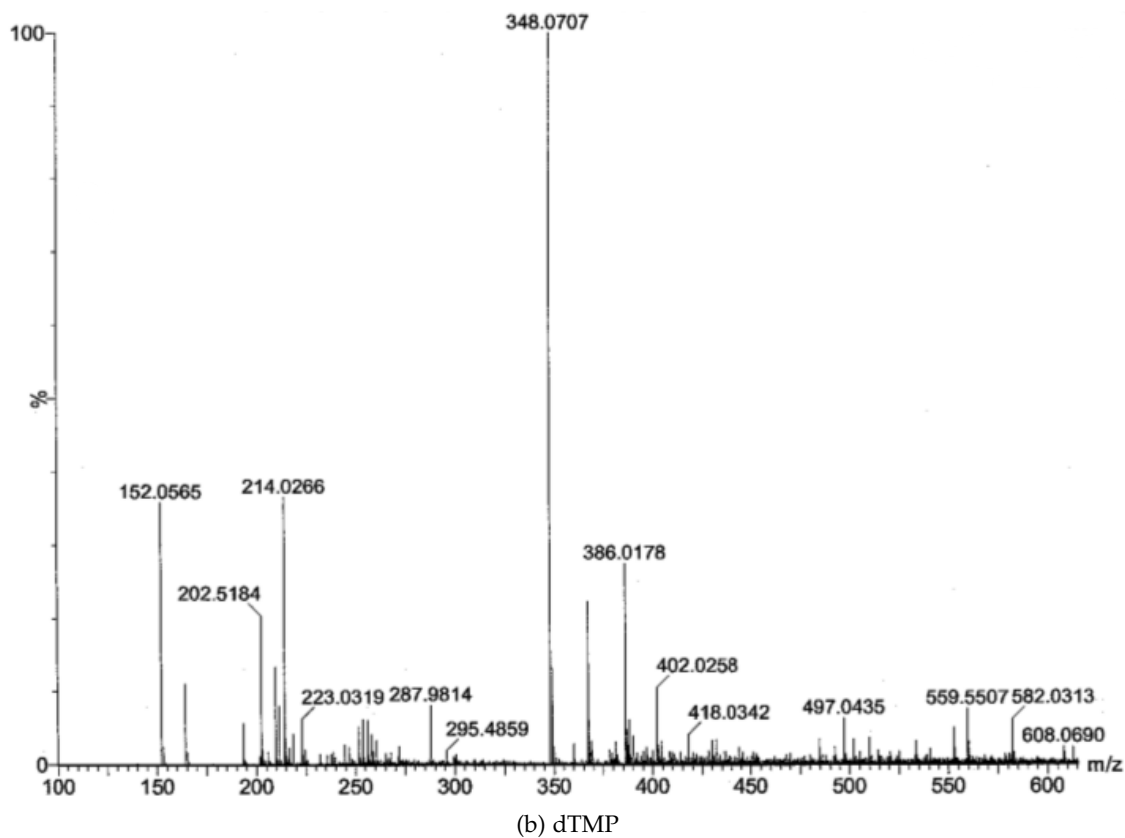
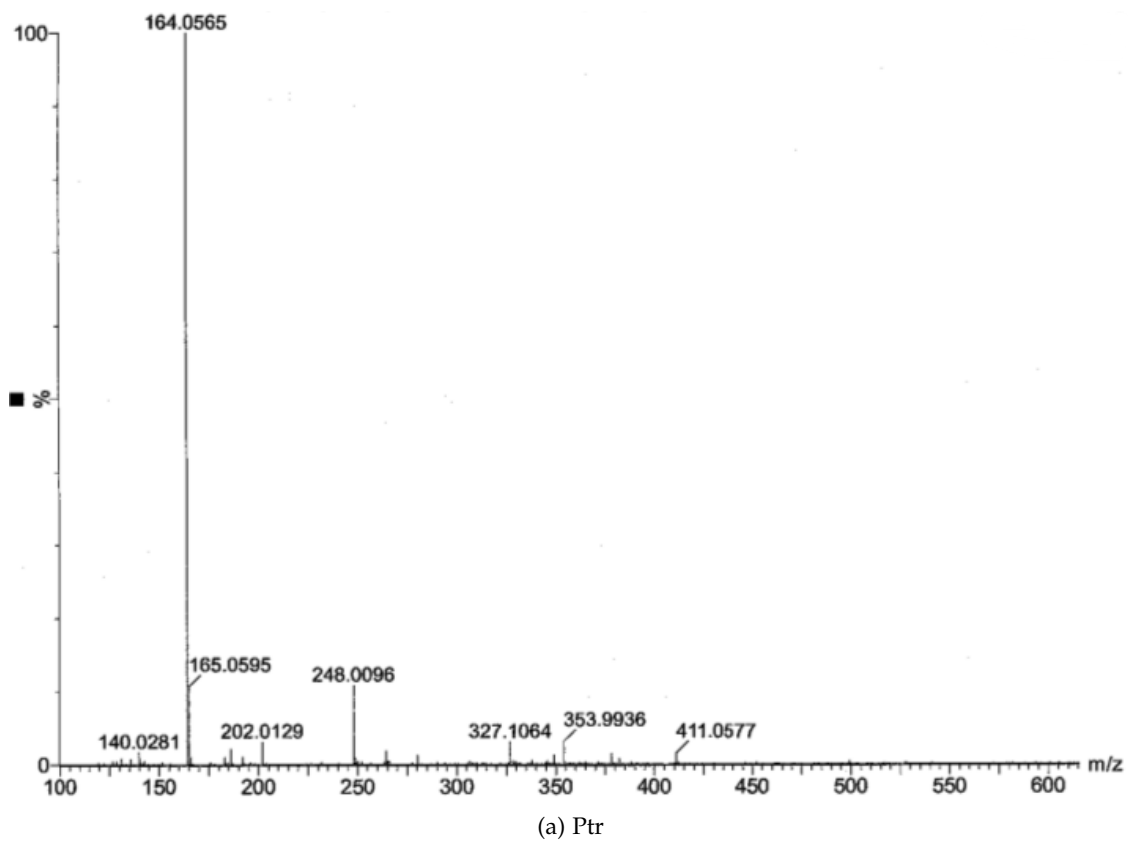


Figura 107: Espectros MS ESI de los picos con t_r 2,4 min y 2,6 min correspondiente a Ptr y dGMP, registrados en soluciones de dGMP y Ptr equilibradas en aire sin irradiar.

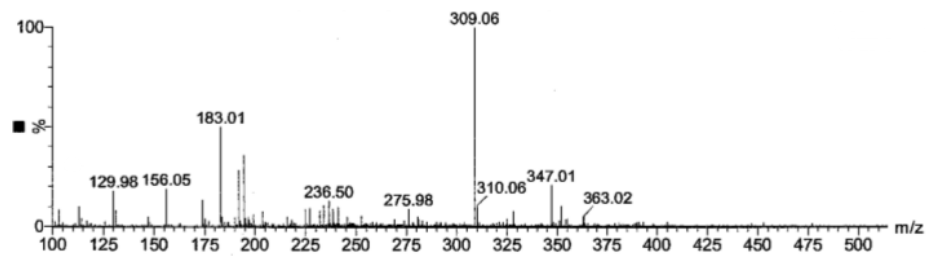
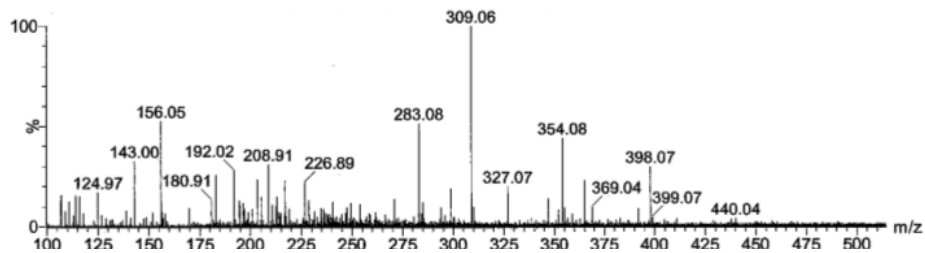
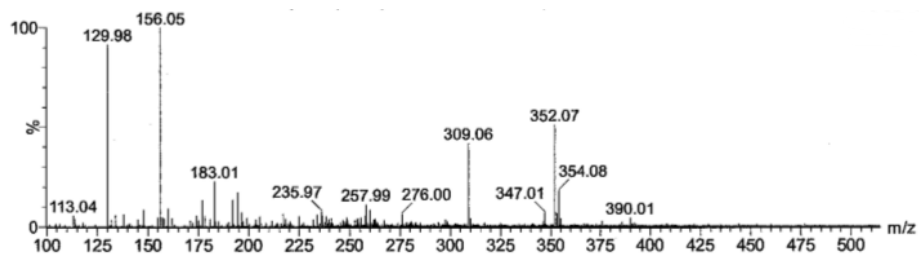
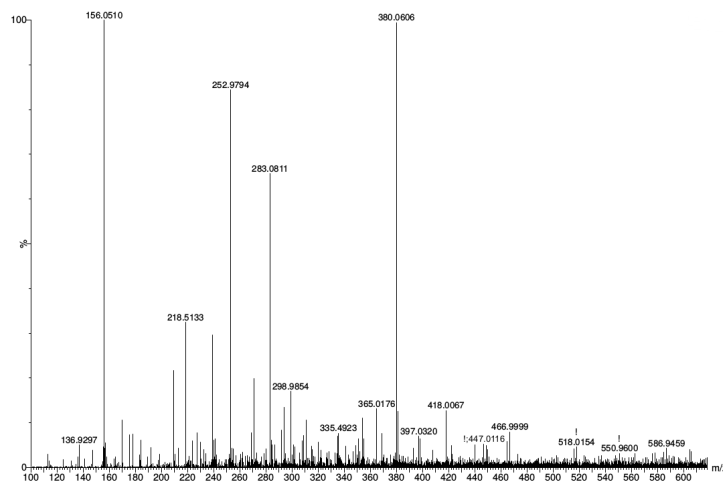
(a) $t_r = 1,4$ min(b) $t_r = 1,5$ min(c) $t_r = 1,2$ min(d) $t_r = 1,6$ min

Figura 108: Espectros MS ESI extraídos de los picos de los cromatogramas a los correspondientes t_r . Registrados en soluciones de *dGMP* y Ptr equilibradas con aire luego de 10 min de irradiación. $dGMP_0 = 200$ M; $Ptr_0 = 150$ M.

PRODUCTO	ION MOLECULAR	ADUCTO CON K
	m/z (Da)	m/z (Da)
P_{308}	309,06	347,01
P_{326}	327,07	-
P_{351}	352,07	309,01
P_{353}	354,08	-
P_{379}	380,06	418,01

Tabla 16: Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP inducida por Ptr en presencia de O_2 .

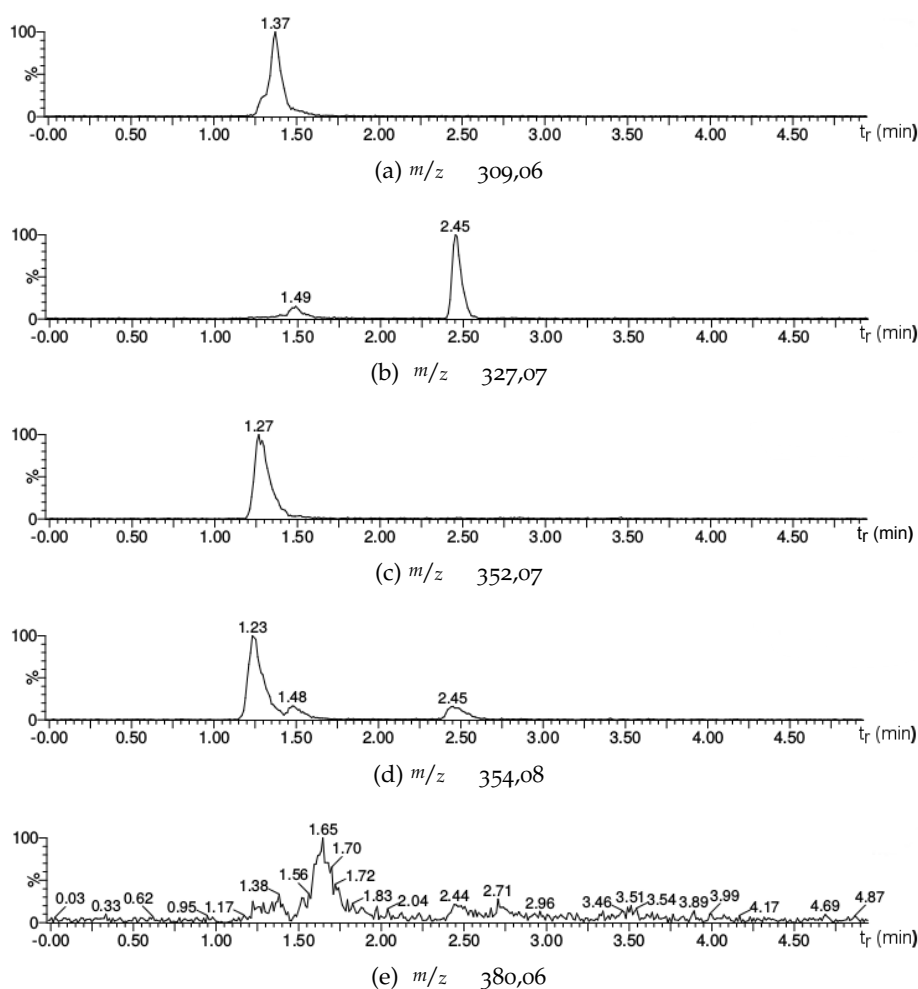


Figura 109: Cromatogramas registrados con el detector MS de una solución equilibrada en aire de Ptr y dGMP luego de 10 min de irradiación. Con m/z fijo en el valor correspondiente a cada producto. $dGMP_0=300$ M; $Ptr_0=150$ M.

excepto para los valores de m/z 354,08 y 327,07, mostraron un único pico, lo cual implica que se forma un solo producto con ese peso molecular. En el caso particular de $m/z = 327,07$ se observaron dos picos, entre $t_r = 1,49$ min y $t_r = 2,45$ min. Este último corresponde al valor de t_r de Ptr. Además el valor de $m/z = 327,07$ corresponde a un dímero de Ptr ($2Ptr - H$). Finalmente, este pico también se observa en los cromatogramas registrados con soluciones sin irradiación. Por lo tanto, el pico de $t_r = 2,45$ min no corresponde a un producto de reacción, sino a un dímero de Ptr que se forma durante la ionización. Por otro lado, para el valor de m/z 354,08 se observaron varios picos, por lo tanto existe más de un producto con el mismo peso molecular ya que no se observan en los cromatogramas de las soluciones no irradiadas. Todos los valores de m/z detectados para cada producto coinciden con pesos moleculares de productos de reacciones de fotosensibilización de nucleósidos de guanina reportado en la literatura (Sección 2.4). Sin embargo, la identificación de los productos se discutirá en la siguiente subsección. Por último, en este mismo experimento se intentó encontrar evidencia de la formación de 8-oxodGMP, uno de los productos más conocidos de las reacciones fotosensibilizadas del nucleótido. A partir de la estructura química se calculó el valor de $m/z = 364,066$ correspondiente a 8-oxodGMP, luego se buscó ese valor de m/z en los cromatogramas de las soluciones irradiadas y no se encontró ningún pico con dicho valor.

Para el producto con $t_r = 3,4$ min, el cual se denominará P_{680} , a pesar de ver un pico intenso con el detecto PDA, en las condiciones de trabajo utilizadas no se pudo registrar el espectro MS. Por lo tanto, se realizaron nuevos experimentos de irradiación estacionaria utilizando concentraciones mayores del nucleótido (800 μ M) y aumentando el tiempo de irradiación a 60 min, en estas condiciones se registraron los espectros MS en modo *ESI* y *ESI* (Figura 110). En ambos modos se detectaron varios picos con valores de m/z mucho mayores que el de *dGMP* y de cualquiera de sus productos detectados previamente. Dado que en *ESI* se visualiza una señal importante a $m/z = 679,10$ Da y se corresponde con una señal pequeña en *ESI* a $m/z = 681,12$ Da, se podría pensar en la formación de un producto dimérico con peso molecular igual a 680 Da, y que durante la ionización se fragmenta generando los iones de menor peso. En los espectros MS de compuestos con peso molecular mayor a 500 Da es común observar iones con más de una carga. En este caso, la señal que se observa a $m/z = 339,05$ Da corresponde al ion $M - 2H^+$, lo cual confirma que la señal corresponde a P_{680} dicargado y no a otro producto. La señal de $m/z = 717,05$ Da corresponde a P_{680} que intercambió un K antes de la ionización ($M - K - 2H^+$). Con respecto al espectro MS *ESI*, se observa una señal muy pequeña a $m/z = 681,12$ Da correspondiente a $M - H^+$ y una segunda señal a $m/z = 703,03$ Da correspondiente a $M - Na^+$. P_{680} se fragmenta con mayor facilidad en modo positivo dando como señal principal un ion a $m/z = 289,09$ Da. En este caso, no se encontraron antecedentes en la literatura de ningún producto con un peso molecular tan alto para reacciones fotosensibilizadas de *dGMP* libre.

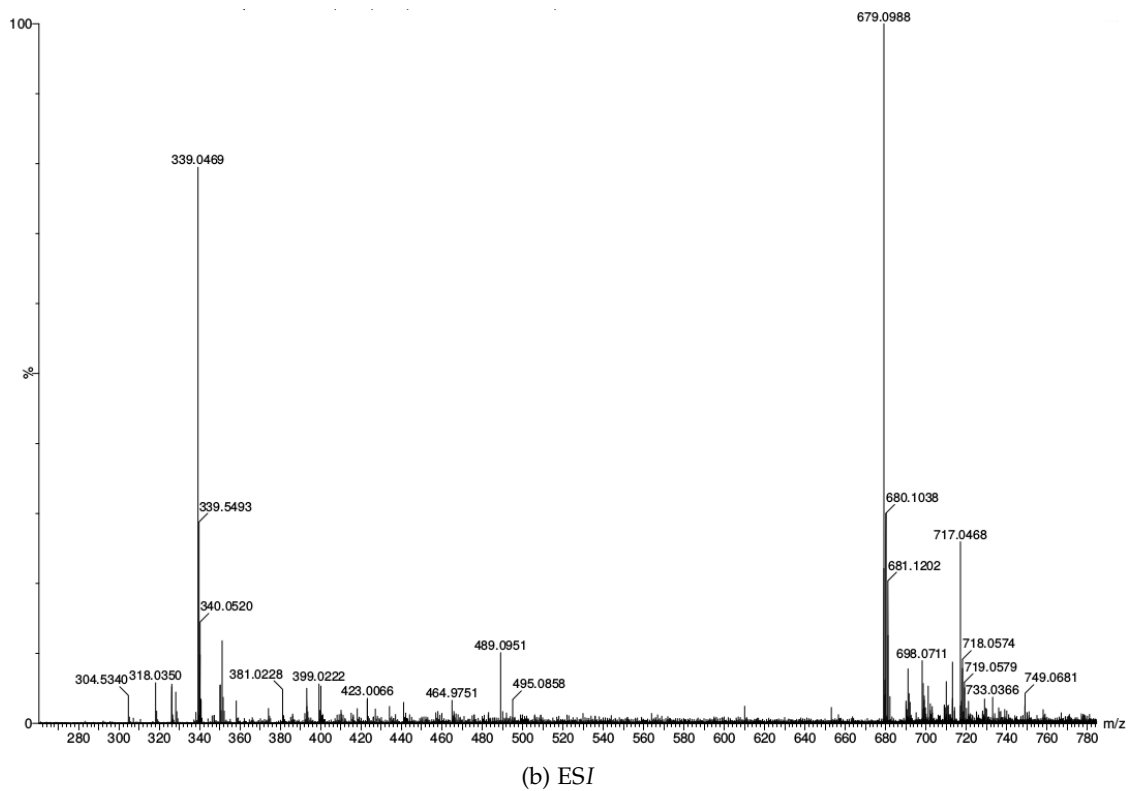
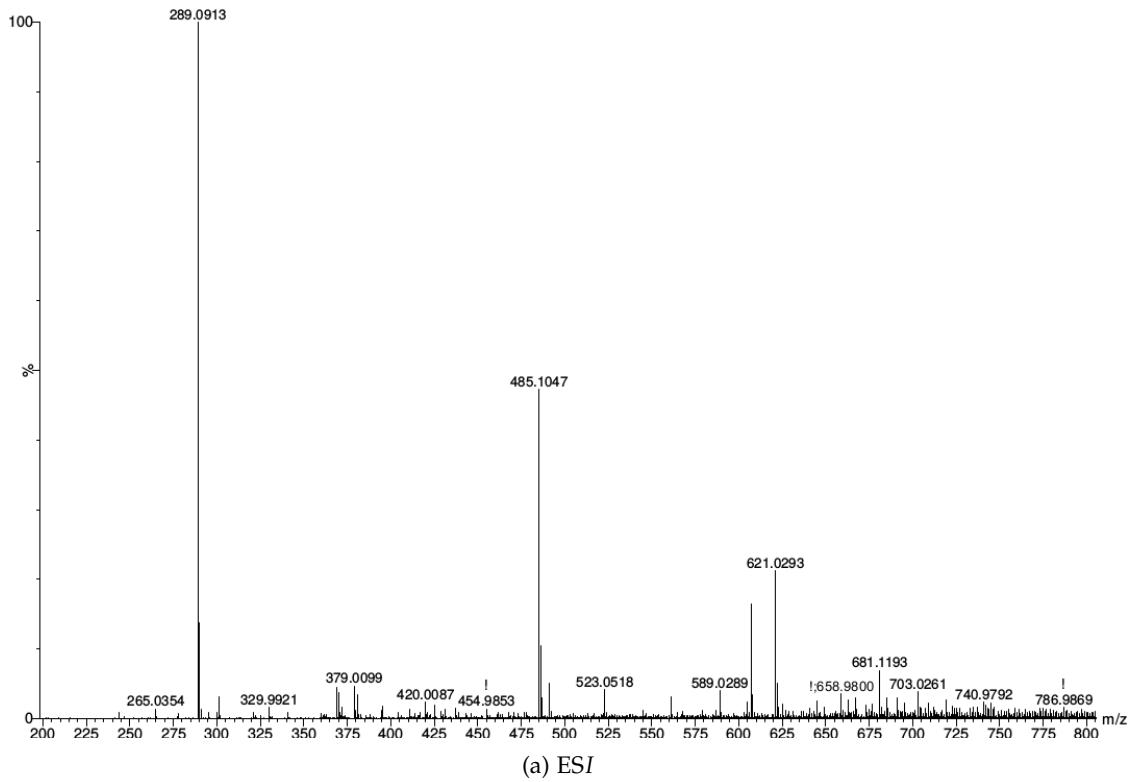


Figura 110: Espectros MS ESI y ESI extraídos del pico correspondiente al producto con $t_r=3,4$ min. Soluciones de dGMP y Ptr equilibradas con aire, irradiada durante 60 min. $dGMP_0=740$ M; $Ptr_0=150$ M.

Figura 111: Espectro MS/MS ESI para el ion con m/z 348,07 Da correspondiente al ion molecular de *dGMP*, registrado en una solución equilibrada con aire de Ptr y *dGMP* sin irradiar. Estructura química y fragmentación de *dGMP*. $dGMP_0=200$ M; $Ptr_0=150$ M.

11.6.2 Identificación de los productos por UPLC-MS/MS

En primer lugar, se registró el espectro MS/MS de *dGMP* para identificar las señales que provienen de la fragmentación de dicho compuesto (Figura 111). Allí se observó el patrón de fragmentación típico para *dGMP*. La señal intensa a m/z 152,06 Da corresponde a la ruptura del enlace enlace N-glucosídico para dar a la base nitrogenada más un protón, el fragmento restante, correspondiente a la desoxiribosa monofosfato, no se detectó en modo positivo.

Con una solución de Ptr y *dTMP* equilibrada con aire irradiada 10 minutos se registraron los espectros de los productos P_{308} , P_{351} y P_{353} . En la Figura 112 se presentan los espectros MS/MS correspondientes, los cuales muestran una señal intensa correspondiente a la base nitrogenada oxidada. Teniendo en cuenta las masas de los iones moleculares ($M - H$) y de la guanina oxidada se pueden identificar a los tres productos, considerando los antecedentes de literatura (Sección 2.4). De esta manera se concluye que P_{308} es *IdZ*, P_{351} es dihidroguanidinodihidantoina (*HdD*) y P_{353} es guanidinodihidantoina (*dD*). Las estructuras químicas de éstos compuestos y su fragmentación se incluyen en la Figura 112.

Con respecto los productos P_{326} , P_{379} y P_{680} , se registraron los espectros MS/MS utilizando una solución irradiada durante 60 minutos que contenía Ptr (150 M) y *dGMP* (800 M) para aumentar la intensidad de las señales de los iones moleculares. Los espectros MS/MS de los productos P_{326} y P_{379} se muestra en la Figura 113, en ambos casos se detectó la base nitrogenada oxidada. En particular, para el producto P_{326} el fragmento con $m/z = 87,07$ corresponde a la base oxidada con la pérdida previa de CO_2 . En base

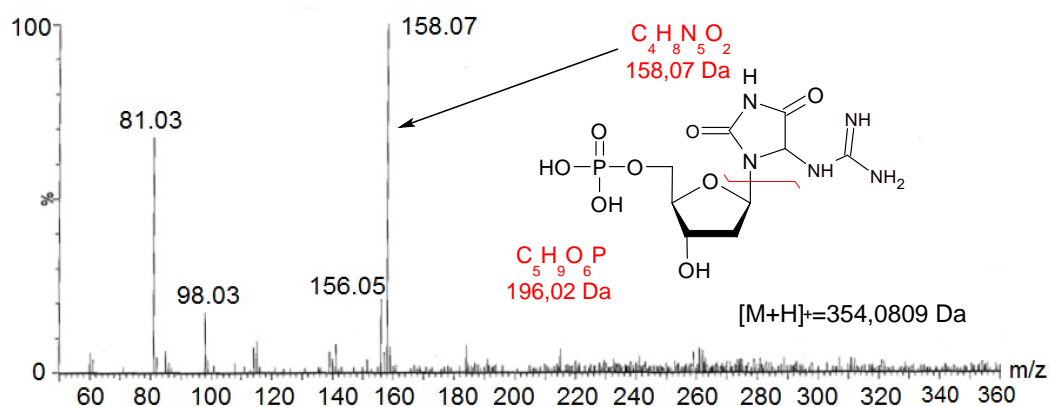
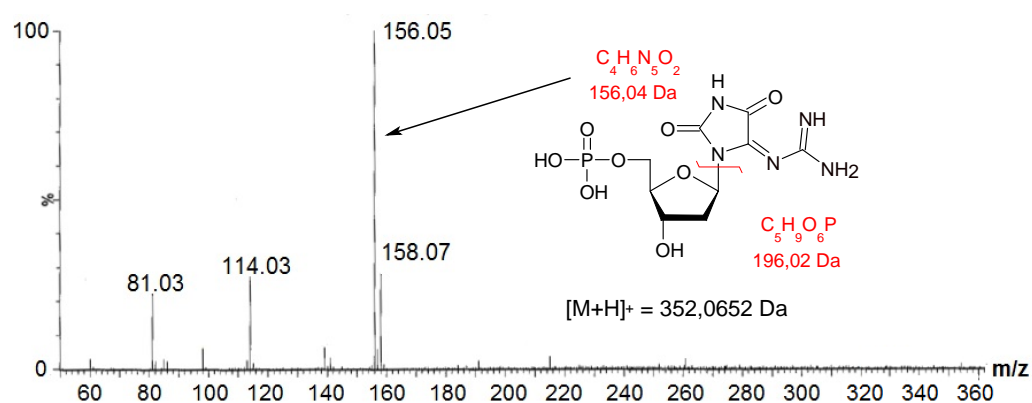
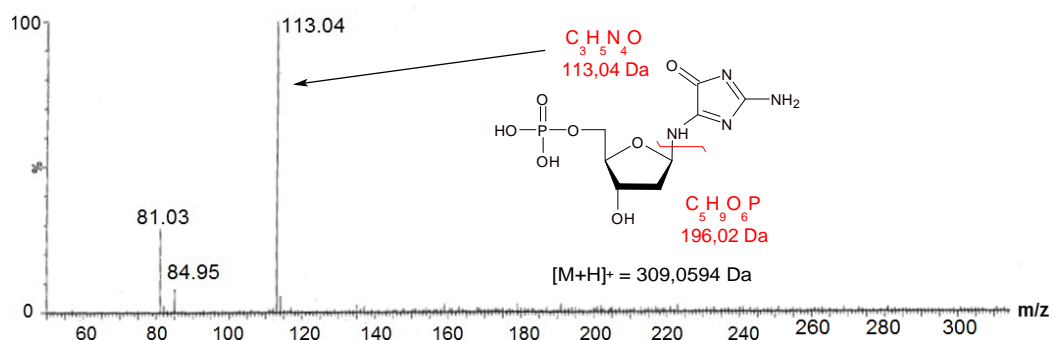


Figura 112: Espectros MS/MS ESI de los productos de la reacción fotosensibilizada registrados en una solución equilibrada con aire de Ptr y dGMP luego de 10 min de irradiación. Estructura química y fragmentación de los respectivos productos. $dGMP_0=200 \text{ M}$; $Ptr_0=150 \text{ M}$.

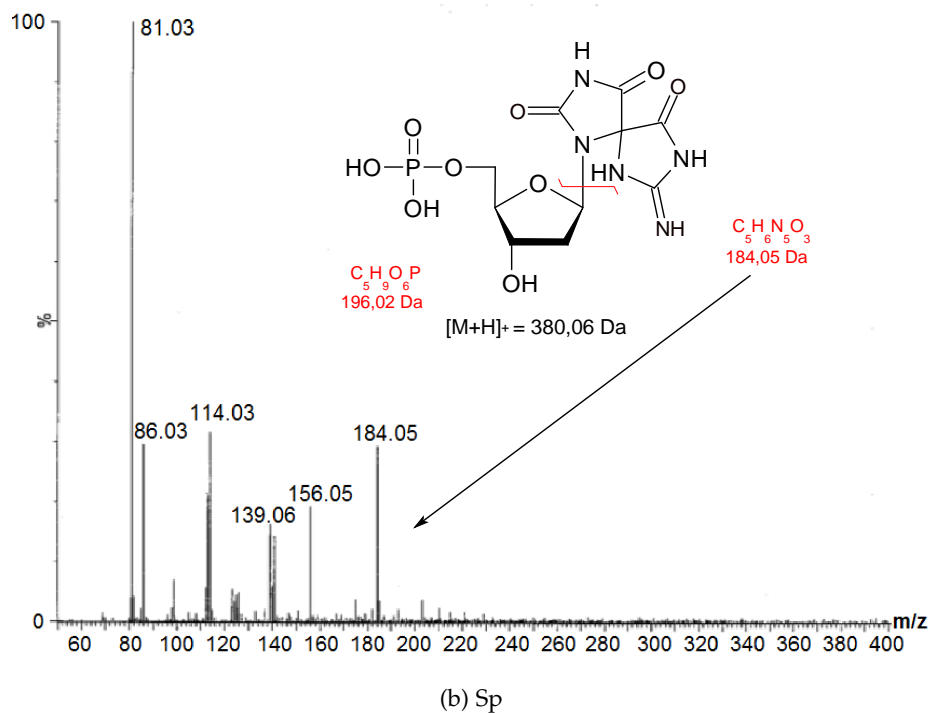
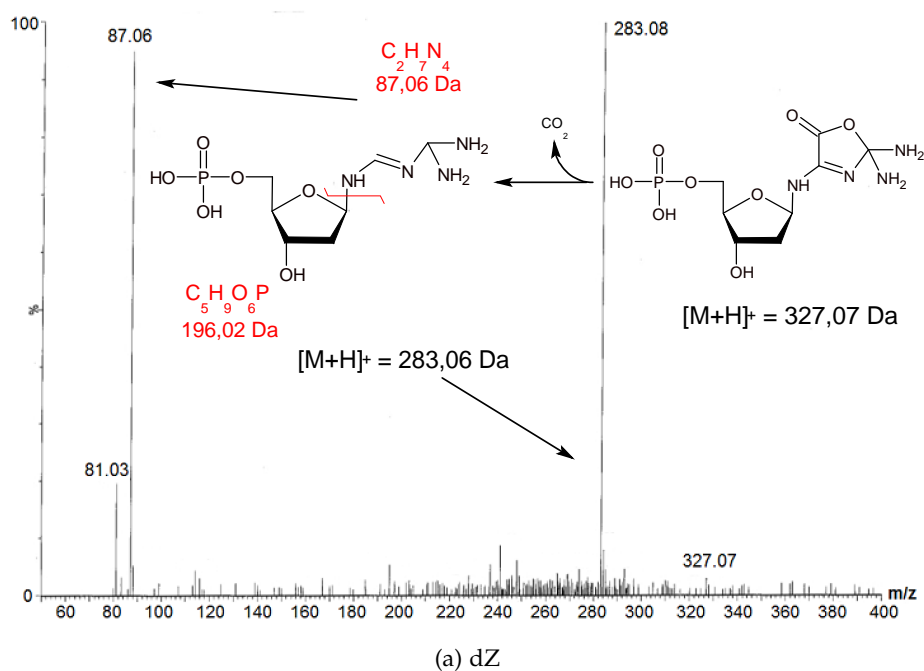


Figura 113: Espectros MS/MS ESI de los productos de reacción fotosensibilizada, registrados en una solución equilibrada con aire de Ptr y *dGMP* luego de 60 min de irradiación. Estructura química y fragmentación de los respectivos productos. $dGMP_0=800$ M; $Ptr_0=150$ M.

PRODUCTO	COMPUESTO	BASE NITROGENADA
		OXIDADA m/z (Da)
P_{308}	imidazolona (IdZ)	113,04
P_{326}	oxazolona (dZ)	87,06 (-CO ₂)
P_{351}	dihidroguanidinodihidantoina (HdD)	156,05
P_{353}	guanidinodihidantoina (dD)	158,07
P_{379}	espiroiminodihidantoina (Sp)	184,06

Tabla 17: Valores de m/z para los fragmentos principales correspondientes a la base nitrogenada oxidada de los productos de la reacción fotosensibilizada de dGMP por Ptr y su asignación a compuestos reportados en la literatura [42].

a estos resultados y considerando los antecedentes reportados en la literatura, se puede concluir que P_{326} es oxazolona (dZ) y P_{326} es espiroiminodihidantoina (Sp). Las estructuras químicas y la fragmentación de dichos productos se encuentran incluidos en la Figura 113. En la Tabla 17 se resume la identificación de los productos con su respectiva nomenclatura.

Con respecto a P_{680} en la Figura 114 se muestran los espectros MS/MS registrados en modo positivo para los valores de m/z correspondientes. En todos los espectros se observa una señal común a $m/z= 289,09$ Da, es decir que, a pesar que provienen de iones diferentes en la ruptura del enlace se generan los mismos fragmentos. En el espectro (a) de la Figura 114, se observa una señal a $m/z= 523,05$ Da que corresponde a la pérdida de un grupo fosfato del ion con $m/z= 621,03$ Da, además se observa una señal pequeña a $m/z= 152,05$ Da que coincide con el fragmento la base nitrogenada de dGMP intacta (Figura 111). Estos resultados sugieren que el producto posee en su estructura al menos una molécula de dGMP sin oxidar. Por otro lado, en el espectro (c) de la Figura 114, la señal a $m/z= 289,09$ Da podría corresponder a la pérdida del azúcar y el fosfato del ion con $m/z= 485,11$ Da, una evidencia más a favor de que el producto tiene en su estructura un nucleótido.

Las mismas muestras se analizaron en modo negativo, los espectros MS/MS correspondientes a cada valor de m/z se muestran en la Figura 115. Durante la fragmentación del ion con $m/z= 679,10$ Da se genera una señal a $m/z= 483,09$ Da que correspondería al ion de $m/z= 485,11$ Da en modo positivo. A su vez, esta señal nuevamente se genera a partir del ion de $m/z= 679,10$ Da con pérdida de un azúcar y un grupo fosfato. Por otro lado, el

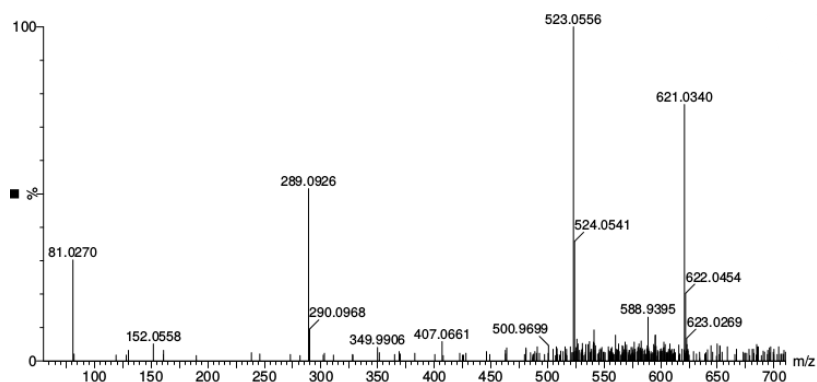
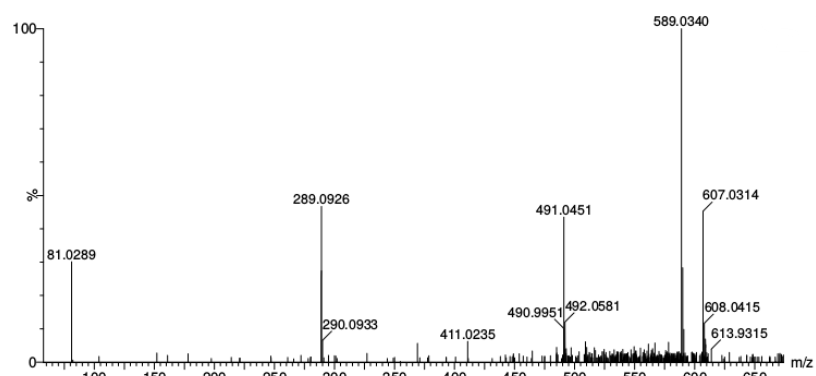
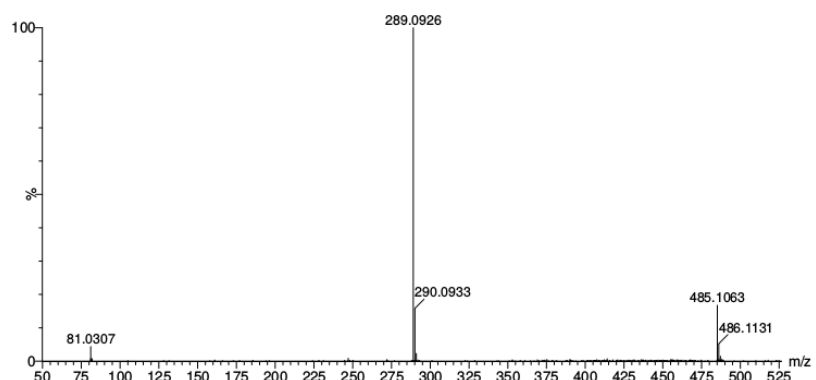
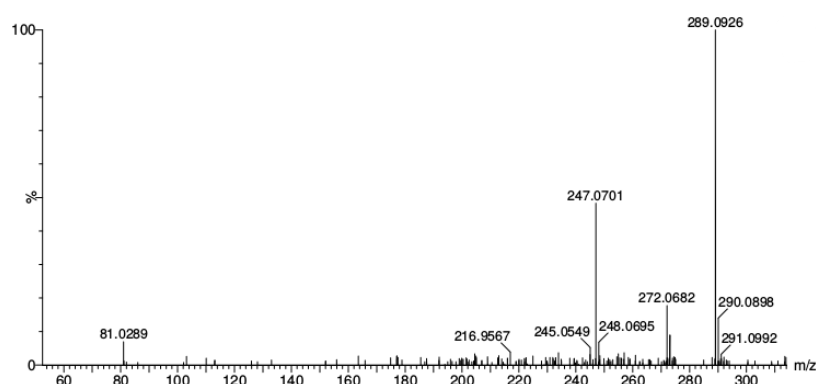
(a) $m/z = 621,03$ (b) $m/z = 607,03$ (c) $m/z = 485,11$ (d) $m/z = 289,09$

Figura 114: Espectros MS/MS ESI de los correspondientes valores de m/z , registrado a partir de una solución equilibrada con aire de Ptr y *dGMP* luego de 60 min de irradiación. $dGMP_0 = 800 \text{ M}$; $Ptr_0 = 150 \text{ M}$.

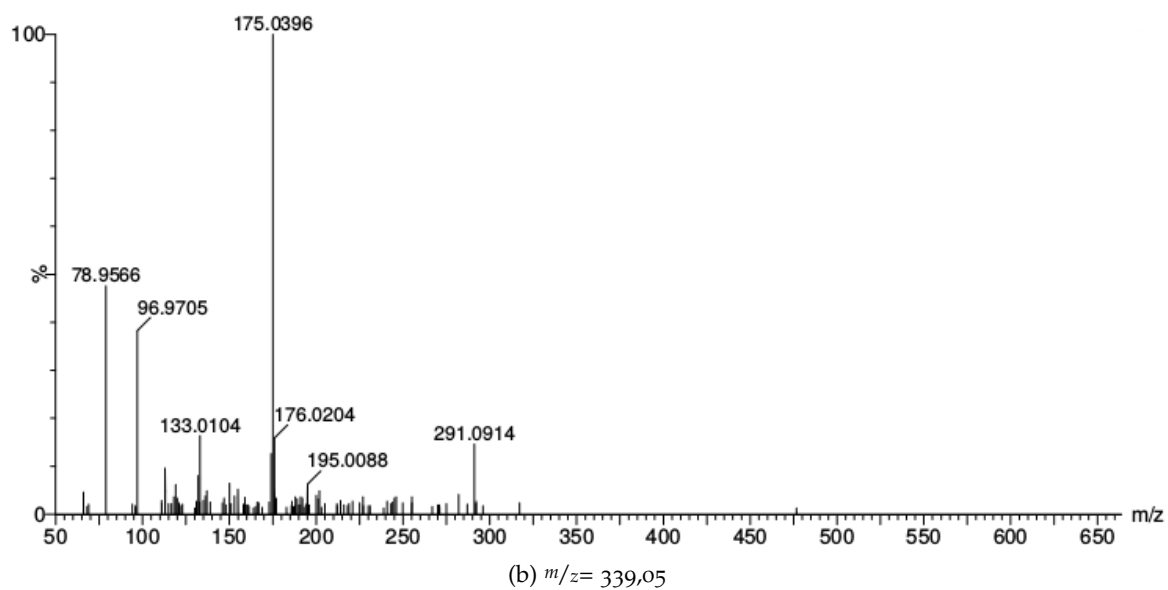
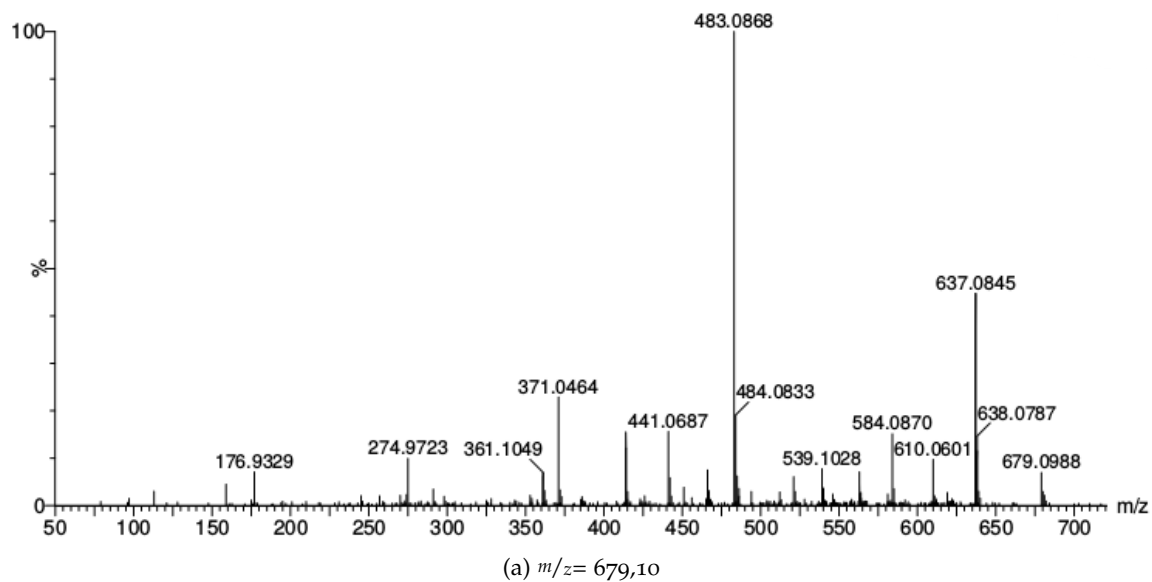


Figura 115: Espectros MS/MS ESI de los correspondientes valores de m/z , registrado a partir de una solución equilibrada con aire de Ptr y dGMP luego de 60 min de irradiación. $dGMP_0=800 M$; $Ptr_0=150 M$.

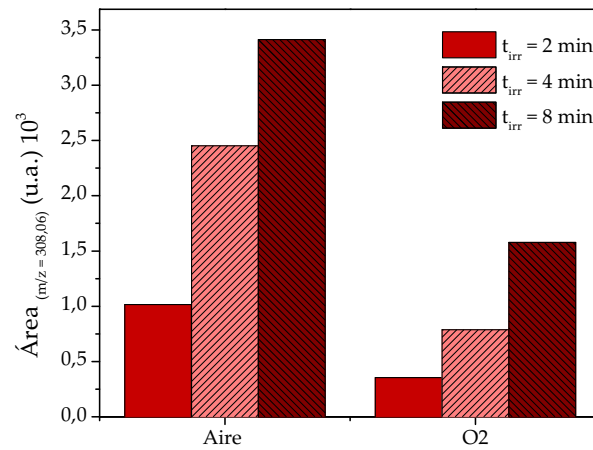
espectro MS/MS del ion $m/z = 339,05$ Da (Figura 115 (b)) genera señales correspondientes a la desoxiribosa monofosfato ($m/z = 195,01$ Da); y fosfato ($m/z = 96,97$ Da), los cuales se pueden detectar en modo negativo. Dada la complejidad del sistema a partir de los resultados expuestos no fue posible proponer una estructura química para el producto P_{680} . Sin embargo, al menos se puede concluir que se podría tratar de un aducto entre *dGMP*, ya que se detectó la señal de la base nitrogenada intacta, y otra molécula del nucleótido modificada.

Con respecto a esto, uno de los productos más conocidos de la reacción de fotosensibilización de *dGMP*, es la 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (8-oxo-*dGMP*), este producto se puede generar tanto por mecanismo tipo I como por tipo II, siendo muy difícil de detectar en reacciones fotosensibilizadas ya que es mucho más reactivo que su precursor y por lo tanto, una vez formado reacciona también por ambos mecanismos generando varios productos, de los cuales dos fueron detectados en el sistema en estudio. Es así que, no se detectó 8-oxodGMP pero sí sus productos de reacción HdD y dD. De estos dos productos, HdD proviene de la oxidación de 8-oxodGMP mediada por 1O_2 y dD es un producto que se genera mediante un mecanismo Tipo I a pH menor que 7. Por otro lado, IdZ se sabe que es un producto típico de la reacción de transferencia electrónica de *dGMP*, que proviene de la reacción entre el radical $dGMP \cdot H$ y el anión O_2^- , a su vez este producto es un intermediario que reacciona para dar dZ. A su vez, *dGMP* por un mecanismo Tipo II no solo genera 8-oxodGMP, sino también Sp, el cual puede utilizarse como un marcador de mecanismo Tipo II para reacciones fotosensibilizadas de *dGMP*.

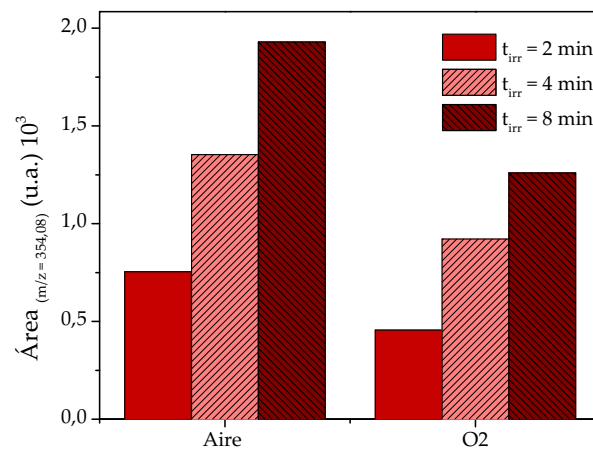
11.6.3 Distribución de los productos de reacción

Se plantearon experimentos en los cuales se determinó la formación de los productos en diferentes condiciones con el objetivo aportar mayor información a cerca del mecanismo de reacción. Para ello se irradiaron soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas con O_2 que contenían $150 \mu M$ de Ptr y $300 \mu M$ de *dGMP*. Las mezclas irradiadas se analizaron por UPLC-MS y se comparó la formación de los productos en ambas condiciones. Para ello se integraron los cromatogramas obtenidos con el detector MS fijando el valor de m/z correspondiente a cada producto identificado en la Subsección 11.6.2. En la Figura 116 se comparan las áreas de los productos, IdZ, HdD y dD en ambas condiciones y a diferentes tiempo de irradiación. Cabe aclarar que en las condiciones experimentales utilizadas no se detectaron cantidades significativas de los productos Sp y dZ para realizar una comparación del efecto del O_2 sobre su formación. Sin embargo, para el resto de los productos se observa un fuerte inhibición en la formación cuando la solución se satura con O_2 , esto se condice con el menor consumo *dGMP* observado en los experimentos de irradiación continua (Figura 87).

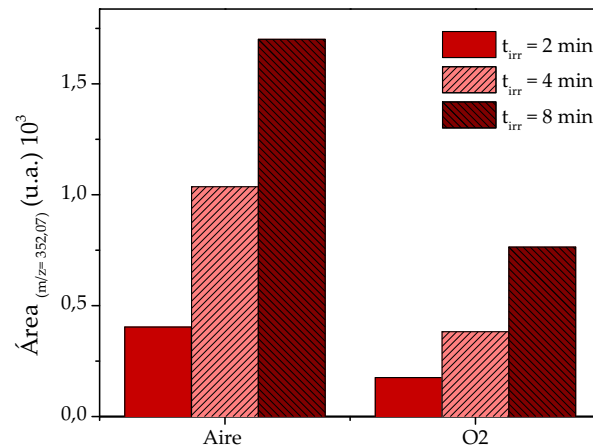
Tal como se explicó en el Sección 2.4 8-oxodGMP se puede formar por dos mecanismos diferentes, Tipo I y Tipo II; sin embargo, es muy difícil de detectar debido a su alta reactividad. Por lo tanto, la formación de 8-oxodGua se determinó indirectamente anali-



(a) IdZ



(b) dD



(c) HdD

Figura 116: Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones saturadas con O_2 o equilibradas con aire, calculada a partir de los cromatogramas con detección MS fijo en el valor de m/z correspondiente a cada producto. $dGMP_0 = 300 \text{ M}$; $Ptr_0 = 150 \text{ M}$.

zando sus productos de reacción, HdD y dD. Para ambos productos se observa una menor formación en soluciones saturadas con O_2 respecto a las equilibradas con aire. El efecto sobre dD se puede explicar, considerando que este producto se forma por un mecanismo Tipo I y el O_2 inhibe esta vía porque desactiva los $^3P_{tr}$. Considerando que HdD proviene de la reacción de 8-oxodGua con el 1O_2 es de esperar que se produzca en igual o mayor cantidad cuanto más O_2 hay en el medio, el efecto inhibitorio que se observa se podría explicar considerando que la vía mayoritaria de formación de 8-oxodGua podría ser un mecanismo Tipo I y no por la reacción del 1O_2 con dGMP.

Para confirmar la hipótesis planteada a cerca de que la vía mayoritaria de reacción de fotosensibilización de dGMP es por un mecanismo Tipo I en medio ácido, se realizaron experimentos similares a los anteriores irradiando soluciones equilibradas con aire de Ptr y dGMP preparadas en H_2O y D_2O . De los tres productos analizados anteriormente, ninguno mostró un aumento significativo en su producción en soluciones preparadas en D_2O con respecto a las soluciones en H_2O (Figura 117). Por otro lado, en estas condiciones se logró comparar la producción de Sp, para el cual se observó un aumento en su formación en D_2O con respecto a las soluciones preparadas en H_2O . Lo cual resulta lógico si se considera que Sp es el principal producto de las reacciones fotosensibilizadas Tipo II para dGMP. Este comportamiento se corresponde con los resultados de la Figura 88, donde la velocidad de consumo de dGMP no se modifica significativamente en soluciones preparadas en D_2O en comparación con H_2O . Con estos resultados se confirma que la reacción del nucleótido con el 1O_2 no es la vía mayoritaria responsable del consumo del sustrato, y además, que la formación de 8-oxodGMP proviene principalmente de la vía de transferencia electrónica.

Por último, se evaluó la participación del anión O_2^- en la formación de los productos, para lo cual se realizaron experimentos de fotosensibilización comparativos en ausencia y en presencia de $50 \mu/ml$ de SOD. En la Figura 118 se compararon los resultados obtenidos para los productos IdZ, dD y HdD. Para todos ellos se observó una disminución en la cantidad de producto formado en presencia de SOD. En el caso particular de IdZ, esta reportado en la literatura que este producto proviene de la reacción del O_2^- con el radical $dGMP-H$, por lo tanto la inhibición se debe a la eliminación de esta especie reactiva. Por otro lado, el comportamiento observado para los productos dD y HdD se puede explicar considerando que son productos secundarios, por lo tanto, se podría pensar que se forma una menor cantidad de su precursor 8-oxodGMP en presencia de SOD.

En conclusión el efecto global de la presencia de SOD sobre los productos es una inhibición en la cantidad formada. Sin embargo, se observó que la velocidad de consumo de dGMP es marcadamente mayor en presencia de SOD (Figura 87). Para resolver esta aparente contradicción, se analizaron los cromatogramas registrados con el detector PDA para comparar la formación del producto P_{680} en ausencia y en presencia de SOD. Integrando el área bajo la curva del pico con $t_r = 3,4$ min y graficando estos valores para diferentes tiempos de irradiación (Figura 119) se observó un aumento significativo en la cantidad de P_{680} formado en soluciones irradiadas en presencia de SOD. Por lo

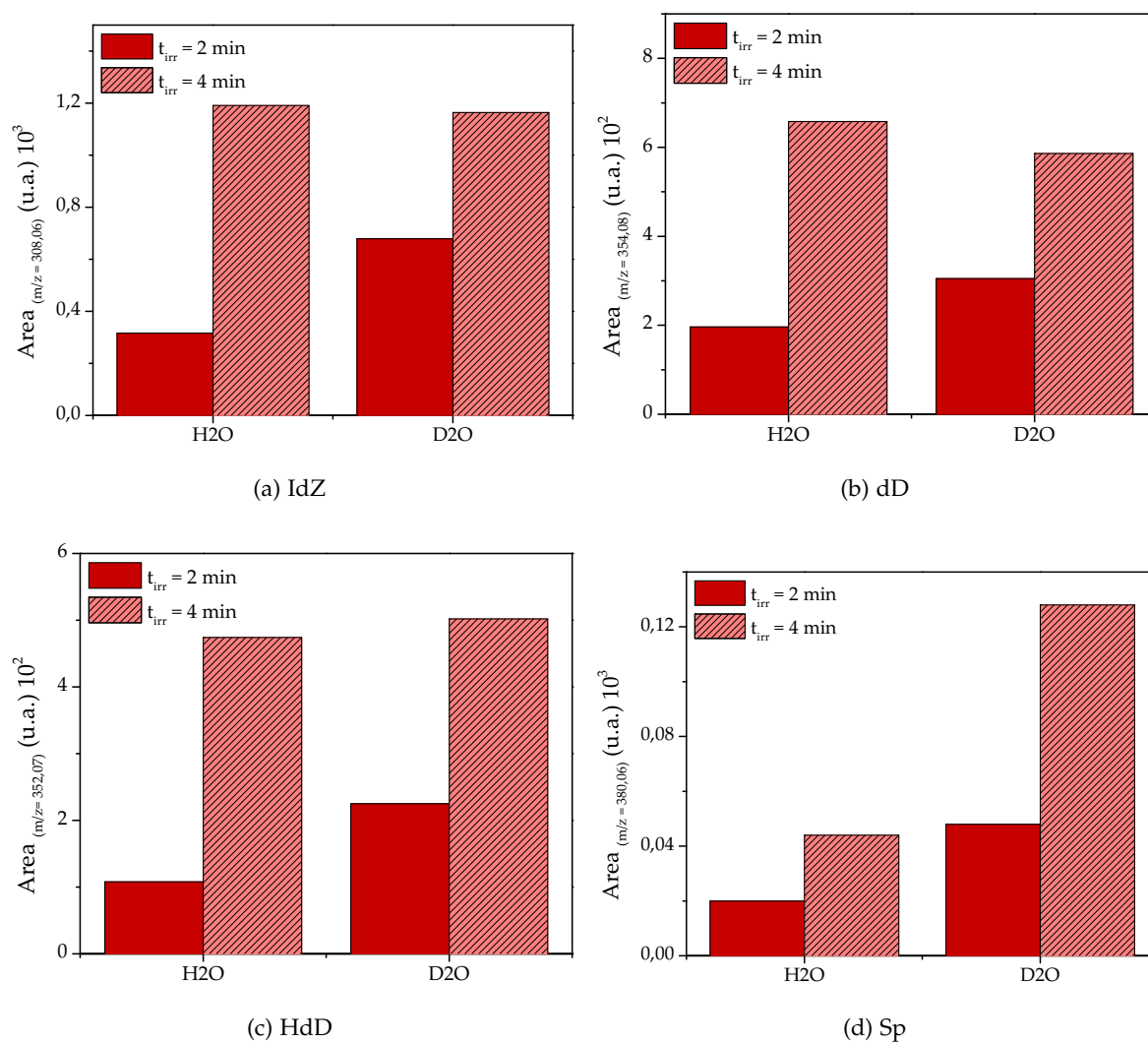
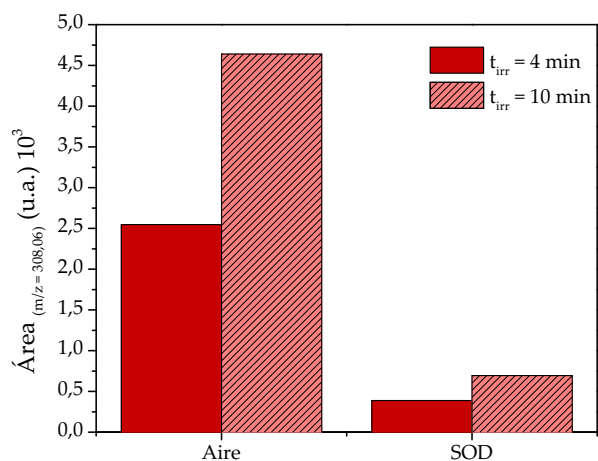
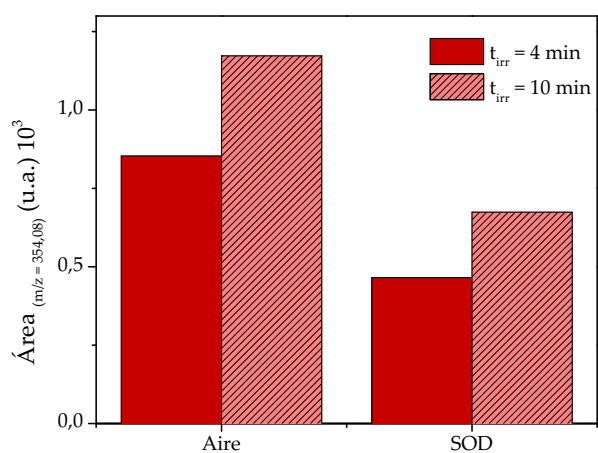


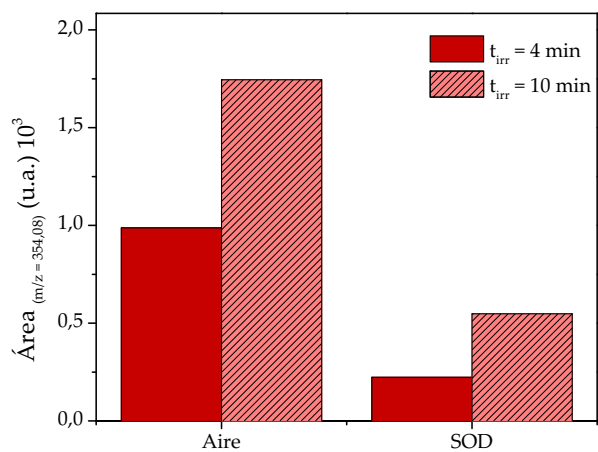
Figura 117: Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire preparadas en H₂O o D₂O, calculada a partir de los cromatogramas con detección MS fijo e el valor de m/z correspondiente a cada producto. $dGMP_0=300$ M; $Ptr_0=150$ M.



(a) IdZ



(b) dD



(c) HdD

Figura 118: Evolución del área de los productos con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire sin y con agregado de SOD, calculada a partir de los cromatogramas con detección MS fijo en el valor de m/z correspondiente a cada producto. $dGMP_0 = 300$ M; $Ptr_0 = 150$ M; $SOD = 50$ U/ml.

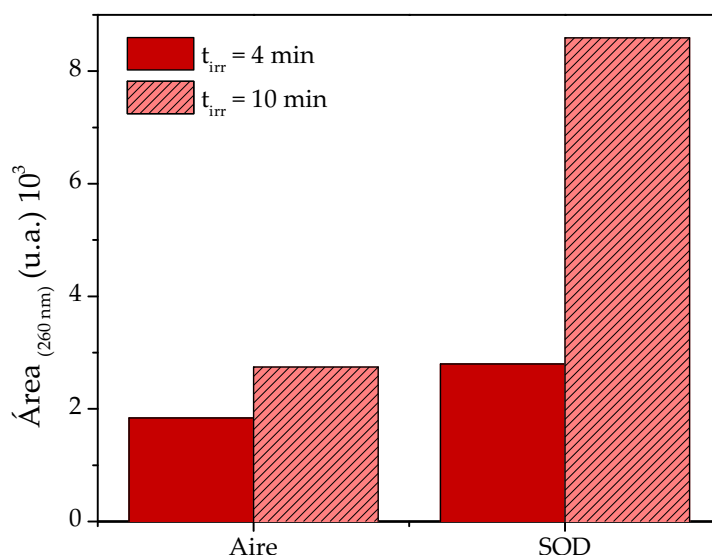


Figura 119: Evolución del área del producto de $t_r=3,4$ min con el tiempo de irradiación en soluciones equilibradas con aire sin y con agregado de SOD, calculada a partir de los cromatogramas con detección PDA. $\lambda_{ana} = 250 \text{ nm}$; $dGMP_0=300 \text{ M}$; $Ptr_0=150 \text{ M}$; $SOD = 50 \text{ U/ml}$.

tanto, el aumento en el consumo de dGMP en estas condiciones se debe a la formación del producto de alto peso molecular, que probablemente sería un aducto de nucleótidos púricos.

11.7 MECANISMO DE REACCIÓN

En la [Figura 120](#) se resumen todas las reacciones estudiadas a lo largo del presente capítulo para la fotosensibilización de dGMP inducida por Ptr. Debido a que se puede asumir que el mecanismo dilucidado en este capítulo es general para todas las pterinas oxidadas o, al menos, para Ptr y otros derivados estudiados en el capítulo 10, en el esquema se usa el término general Pt. El proceso se inicia con la absorción de un fotón por parte del sensibilizador y la formación de los estados excitados singletes que luego por ISC generan los estados excitados tripletes.

El sensibilizador presenta dos estados excitados tripletes, el T_c de Pt se desactiva muy rápidamente y no tiene oportunidad de reaccionar, bajo las condiciones experimentales utilizadas en éste capítulo. Por otro lado el T_l de Pt es la especie reactiva que participa, por ejemplo en la formación del radical del sustrato. Por consiguiente, cuando en el mecanismo se menciona al estado excitado triplete, se está haciendo referencia a la especie con τ mayor, es decir T_l del sensibilizador.

3Pt se desactiva por diversas vías competitivas: i) la desactivación radiativa y no radiativa para volver al estado fundamental; ii) la reacción con O_2 para generar 1O_2 por transferencia de energía; iii) la degradación por la vía fotoquímica; y iv) la transferencia electrónica desde dGMP hacia 3Pt que genera los correspondientes pares radicales.

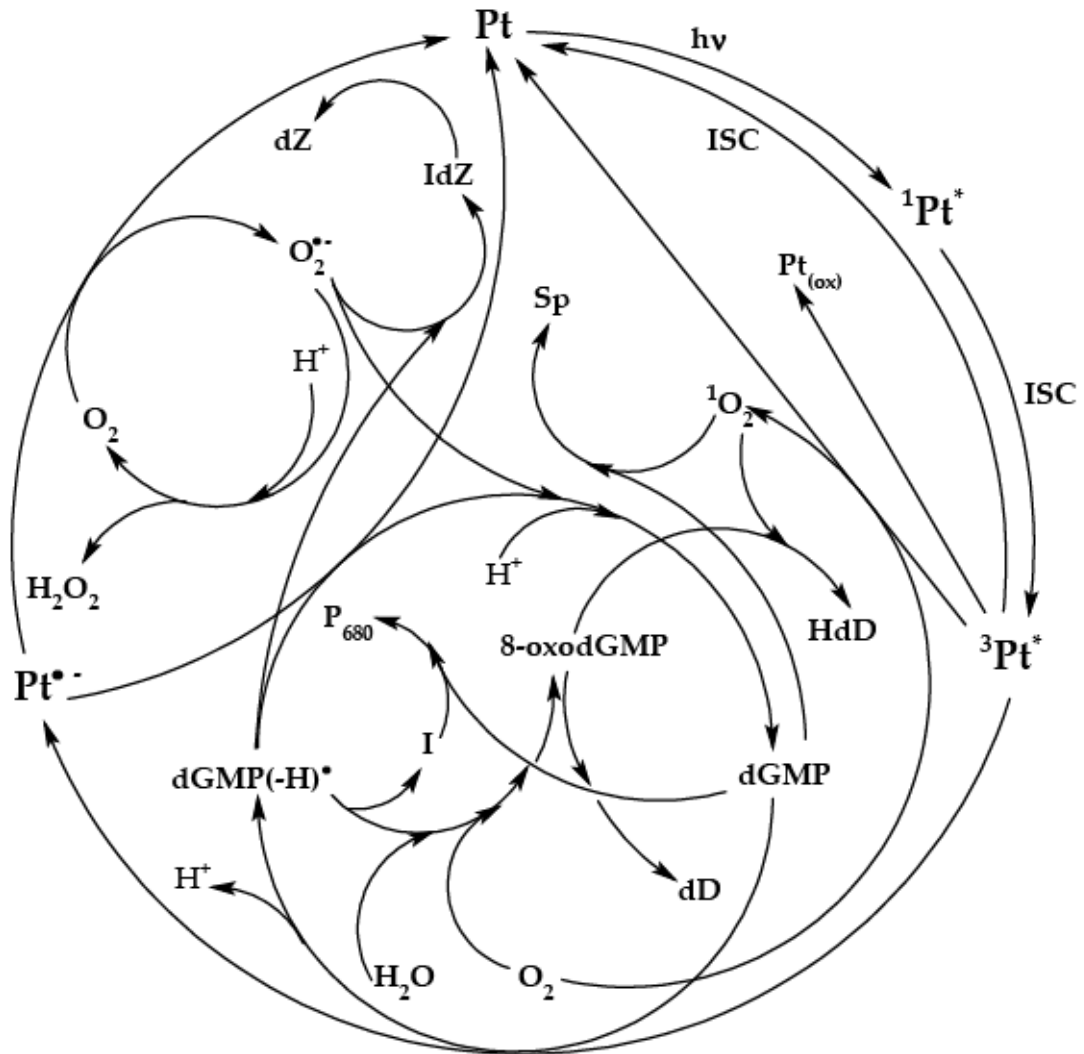


Figura 120: Mecanismo general de fotosensibilización de 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato por pterinas oxidadas.

En solución ácida el radical $dGMP$ se deprotona rápidamente para generar el radical neutro, $dGMP-H$. En ausencia de O_2 el radical anión Pt reacciona con el radical $dGMP-H$ para regenerar al sustrato, sin consumo neto del nucleótido.

En presencia de O_2 , este reacciona con Pt para generar, por transferencia electrónica O_2^- , que por medio de un reacción de dismutación genera H_2O_2 y O_2 . Por su parte el radical $dGMP-H$ también participa en diversas vías competitivas: i) reacciona con H_2O y O_2 para generar 8-oxodGMP por un mecanismo Tipo I; ii) reacciona con el O_2 para regenerar al nucleótido, o bien para dar como producto IdZ, éste último en una reacción posterior genera dZ; iii) reacciona para dar un intermediario (I) que luego posiblemente por reacción con un molécula de dGMP daría el producto identificado como P_{680} , ésta en vía mayoritaria de consumo de dGMP en presencia de O_2 y SOD. Sin descartar por completo el mecanismo Tipo II, pero siendo una vía minoritaria, se genera consumo del nucleótido por la reacción con el 1O_2 para dar como producto principal Sp.

Por último, no se encontró evidencia directa de la formación 8-oxodGMP, sino a partir de la identificación de su productos por medidas de UPLC-MS/MS. Este compuesto, mucho más reactivo que dGMP, en reacciones sucesivas por un mecanismo Tipo I, genera dD y por un mecanismo Tipo II, reacciona con el 1O_2 para generar HdD. A partir del análisis de la distribución de los productos en soluciones saturadas con O_2 y en D_2O se puede pensar que la formación de 8-oxodGMP sería principalmente por un mecanismo Tipo I y no por la reacción de dGMP con el 1O_2 .

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXITIMIDINA 5'-MONOFOSFATO INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE OXÍGENO

En los capítulos 9, 10 y 11, se estudiaron los procesos fotosensibilizados utilizando como sustrato los nucleótidos dAMP y dGMP. Estructuralmente, estos compuestos son nucleótidos con bases púricas, y se diferencian de dTMP y dCMP por ser bases pirimidínicas (Sección 2.2). El objetivo del presente capítulo es investigar si las pterinas son capaces de inducir algún cambio químico sobre nucleótidos de pirimidina a través de procesos fotosensibilizados. Dentro de la familia de las pterinas, se utilizó como sensibilizador a la molécula más sencilla y fotoquímicamente más estable, Ptr. En estudios previos se demostró que esta molécula es capaz de fotosensibilizar a nucleótidos púricos, mediante un mecanismo Tipo I para dAMP, y una competencia entre mecanismos Tipo I y Tipo II para el proceso fotosensibilizado de dGMP [113, 114]. En el capítulo 11 se presentó un mecanismo general Tipo I para los procesos fotosensibilizados de nucleótidos de purina inducidos por Ptr. Sin embargo, no hay estudios previos realizados sobre nucleótidos de pirimidina usando pterinas como sensibilizadores.

La reactividad de los nucleótidos frente a un sensibilizador capaz de reaccionar por transferencia electrónica depende, principalmente, del potencial de ionización. El potencial de ionización para la serie de nucleótidos que componen el ADN varían en un orden creciente de la siguiente manera: dGMP < dAMP < dCMP ~ dTMP. Por lo tanto, se acepta que los nucleótidos de pirimidina son más difíciles de oxidar en procesos Tipo I que los nucleótidos púricos. Por otro lado, los nucleótidos de pirimidina, al igual que dAMP, poseen una reactividad muy baja frente al $^1\text{O}_2$.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantearon experimentos de irradiación continua bajo diferentes condiciones utilizando como sustrato nucleótidos que tiene como base una pirimidina, en particular dTMP. Se llevaron a cabo estudios de LFP para evaluar la interacción de los estados excitados tripletes con el sustrato y para identificar la formación de especies radicalarias. Para la detección del radical del nucleótido también se realizaron estudios de EPR. El análisis de los resultados se enfocará en la dilucidación de los mecanismos de reacción. Por último, la identificación de los productos de reacción del proceso fotosensibilizado se realizó aplicando la técnica de UPLC-MS/MS.

12.1 Ptr COMO SENSIBILIZADOR DE dTMP

En estudios preliminares se demostró que el nucleótido de timina, en las condiciones de un experimento típico de fotosensibilización de nucleótidos púricos utilizando como

sensibilizador Ptr no producía ningún cambio sobre este sustrato detectable por HPLC. Este es un resultado esperable, ya que para idénticas condiciones experimentales, es decir, densidad de flujo de fotones, concentración de sustrato y de sensibilizador, los nucleótidos con bases pirimidínicas son menos susceptibles a ser oxidados por un mecanismo de transferencia electrónica que los homólogos púricos. Por consiguiente, considerando la menor reactividad de dTMP, se modificaron algunas condiciones experimentales para favorecer la reacción fotosensibilizada inducida por Ptr. En primer lugar, se incrementó la intensidad de radiación, para lo cual se trabajó con tres lámparas Rayonet (350–10 nm) de intensidad similar entre ellas (Sección 5.3). Por otro lado, se aumentó la concentración de sensibilizador hasta el límite de solubilidad en agua, (la concentración de Ptr en la mayoría de los experimentos fue de 150 μ M). Además, se trabajó con una concentración de sustrato mayor a las concentraciones utilizadas normalmente en los experimentos con nucleótidos púricos, la cual en todos los experimentos de irradiación estacionaria fue mayor a 1 mM.

12.1.1 Evaluación de la capacidad fotosensibilizadora de Ptr

Una vez determinadas las condiciones óptimas para estudiar la reacción, se realizaron experimentos típicos de fotosensibilización en medio ácido (pH 5,5) con el objetivo de probar la capacidad de Ptr para inducir algún cambio químico sobre el nucleótido de timidina. En la Figura 121 se muestran los cromatogramas de soluciones equilibradas con aire conteniendo Ptr y dTMP para diferentes tiempos de irradiación. En primer lugar, se puede apreciar una disminución del área del pico que corresponde al nucleótido, con un t_r aproximadamente de 3,5 minutos. El decrecimiento progresa con el tiempo de irradiación, y resulta en la formación de productos que se puede visualizar como picos nuevos con valores de t_r tanto mayores como menores al de dTMP. Por otro lado, el pico correspondiente a Ptr con un $t_r = 7,9$ minutos, también disminuye con el tiempo de irradiación. A partir de los cromatogramas se cuantificó el consumo tanto del sustrato como del sensibilizador haciendo uso de curvas de calibración de los compuestos puros (Sección 6.2). Los perfiles de concentración (Figura 122) muestran un consumo apreciable del nucleótido, aproximadamente un 30% en 2 horas de irradiación y, por su parte, Ptr también se consume. El consumo de dTMP, tal como se esperaba, es mucho más lento que el observado para los nucleótidos púricos en condiciones de irradiación menos drásticas.

Con el objetivo de evaluar la participación del O₂ en la reacción fotosensibilizada se realizaron experimentos comparativos utilizando mezclas conteniendo 1,6 mM de dTMP y 150 μ M de Ptr en ausencia y en presencia de O₂. Cada una de las soluciones fueron expuestas a radiación UV-A en idénticas condiciones. Luego se cuantificó el consumo del nucleótido y del sensibilizador por HPLC (Figura 123). En primer lugar, el efecto de la ausencia de O₂, es la disminución de la velocidad de consumo del nucleótido. Sin embargo, se observó consumo del sustrato en las soluciones saturadas en Ar. Este consumo no se debe a trazas de O₂ que ingresaron a las celda durante el experimento, ya que durante la

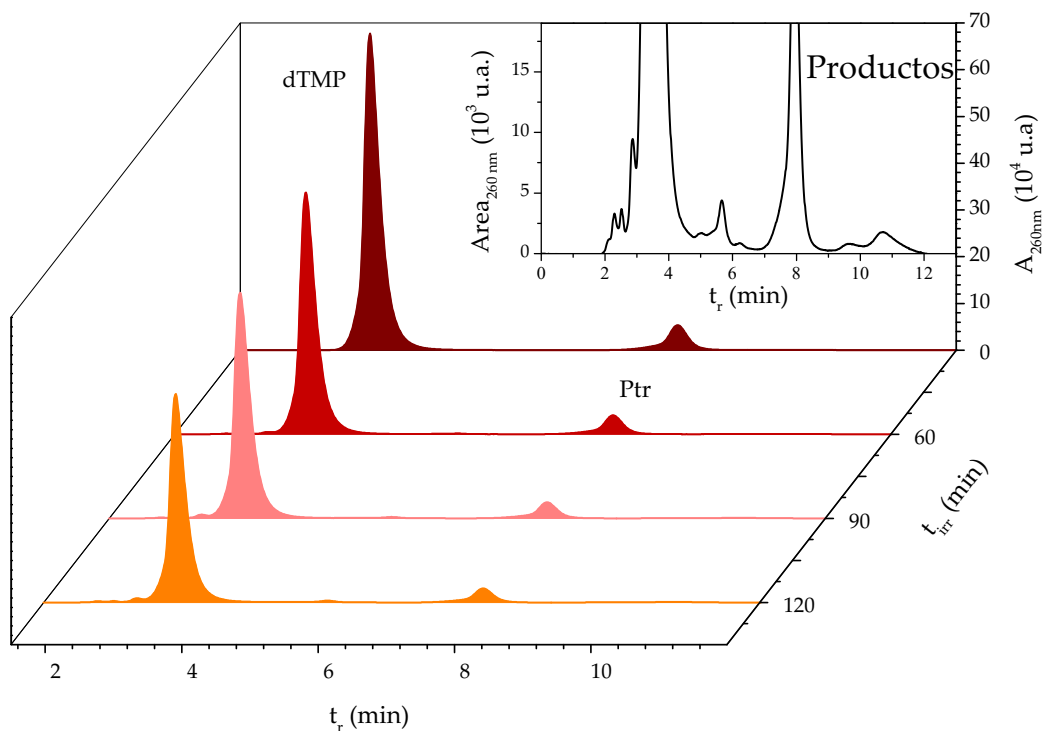


Figura 121: Evolución de los cromatogramas con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dTMP y Ptr. $dTMP_0 = 1 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 140 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{ana}} = 260 \text{ nm}$.

irradiación se burbujeó Ar a la celda cada 15 minutos. Por otro lado, analizando el perfil del sensibilizador, se observó consumo de Ptr en las soluciones saturadas con Ar, pero en este caso con un aumento en la velocidad de consumo en ausencia de O_2 con respecto a las soluciones equilibradas con aire. Bajo radiación UV-A Ptr se degrada con una tasa de consumo muy baja, reacción que solamente ocurre si el O_2 está presente en el medio.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede plantear la existencia de dos procesos paralelos. Uno de ellos que depende de la presencia de O_2 y sería el responsable del consumo del sustrato en aire y ocurriría sin consumo de Ptr. El segundo proceso no necesita O_2 para que ocurra, se produce con un menor consumo de nucleótido, pero consumiría también el sensibilizador. Este comportamiento nunca se había observado en condiciones anaeróbicas, para los sistemas antes estudiados de nucleótidos púricos y sensibilizadores pterínicos. Debido a esto las reacciones fotosensibilizadas en ausencia de O_2 se estudiarán en detalle en el Capítulo 13. En las secciones siguientes del presente capítulo se estudiará el primer proceso con el objetivo de dilucidar el mecanismo de reacción para la fotosensibilización de dTMP inducido por Ptr en presencia de O_2 .

12.1.2 Controles

Los experimentos de control se pueden dividir en dos grupos, por un lado los controles para descartar reacciones térmicas entre el sensibilizador y el sustrato en ausencia de

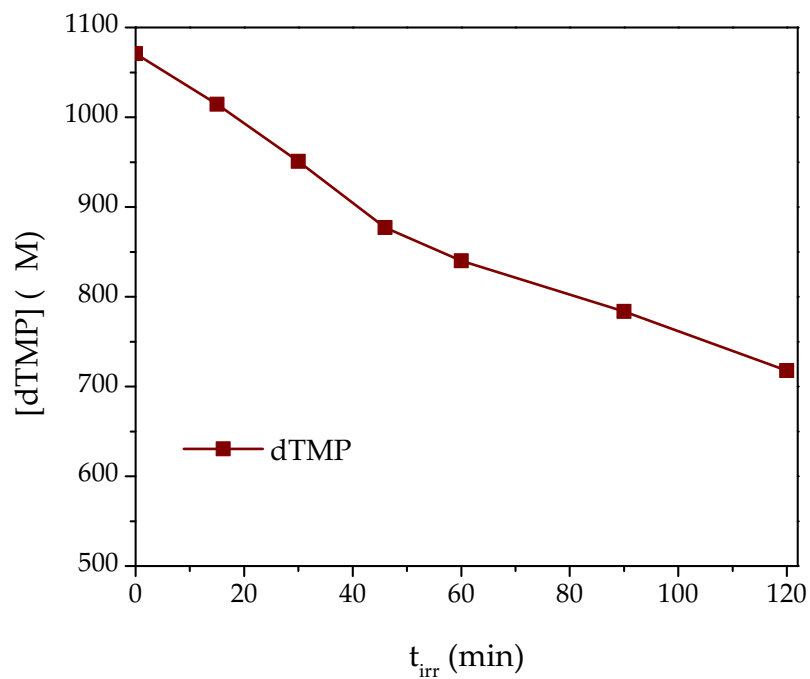
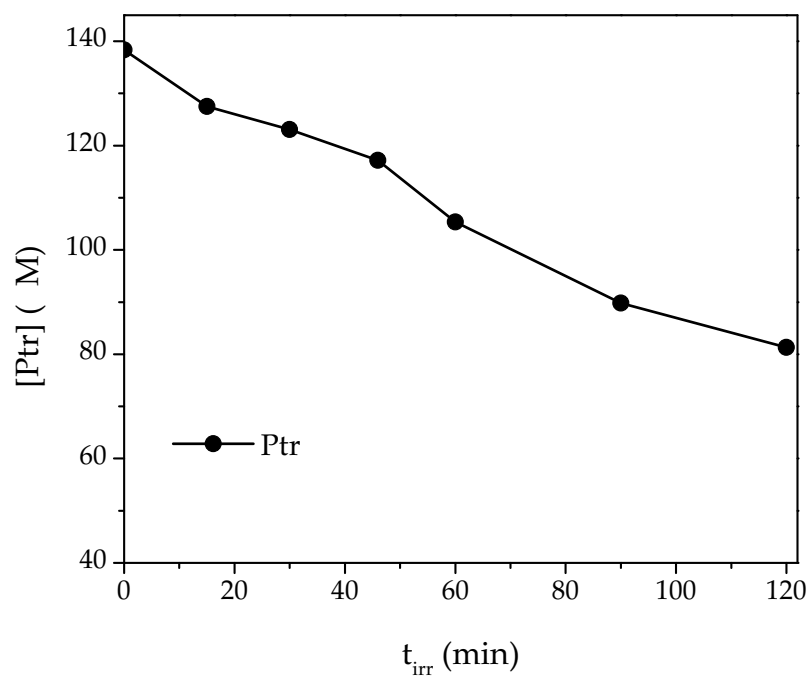
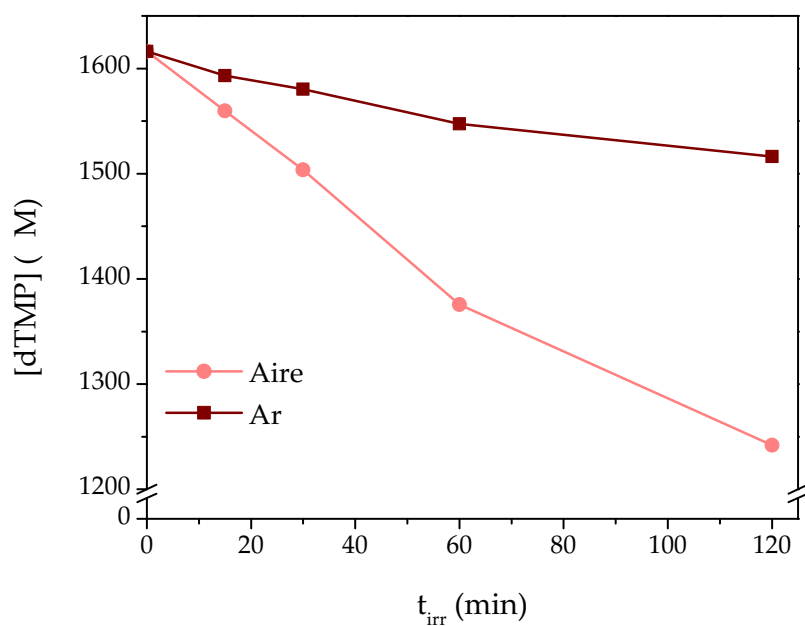
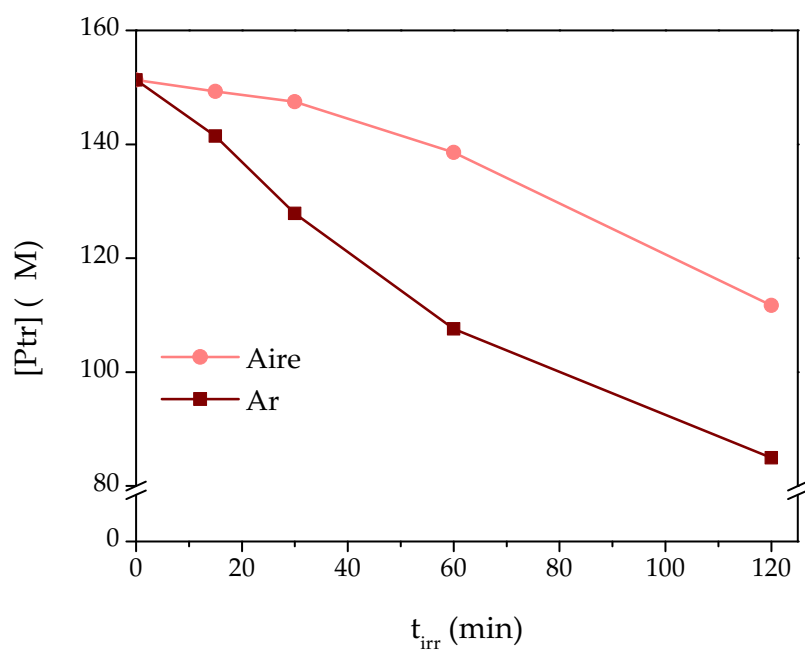
(a) Consumo de *dTMP*(b) Consumo de *Ptr*.

Figura 122: Evolución de la concentración de *dTMP* y *Ptr* con el tiempo de irradiación en soluciones estabilizadas con aire a pH 5,5. $dTMP_0 = 1 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 140 \text{ M}$.



(a) Consumo de dTMP



(b) Consumo de Ptr

Figura 123: Evolución de la concentración de dTMP y Ptr en soluciones equilibradas en aire y saturadas con Ar. $dTMP_0 = 1645 \text{ M}$; $Ptr_0 = 150 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

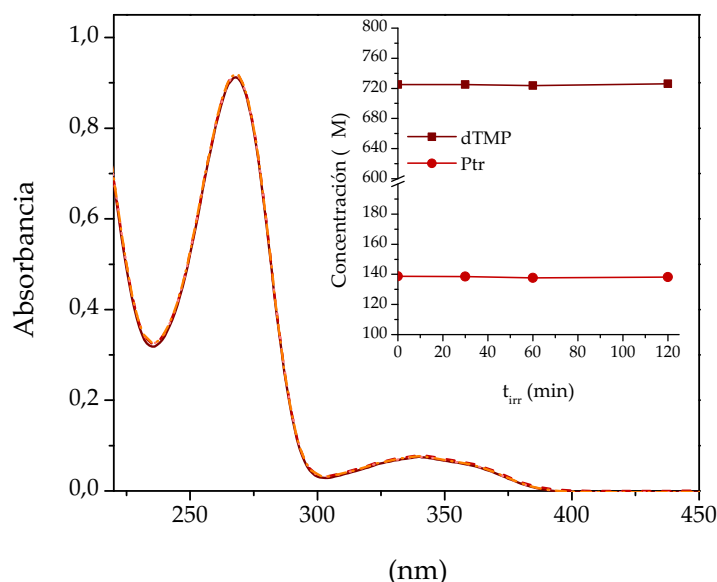


Figura 124: Espectros de absorción de soluciones que contienen *dTMP* y *Ptr* mantenidas en oscuridad durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min). *Inset*: concentraciones de *dTMP* y *Ptr* en función del tiempo determinadas por HPLC. $dTMP_0 = 720 \text{ M}$; $Ptr_0 = 130 \text{ M}$; $pH = 5,5$; camino óptico = $0,2 \text{ cm}$.

luz y, por otro, las reacciones en presencia de radiación UV-A. Dentro de este grupo se analizará la reacción de fotólisis de *dTMP* por absorción directa de radiación UV-A y el efecto de la presencia del nucleótido en la fotoquímica de *Ptr*, ambos controles se realizaron en soluciones equilibradas con aire.

En primer lugar, mezclas que contenían *Ptr* y *dTMP* en concentraciones similares a las utilizadas en los experimentos de fotosensibilización se colocaron en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Se registraron espectros de absorción y se tomaron muestras de la mezcla a diferentes tiempos que luego se analizaron por HPLC (Figura 124). Dentro de las 2 horas no hubo modificación de la concentración de ninguno de los reactivos, por lo tanto, se puede descartar cualquier tipo de reacción térmica en dicho período de tiempo.

El segundo control consistió en irradiar a 350 nm soluciones acuosas ($pH = 5,5$) de *dTMP* equilibradas con aire en ausencia de *Ptr* durante diferentes períodos de tiempo. A distintos tiempos de irradiación se registraron espectros de absorción, se tomaron muestras y se analizaron por HPLC (Figura 125). No se observaron cambios significativos en los espectros ni en la concentración de *dTMP* durante dos horas de irradiación, tampoco formación de productos, indicando que no se produjeron cambios químicos en la molécula. Este resultado es lógico ya que el nucleótido no absorbe radiación a longitudes de onda mayores a 300 nm. Pero al trabajar con concentraciones de *dTMP* del orden de 1 mM es necesario descartar cualquier efecto debido a la absorción directa de radiación. Además debido a que en este caso se empleó una mayor intensidad de radiación, también hay que descartar un efecto térmico debido al calor disipado por las lámparas utilizadas.

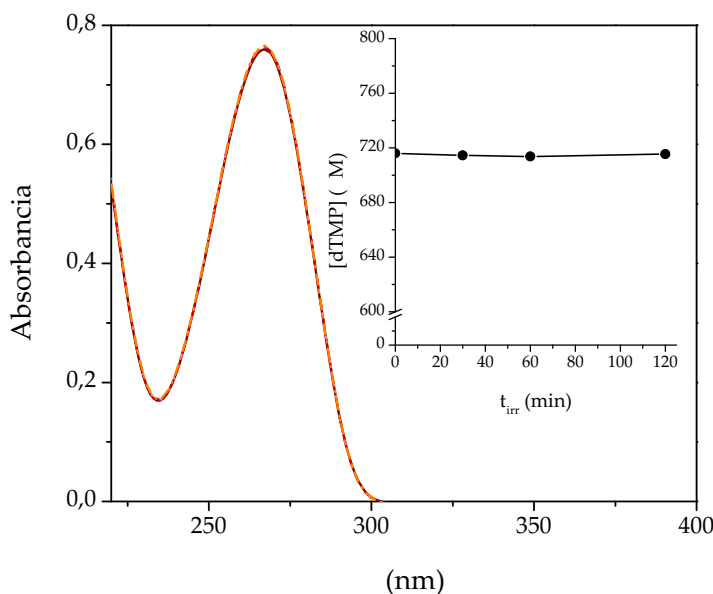


Figura 125: Espectros de absorción de soluciones de dTMP equilibradas con aire expuestas a radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min). *Inset*: concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación determinada por HPLC. $d\text{TMP}_0 = 720 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; camino óptico = 0,2 cm.

En estudios previos realizados sobre la fotoquímica de Ptr, se demostró que bajo radiación UV-A y en presencia de O_2 , la molécula experimenta una fotooxidación con la consecuente ruptura del anillo para dar productos no pterínicos [66]. Esta reacción es relativamente lenta, con respecto a la fotooxidación de otros derivados de esta familia, y sólo es posible si el O_2 está presente en el medio. Debido a que en los experimentos de fotosensibilización de dTMP se emplearon condiciones de irradiación mucho más intensas y por largos períodos de tiempo, fue necesario tener en cuenta la fotodegradación del sensibilizador en estas condiciones. Para investigar este punto, se irradiaron soluciones de Ptr ($150 \text{ } \mu\text{M}$) en presencia y en ausencia de dTMP (1 mM) y se compararon los correspondientes perfiles de concentración obtenidos por HPLC. Del análisis de la Figura 126 se desprende que, efectivamente la degradación fotoquímica del sensibilizador no se ve alterada por la presencia del nucleótido.

Este último control permite inferir ciertos aspectos relevantes los mecanismos implicados. En primer lugar, el consumo de Ptr que se registra durante los experimentos de fotosensibilización en presencia de O_2 se debe a la fotólisis propia del sensibilizador y no está relacionado con el proceso fotosensibilizado. Por otro lado, tal como se mencionó anteriormente, Ptr es fotoestable en condiciones anaeróbicas. Por consiguiente el consumo del fotosensibilizador que se observó en las soluciones burbujeadas con Ar (Figura 123) debería ser consecuencia del proceso fotosensibilizado.

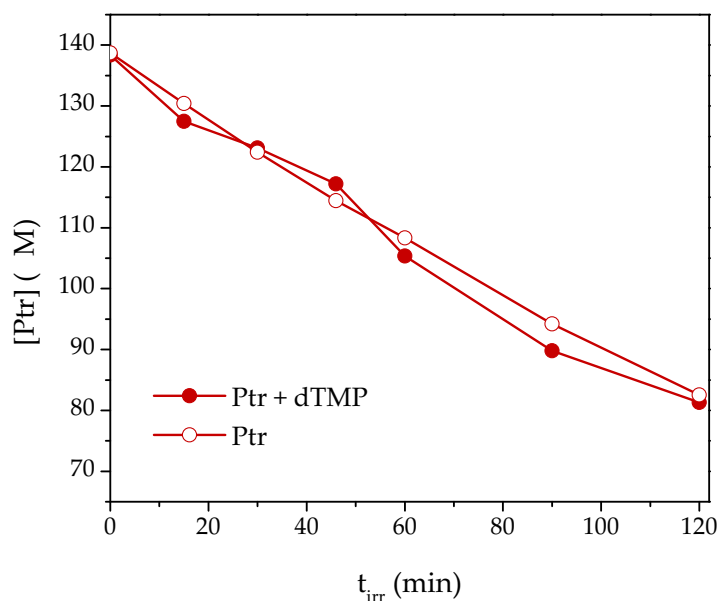


Figura 126: Evolución de la concentración de *Ptr* con el tiempo de irradiación en soluciones estabilizadas con aire a pH 5,5 que contenían *Ptr* sin y con agregado de *dTMP*. $dTMP_0 = 1$ mM; $Ptr_0 = 138$ M.

12.2 INTERACCIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS DE *Ptr* CON *dTMP*

En los experimentos de fotosensibilización de *dTMP* se trabajó con concentraciones de sustrato mucho mayores a las utilizadas, por lo general, en los estudios realizados con nucleótidos púricos. Por otro lado, no se estudió previamente sobre la interacción de los estados excitados de *Ptr* con nucleótidos de pirimidina, salvo un estudio sobre la desactivación de fluorescencia con *dCMP* [144]. En esta sección se presentan resultados enfocados a estudiar la interacción de los 3Ptr y 1Ptr con *dTMP* mediante experimentos de LFP y de desactivación de la emisión de fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo.

12.2.1 Desactivación del estado excitado singulete

La metodología empleada para el estudio de la desactivación de 1Ptr por *dTMP* se encuentra descrita en detalle en el capítulo 7. Cabe recordar, sin embargo, que los experimentos fueron realizados en un fluorómetro que utiliza la técnica TCSPC. Se utilizó una lámpara de Xe como fuente de excitación en los experimentos de estado estacionario. Y un NanoLED con emisión a 341 nm en los experimentos resueltos en el tiempo. Las concentraciones de nucleótido utilizadas fueron relativamente altas (hasta 60 mM). Sin embargo, este aumento de la fuerza iónica de la solución no tiene efecto sobre la emisión de las pterinas, como fue explicado en estudios previos [58].

Se obtuvieron los espectros de emisión excitando a *Ptr* a 340 nm, y registrando la emisión en el intervalo comprendido entre 350 y 600 nm. Se analizaron una serie de solu-

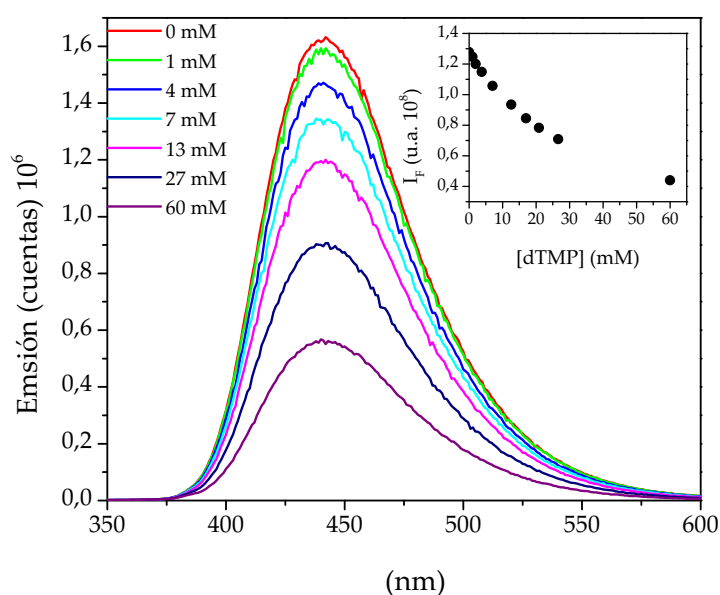


Figura 127: Espectros de emisión de fluorescencia registrados en soluciones de *Ptr* en presencia de distintas concentraciones de dTMP. $[Ptr] = 15 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$.

ciones conteniendo la misma concentración de *Ptr* ($15 \text{ } \mu\text{M}$) y concentraciones crecientes del nucleótido (entre 0 y 60 mM). Posteriormente, se calcularon los valores de I_F para cada concentración de nucleótido como la integral bajo la curva del espectro de emisión. Los valores obtenidos fueron utilizados para el análisis de Stern-Volmer. Se observó una importante desactivación de la fluorescencia que implica una interacción de 1Ptr con dTMP (Figura 127). Sin embargo, las concentraciones de nucleótido para las cuales la desactivación es significativa son mucho mayores que las utilizadas en los experimentos de fotosensibilización cuyos resultados fueron expuestos anteriormente. Es decir que, en las condiciones de dichos experimentos, la desactivación de 1Ptr por dTMP fue muy baja. Sin embargo, no se puede descartar por completo la participación de esta especie en la reacción fotosensibilizada.

En otro grupo de experimentos se registró la fluorescencia de *Ptr* en función del tiempo, analizando la señal a $\lambda_{emi} = 450 \text{ nm}$. Estas señales se registraron para cada concentración de nucleótido manteniendo la concentración del fluoróforo constante. En la Figura 128 se muestran una serie de trazas registradas a las mismas concentraciones que los espectros que se muestran en la Figura 127. Para todas las concentraciones los decaimientos presentaron un comportamiento mono-exponencial. Luego se realizó el ajuste de las señales obtenidas para calcular I_F^0 en ausencia de dTMP y para cada concentración de nucleótido. Los resultados mostraron una clara disminución del valor de I_F con el aumento de la concentración de dTMP.

En la Figura 129 se muestran las gráficas de Stern-Volmer de los experimentos de estado estacionario y resueltos en el tiempo para la desactivación de la fluorescencia de *Ptr* por dTMP. Se observó que tanto I_F^0/I_F como I_F^0/I_F presentan una dependencia lineal con la concentración del nucleótido. A partir del ajuste de ambas rectas se calculó la

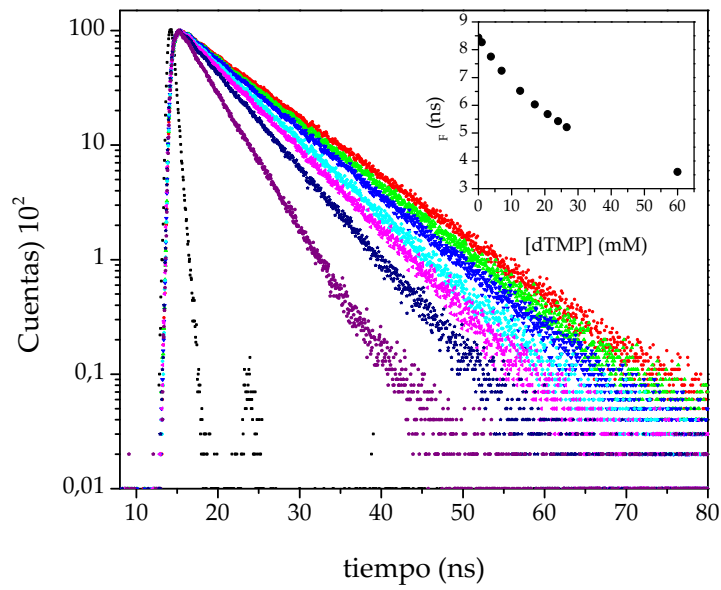


Figura 128: Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados en soluciones de *Ptr* en presencia de distintas concentraciones de *dTMP*. *Ptr* 15 M; pH = 5,5.

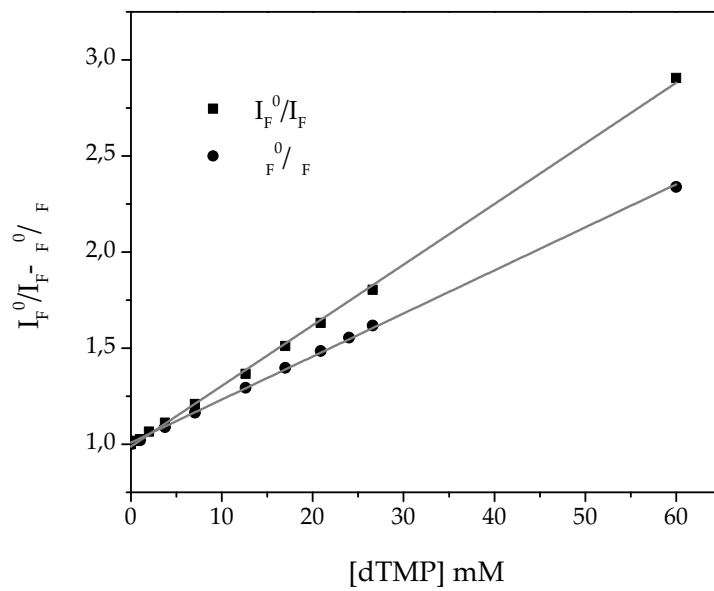


Figura 129: Gráficos de Stern-Volmer para experimentos de estado estacionario y resuelto en el tiempo para la desactivación de emisión de fluorescencia de *Ptr* por *dTMP* a pH 5,5.

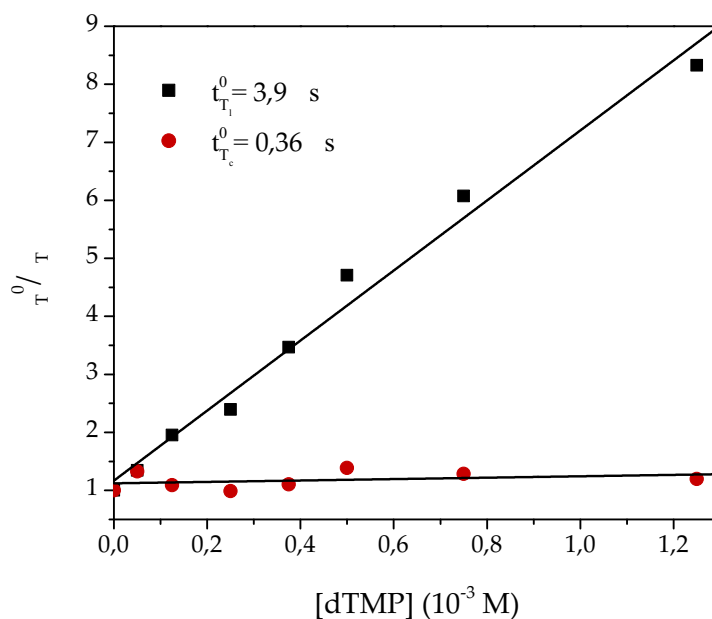


Figura 130: Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de *Ptr* por *dTMP*. t_c y t_l registrados en soluciones acuosas saturadas con Ar a pH 5,5 de *Ptr* y concentraciones crecientes de *dTMP*. λ_{exc} 430 nm; A_{355} 0,5; $[Ptr]$ 90 μ M.

constante de velocidad de desactivación total de fluorescencia por *dTMP* ($k_{t_F}^{dTMP}$) utilizando la ecuación 13 (Capítulo 1). Se obtuvieron valores similares y del orden difusional ($k_{t_F}^{dTMP}$ 3,2 0,2 $10^9 M^{-1} s^{-1}$). Éste valor es similar al reportado para k_{t_F} de *Ptr* por *dCMP* [144].

12.2.2 Desactivación de los estados excitados tripletes

Con el objetivo de estudiar la interacción de los 3Ptr con el nucleótido se plantearon experimentos de LFP para determinar la constante de desactivación total de 3Ptr por *dTMP* ($k_{t_T}^{dTMP}$). Experimentalmente se trabajó con soluciones que contenía el sensibilizador y concentraciones crecientes del nucleótido, estas mezclas fueron burbujeadas durante 20 minutos con Ar para eliminar el oxígeno del medio, y luego se registraron la señal de decaimiento de los tripletes para cada solución. Una vez procesadas las señales se obtuvieron los τ para cada concentración de *dTMP*. Luego se trazaron las correspondientes gráficas de Stern-Volmer (Figura 130). De las pendientes se calcularon los valores de las constantes de desactivación total de 3Ptr por *dTMP* ($k_{t_T}^{dTMP}$) para cada especie aplicando la ecuación 190.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{k_{t_T}^{dTMP}}{k_{t_T}} [dTMP] \quad (190)$$

Los resultados fueron los siguientes: $k_{t_{T_1}}^{dTMP}$ 1,5 0,3 $10^9 M^{-1} s^{-1}$, para la especie T_1 ; y $k_{t_{T_c}}^{dTMP}$ 0,4 0,1 $10^9 M^{-1} s^{-1}$ para la segunda especie T_c . Estos valores son del orden de lo calculado para la desactivación de los 3Ptr por nucleótidos púricos en

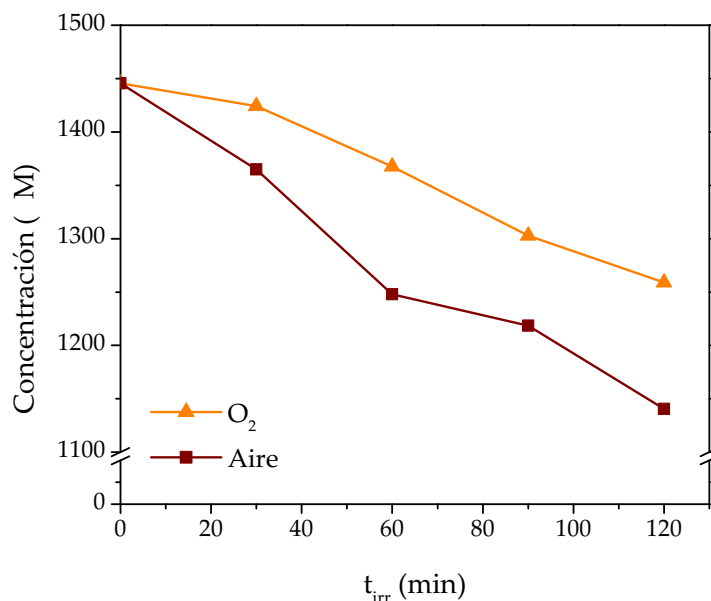


Figura 131: Evolución de la concentración de *dTMP* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas en O_2 , utilizando como sensibilizador *Ptr*. $dTMP_0 = 1,45 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 150 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

los capítulos 9 y 11. A su vez, los valores de $k_{t_T}^{dTMP}$ son comparables al valor de $k_{t_F}^{dTMP}$ determinado en la subsección 12.2.1.

Sin embargo, para la concentración utilizada en los experimentos de fotosensibilización (1 mM) el porcentaje de desactivación de 1Ptr por *dTMP* es menor al 3%; mientras que para la desactivación de los 3Ptr para la misma concentración de *dTMP* el porcentaje de desactivación de la especie T_c es menos del 13% y para la especie con T_l es mayor al 85%. Este resultado es lógico, ya que para valores similares de k_t^{dTMP} la eficiencia de desactivación estará gobernada por el τ de la especie excitada en la solución.

12.3 PARTICIPACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES

12.3.1 Rol del O_2

Se realizaron experimentos aumentando la concentración de O_2 a condiciones de saturación (1,28 mM), burbujando durante 20 minutos con O_2 soluciones que contenían *dTMP* y *Ptr*. Se cuantificó el consumo del sustrato en estas condiciones y se comparó con respecto a soluciones idénticas pero equilibradas con aire (Figura 131). Se observa que la velocidad de consumo de *dTMP* disminuye con el aumento de la concentración de O_2 . Realizando un análisis similar a los planteados para experimentos análogos llevados a cabo con los nucleótido púricos (Subsecciones 9.2.1 y 10.3.1) y, considerando que *dTMP* prácticamente no reacciona con 1O_2 ; la disminución en la velocidad de consumo del nucleótido puede atribuirse a la desactivación de los 3Ptr por O_2 . Por lo tanto, se podría pensar que éstas especies reactivas estarían involucradas en el proceso fotosensibilizado.

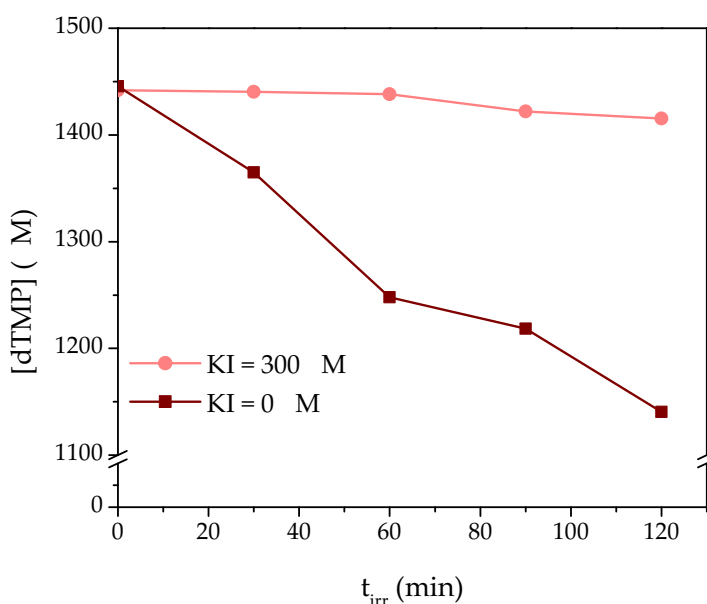


Figura 132: Evolución de la concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de 300 M de KI, utilizando como sensibilizador Ptr. $dTMP_0 = 1,45 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 150 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

12.3.2 Irradiación en presencia de yoduro de potasio

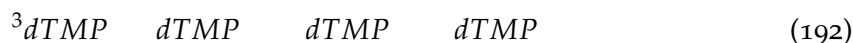
Se evaluó el estado excitado desde el cual se inicia el proceso fotosensibilizado que se lleva a cabo en presencia de O_2 , realizando experimentos en presencia de KI. En concentraciones menores a 500 M, el KI desactiva eficientemente los 3Ptr (Sección 5.2). Se realizaron entonces experimentos comparativos irradiando soluciones equilibradas con aire que contenían dTMP y Ptr en ausencia y en presencia de 300 M de KI (Figura 131). Los resultados mostraron claramente un efecto inhibitorio del KI en la velocidad de consumo de dTMP. Esto implica que la reacción entre el nucleótido y el sensibilizador se inicia desde el estado excitado triplete.

12.4 FOTSENSIBILIZACIÓN POR TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

12.4.1 Factibilidad termodinámica del proceso de transferencia electrónica fotoinducido

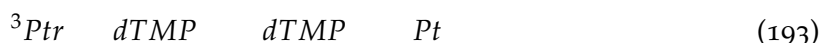
El nucleótido de timina por absorción directa de radiación UV-B genera dímeros de ciclobutil pirimidina y el aducto pirimidina (6-4) pirimidona o también llamado fotoproducto (6-4) (Subsección 2.3.3). La radiación UV-A también induce la formación de estos dímeros de pirimidina, aunque por un mecanismo diferente (Subsección 2.4.1). Que consiste en la absorción inicial de radiación por un sensibilizador apropiado que pueda formar estados excitados capaces de transferir energía a la base de timina. Para generar la base en su estado excitado triplete (reacción 191). La posterior reacción de ese triplete con

una segunda molécula de nucleótido en el estado fundamental, genera los dímeros de ciclobutil pirimidinas, principalmente dímeros de timidina (T<>T) (reacción 192).



El valor de $E_{0,0}^T$ para la timina libre necesario para que se produzca esta reacción de dimerización es de 310 KJ mol^{-1} . Por otro lado, valor $E_{0,0}^T$ para Ptr, calculado a partir del espectro de fosforescencia a 77 K, es menor que este valor (Capítulo 8 Tabla 9). Por lo que su energía no sería suficiente para que se produzcan las reacciones 191 y 192 [158].

Si se descarta un mecanismo de transferencia de energía triplete-triplete y considerando que dTMP no reacciona con ${}^1\text{O}_2$, en presencia de O_2 el proceso fotosensibilizado de dTMP inducido por Ptr debería ser iniciado por una transferencia electrónica. Además, los resultados expuestos hasta ahora indicarían que el estado excitado del sensibilizador involucrado en el proceso sería un triplete (reacción 193).



En los capítulos 9 y 10 se estimó el valor de E_{TG}^0 para nucleótidos púricos con el objetivo de evaluar la factibilidad termodinámica del proceso. Se realizó un cálculo similar para el nucleótido de timina aplicando la Ecuación 95. Considerando el potencial de oxidación reportado para dTMP ($E_{\text{dTMP}/\text{dTMP}^+} = 1,21 \text{ V vs. NHE}$), el valor de E_{TG}^0 resultó menos negativo a los valores calculados previamente para los nucleótidos púricos ($E_{TG}^0 = 100,4 \text{ KJ mol}^{-1}$), sin embargo, el proceso aún así es termodinámica favorable.

12.4.2 Irradiación en presencia de superóxido dismutasa

Se evaluó la participación del O_2 en el proceso fotosensibilizado de dTMP inducido por Ptr, siguiendo el procedimiento general descrito en la subsección 5.4.2. No se observó efecto de la presencia de SOD sobre la velocidad de consumo de dTMP (Figura 133). Este comportamiento se diferencia de lo observado para los nucleótidos de purina, donde la presencia de SOD produce una aceleración del consumo del nucleótido debido a que se elimina una vía de recuperación del sustrato. Este resultado no descarta completamente la participación del anión O_2^- en la reacción fotosensibilizada. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los nucleótidos púricos, en este caso puede afirmarse que no existe una vía para la recuperación del nucleótido que involucre al O_2^- . Por otro lado, se descarta una reacción química entre el O_2^- y dTMP. Lo cual era esperable debido a la baja reactividad del nucleótido.

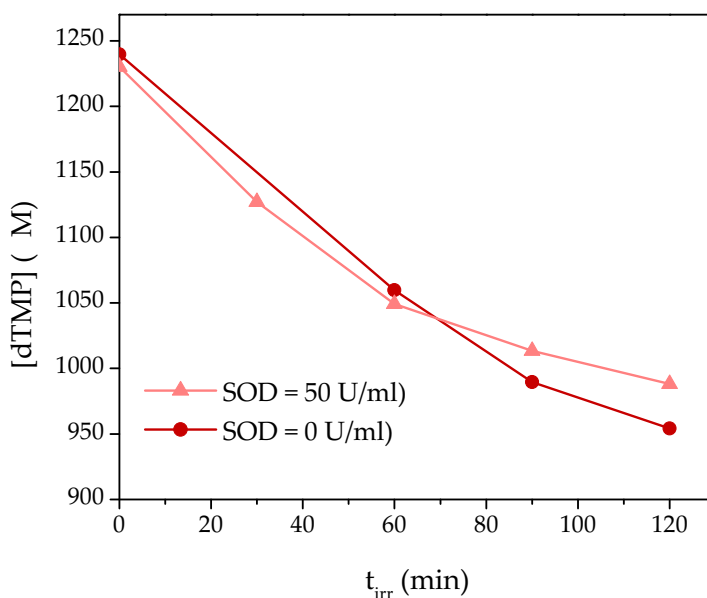
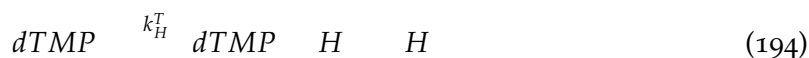


Figura 133: Evolución de la concentración de dTMP en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire sin y con el agregado de SOD, utilizando como sensibilizador Ptr. $dTMP_0 = 1,23 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 158 \text{ M}$; $SOD = 50 \text{ U/ml}$; $pH = 5,5$.

12.4.3 Investigación del radical timidina

12.4.3.1 Detección por LFP

Para encontrar evidencia directa de la transferencia electrónica entre el sensibilizador y el sustrato se plantearon experimentos para identificar la formación del radical timidina utilizando la técnica de LFP. Los cuatro nucleótidos que componen el ADN generan radicales que se pueden detectar por esta técnica, de todos ellos el radical de timidina posee el coeficiente de extinción molar más bajo de la serie de nucleótidos, por lo cual su detección se dificulta [153, 41]. Tal como ocurre con los radicales de los otros nucleótidos, en soluciones ácidas el radical catión de timidina $dTMP^+$ se deprotona rápidamente para dar el radical neutro (Ecuación 194).



Éste y los demás radicales de los nucleótidos fueron estudiados utilizando la técnica de radiólisis de pulso y generando los radicales en presencia de una solución de persulfato de potasio. En estos trabajos se determinó que el radical $dTMP^+$ posee una banda de absorción entre 300 y 400 nm, con un máximo aproximadamente en 330 nm y un $\epsilon_{330}^T = 920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En el Capítulo 8 se caracterizaron los estados excitados tripletes de una serie de pterinas entre ellas Ptr, con lo cual se sabe que en la zona de 330 nm la señal del 3Ptr es menor que cero.

Para la identificación del radical $dTMP^+$ por LFP se utilizó una solución a pH 5,5 que contenía 90 M de Ptr y 2 mM de dTMP, esta solución se burbujeó con Ar durante 20

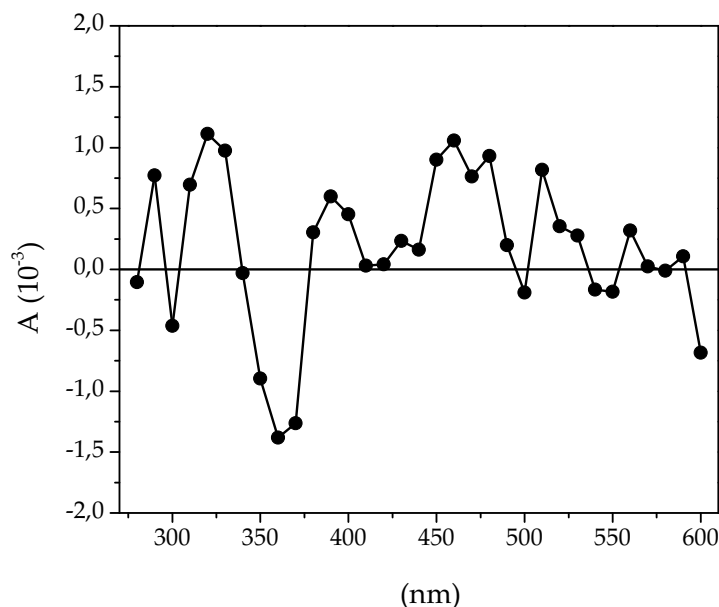


Figura 134: Espectro de absorción de transientes diferenciales, calculado como la resta entre el espectro registrado en una solución saturada en Ar de *Ptr* (90 M) y *dTMP* (2 mM) menos el espectro de *Ptr* sin agregado de *dTMP* registrados a pH 5,5, 5 s luego del disparo del láser.

minutos. Luego se expuso al pulso del láser y se registró el espectro de absorción de transientes en una escala de 10 s/división . En otro experimento similar se registró el espectro en idénticas condiciones pero de una solución que contenía solo *Ptr*. En la Figura 134 se muestra el espectro diferencia obtenido a partir de la diferencia entre los espectros de *Ptr* registrado en ausencia y en presencia de *dTMP*, registrado 5 s después del disparo del láser. Allí se observa una banda de absorción alrededor de 330 nm muy poco intensa. Estas señales, si bien presentan mucho ruido, son compatibles con las características espectrales informadas para el radical $dTMP \cdot H$.

Por otro lado, se registró la señal del transiente a 330 nm de soluciones que contenían *Ptr* en presencia y en ausencia de $1,2 \text{ mM}$ de *dTMP*. Las señales se registraron con dos escalas diferentes, 2 y 10 s/división . En la Figura 135 se muestran las trazas de LFP obtenidas para dicho experimento. A pesar que la señal es bastante baja, debido al valor del T_{330} , claramente se observa una diferencia en la señal con el agregado de *dTMP*. Además a dicha longitud de onda absorbe el estado fundamental de *Ptr*. Sin embargo, se puede observar que la señal crece a una determinada velocidad, alcanza un máximo en unos pocos s y se mantiene para luego decaer en la ventana de tiempo analizada. Se ajustó la traza registrada con la escala de 2 s/división utilizando la ecuación 97 (Subsección 9.3.3). La señal sigue una cinética de primer orden y crece con un t_f que es del orden al T_1 de *Ptr* para la concentración de *dTMP* igual a $1,2 \text{ mM}$ (Figura 136).

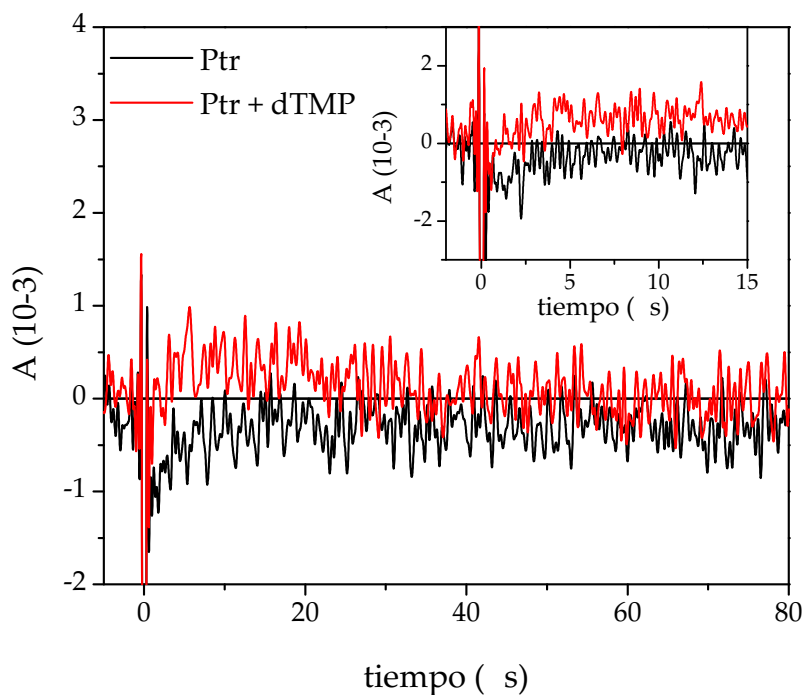


Figura 135: Evolución temporal de la señal de A_{330} registrada en en soluciones acuosas saturadas en Ar de Ptr sin y con el agregado de dTMP a pH 5,5; escala 10 s/división. Inset: escala 2 s/división. $dTMP_0=1200$ M; $Ptr_0=90$ M; $\lambda_{ana} = 330$ nm.

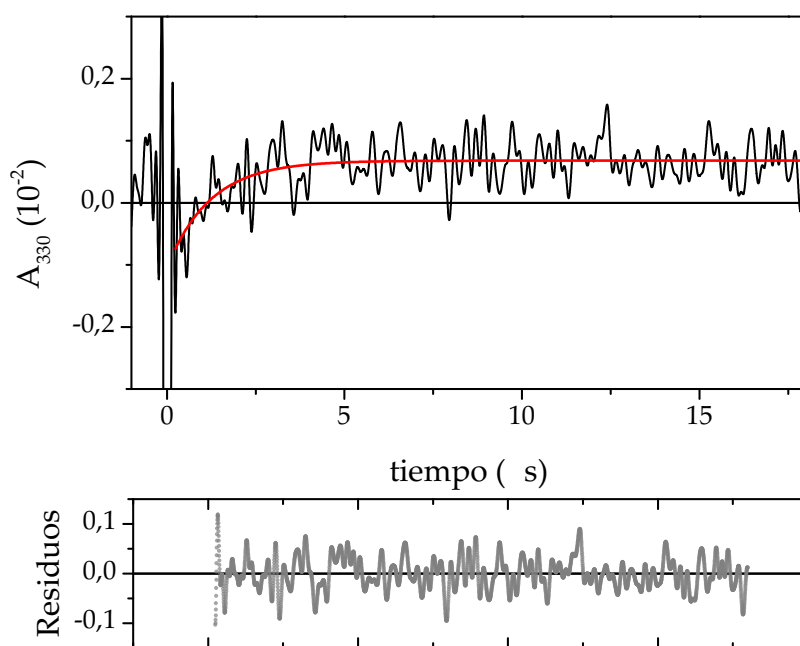
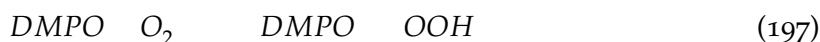


Figura 136: Evolución temporal de la señal A_{330} correspondiente al radical $dTMP^{\cdot-}$ y distribución de los residuos para el ajuste de la señal. Trazo registrada en una solución acuosa saturada en Ar a pH = 5,5 conteniendo Ptr y dTMP; escala 2 s/división; $Ptr = 90$ M; $dTMP = 1,2$ mM.

12.4.3.2 *Detección por EPR*

Para obtener otra evidencia de la formación del radical *dTMP* \dot{H} en las soluciones irradiadas en presencia de *Ptr*, se llevaron a cabo experimentos de EPR en presencia de un secuestrador selectivo (Sección 7.3). Para ello se mezclaron soluciones de *Ptr* (180 μ M), *dTMP* (1300 μ M) con DMPO (50 mM) y buffer Tris/HCl (1 mM) - NaCl (0,5 mM) (pH = 7,2). Las mezclas se burbujearon con Ar durante 20 min y luego se irradiaron del mismo modo que en los experimentos de fotosensibilización, pero durante un período de tiempo más corto (15 minutos). Las soluciones irradiadas se traspasaron a celdas de cuarzo de paredes planas especiales para las medidas de EPR. Los experimentos se realizaron en ausencia de O_2 para evitar la formación de $O_2^{\cdot -}$ que reacciona rápidamente con DMPO y genera señales muy intensas. se ha demostrado que *Ptr* bajo irradiación UV-A produce $O_2^{\cdot -}$, incluso en ausencia de sustratos oxidables. El proceso que explica este fenómeno está representado por las reacciones 195, 196 y 197. En este estudio se pretende que DMPO reaccione con el radical del nucleótido, por lo que cantidades elevadas de $O_2^{\cdot -}$ interferirán con dicha investigación.



En primer lugar, se realizaron los controles registrando la señal de EPR en soluciones conteniendo sólo *Ptr* y DMPO, sin irradiar y luego de 15 min de irradiación (Figura 137). En la solución sin irradiación no se detectó ninguna señal, mientras que en la solución irradiada se observó una señal correspondiente al espectro de EPR característico del aducto *DMPO* OOH ($a^N=14,2$ G, $a^H=11,2$ G, y $a^H=1,25$ G) proveniente de la reacción entre el anión $O_2^{\cdot -}$ y el secuestrador [159]. A pesar que las soluciones fueron burbujeadas previamente con Ar, pequeñas trazas de O_2 , que no pueden ser eliminadas o que podrían haber ingresado a la celda durante la irradiación, reaccionan muy rápidamente con *Ptr* para formar $O_2^{\cdot -}$, que forma el mencionado aducto en forma muy eficiente [160].

Posteriormente, se registraron los espectros de EPR en soluciones conteniendo *dTMP* y *Ptr* en presencia de DMPO antes y después de 15 min de irradiación (Figura 138). En la solución no irradiada no se observó ninguna señal. Sin embargo, se registró un espectro de EPR complejo luego de la irradiación. Del análisis de dicho espectro, se determinó que es una combinación de dos señales, correspondiendo una de ellas al aducto *DMPO* OOH previamente caracterizado. La segunda señal es un espectro de seis líneas cuyas constantes de acoplamiento hiperfino son $a^N=15,9$ G y $a^H=15,8$ G, y que correspondería a un radical acoplado con nitrógeno. Es decir, cuando se irradia una solución de *Ptr* y *dTMP* en presencia de DMPO se detectaron dos radicales. Uno de ellos es el $O_2^{\cdot -}$ que, como se observó en el control de la Figura 137, se forma aún en soluciones burbujeadas con Ar.

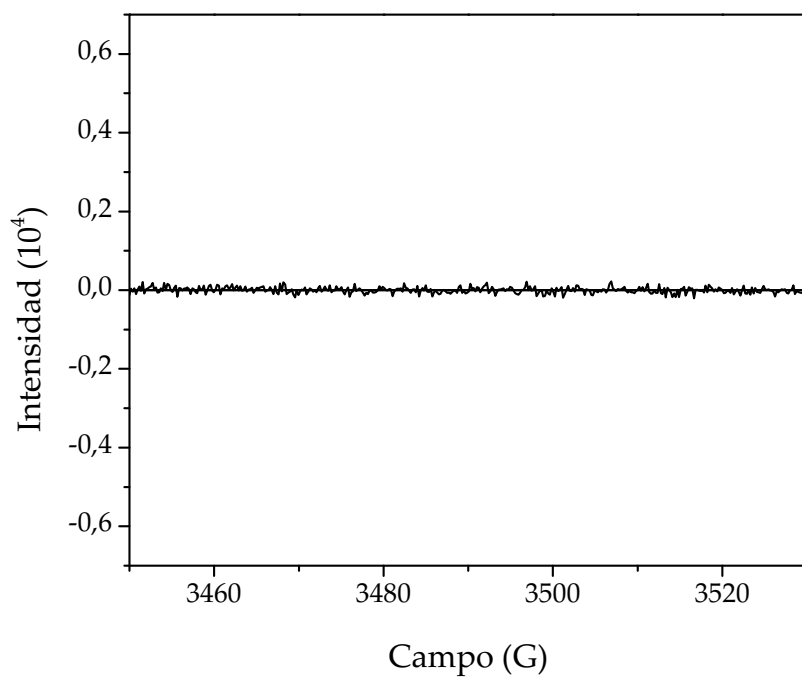
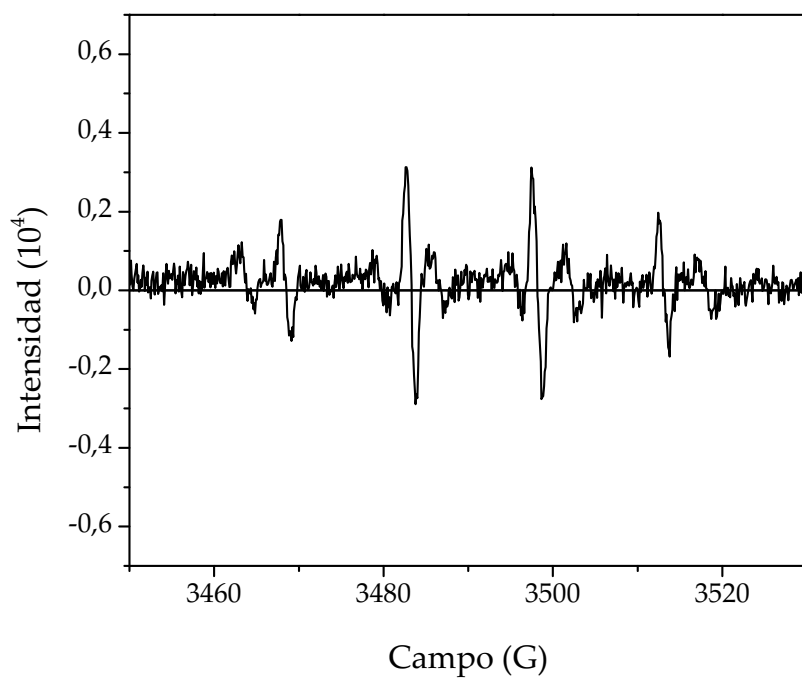
(a) t_{irr} 0 min(b) t_{irr} 15 min

Figura 137: Espectros EPR en soluciones acuosas de Ptr y DMPO sin irradiar y luego de 15 min de irradiación. $Ptr_0 = 180 \text{ M}$; $DMPO = 50 \text{ mM}$; $pH = 7,2$.

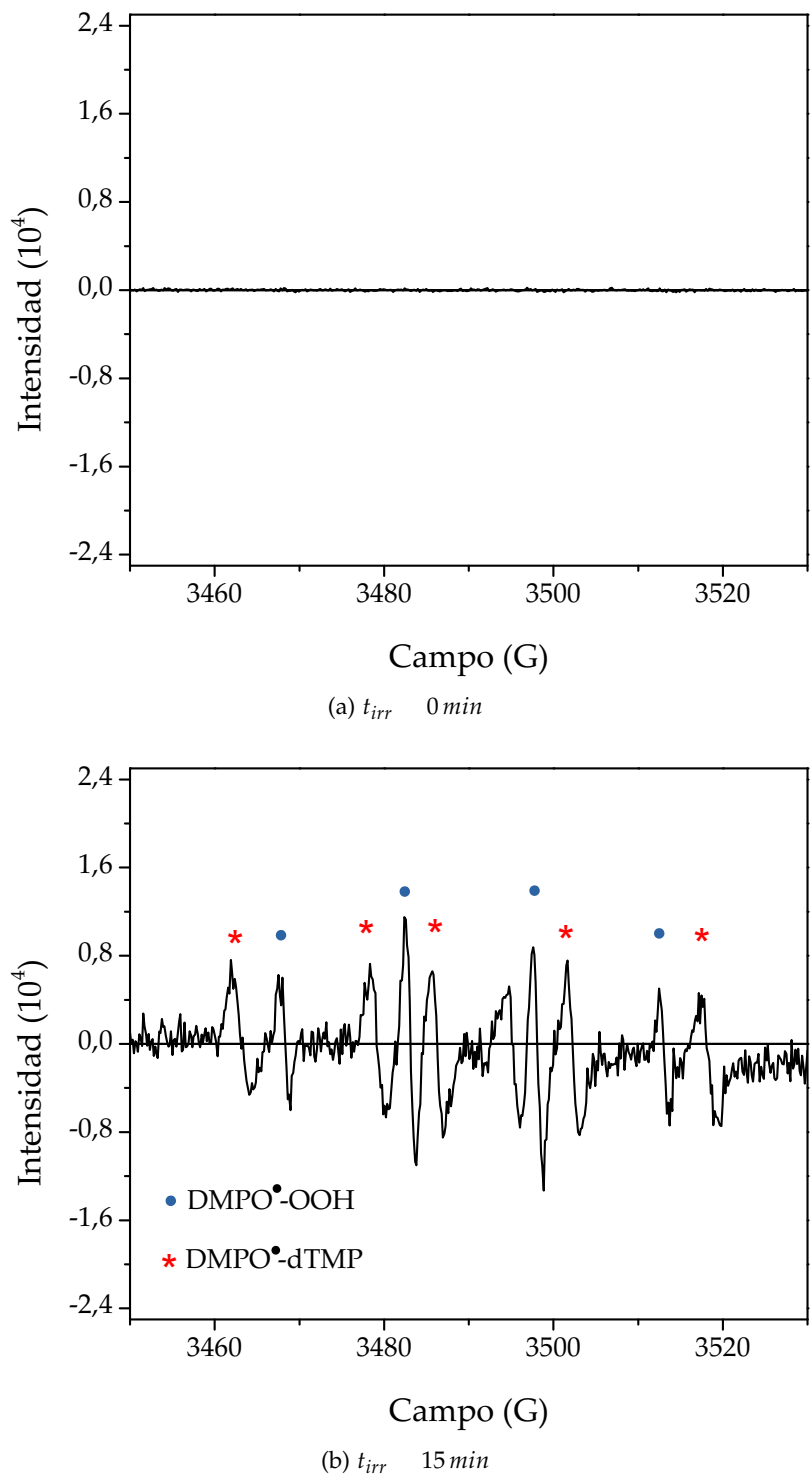


Figura 138: Espectros EPR en soluciones acuosas de *Ptr*, *dTMP* y DMPO sin irradiar y luego de 15 min de irradiación. $dTMP_0 = 1,3 \text{ mM}$; $Ptr_0 = 180 \text{ M}$; $DMPO = 50 \text{ mM}$; $pH = 7,2$.

El otro radical sólo se forma en presencia de dTMP y corresponde a un compuesto con nitrógeno. Lo cual prueba la formación de un radical proveniente de la fotosensibilización del nucleótido por Ptr.

12.5 INVESTIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN POR UPLC-MS/MS

Con el objeto de investigar los productos de la reacción fotosensibilizada, se decidió realizar un estudio de los mismos empleando la técnica UPLC, acoplada a espectrometría de masas por ESI (Sección 6.3). En este estudio se registraron y compararon los cromatogramas obtenidos con un equipo UPLC en soluciones equilibradas en aire de dTMP y Ptr con y sin irradiación (Figura 139). La Figura 139 (a) correspondiente a la muestra sin irradiar, muestra dos picos, uno a $t_r = 2,4$ minutos y otro a $t_r = 3,0$ minutos, los cuales son asignados a Ptr y dTMP, respectivamente. En Figura 139 (b), se observa la aparición de varios picos con t_r menores al de dTMP que corresponden a los productos de la reacción fotosensibilizada.

A diferencia de los experimentos realizados con dGMP (Sección 11.6), para este estudio se trabajó sólo en modo ESI⁺. Debido a que en los resultados preliminares el nucleótido se detectó mejor en este modo. En la Figura 140 se muestran los espectros MS ESI⁺ correspondientes a los reactivos, extraídos del cromatograma de la Figura 139 (a). Para el pico de $t_r = 2,4$ min se detectó el ion molecular intacto de Ptr ($M - H = Ptr - H$) a $m/z = 162,0572$ Da. También se observó la formación de dímeros de la molécula a $m/z = 325,09$ Da, que se forman durante el proceso de ionización. En el pico con $t_r = 3,08$ minutos se detectó la señal del ion molecular intacto de dTMP ($M - H = dTMP - H$) a $m/z = 321,0480$ Da.

A partir de los espectros MS ESI⁺ extraídos de los cromatogramas de las soluciones de Ptr y dTMP luego de 3 horas de irradiación se encontraron al menos tres pesos moleculares (Figura 141), todos ellos mayores que el peso molecular del nucleótido. Éstas masas corresponden a $dTMP + O - 3H$ con $m/z = 335,0302$ Da; $dTMP + O - H$ con $m/z = 337,0450$ Da y $dTMP + 2O - H$ con $m/z = 355,0556$ Da. De este primer análisis se desprende que, se produciría una oxigenación de la molécula de dTMP como consecuencia del proceso fotosensibilizado por Ptr. Teniendo en cuenta la masa de los productos a los mismos se los denominará en adelante P_{336} , P_{338} y P_{356} .

En la Figura 139 se muestran los cromatogramas registrados con el detector MS fijo en los valores de m/z correspondiente a cada masa encontrada en los espectros MS ESI⁺. Registrados en una solución de Ptr y dTMP equilibrada con aire luego de 3 horas de irradiación. En el cromatograma con $m/z = 337,0450$ Da se observan tres tiempos de retención diferentes, es decir que hay tres productos diferentes con el mismo peso molecular que podrían ser isómeros que incorporaron un átomo de O en posiciones diferentes. Esto mismo ocurre para el valor de $m/z = 355,0556$ Da, donde se observan dos productos diferentes con el mismo peso molecular.

En la Figura 143 se muestran los espectros de MS/MS ESI⁺ (Sección 6.3) de los reacti-

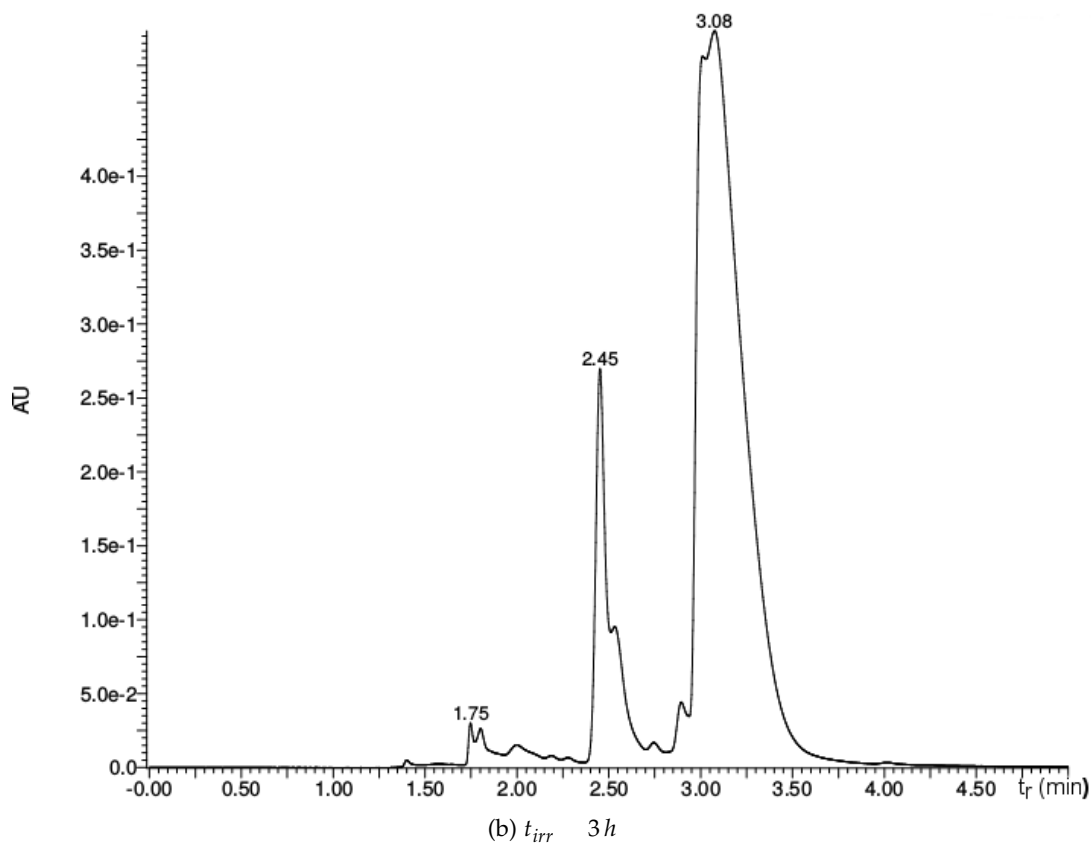
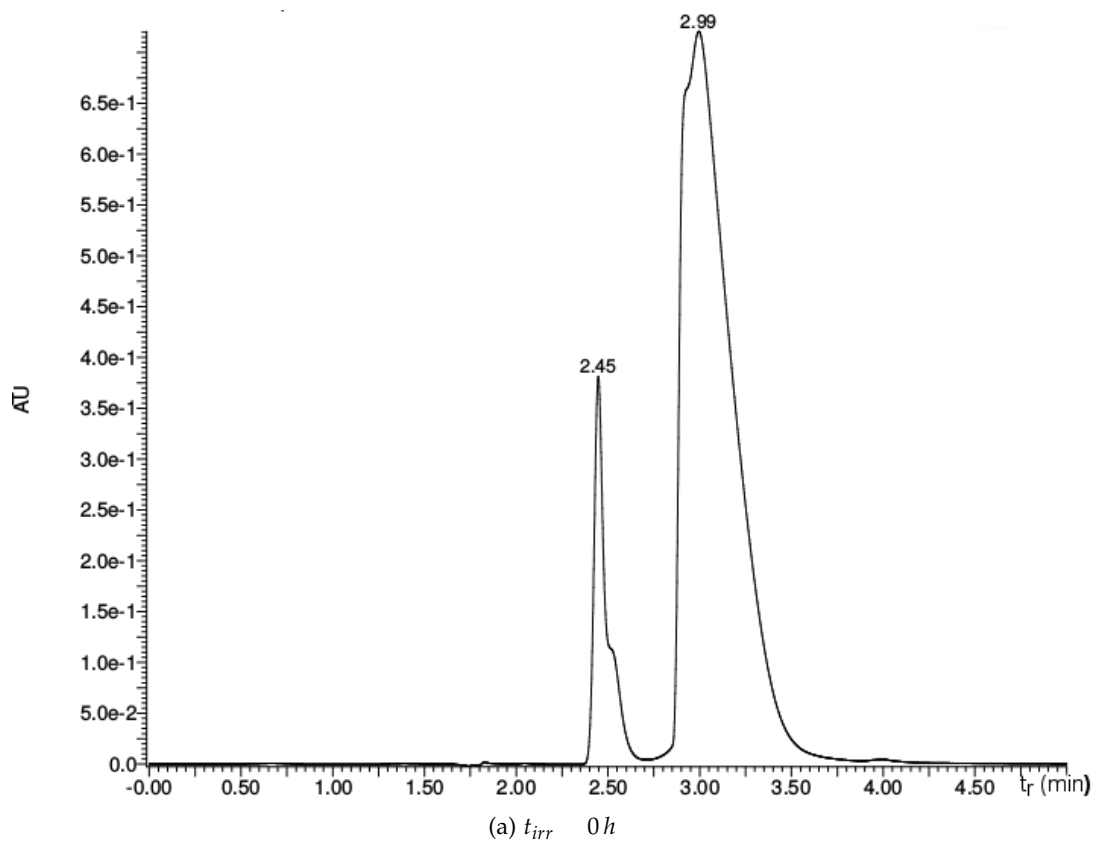


Figura 139: Cromatogramas registrados para una solución equilibrada en aire de *Ptr* y *dTMP* sin irradiar y luego de 3 horas de irradiación. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M; pH= 5,5; λ_{ana} 250 nm.

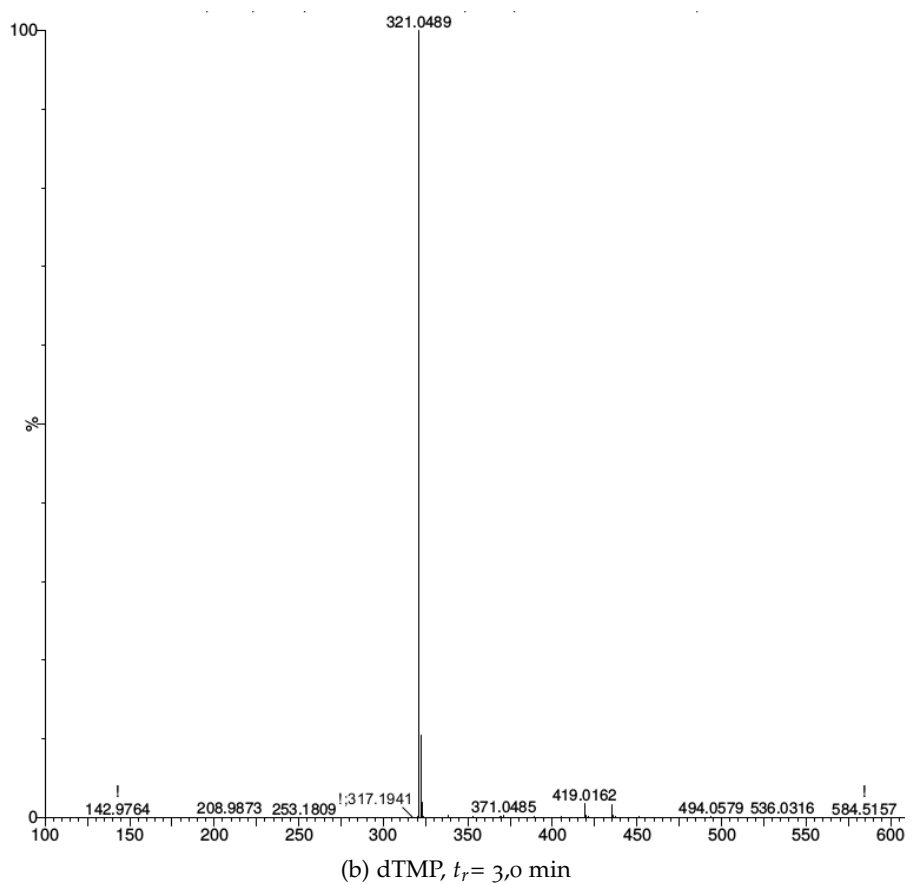
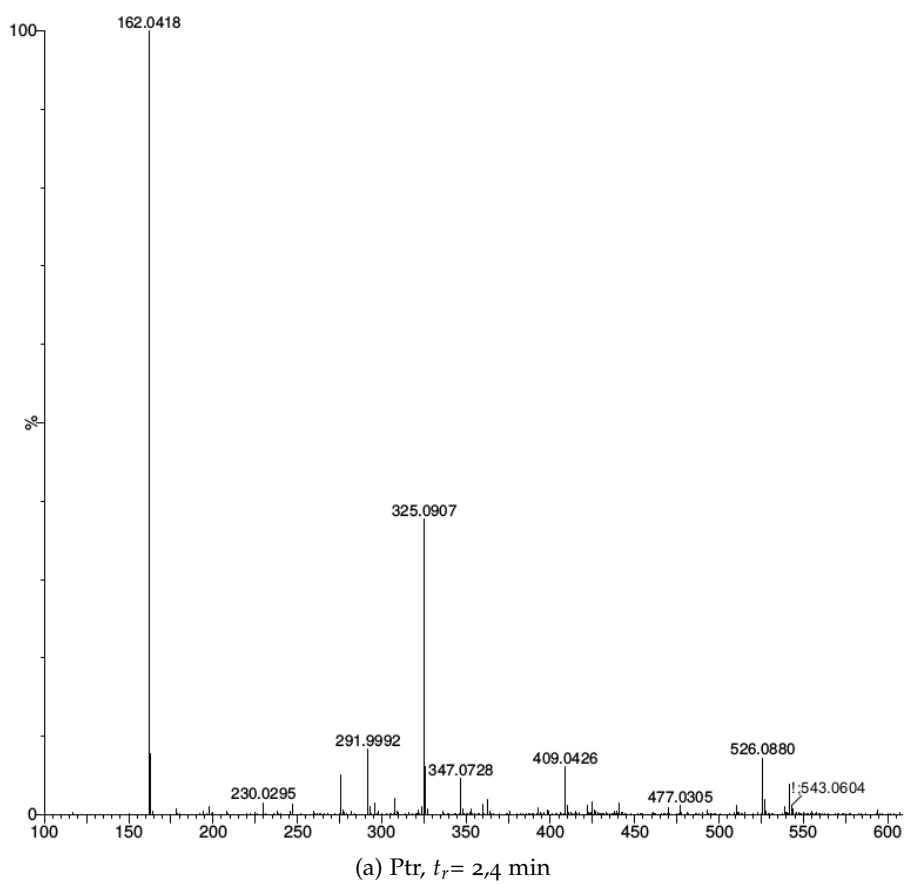


Figura 140: Espectros MS ESI de Ptr y dTMP. Extraídos del cromatograma registrado en soluciones de dTMP y Ptr equilibradas en aire sin irradiar. $dTMP_0 = 1$ mM; $Ptr_0 = 150$ M; $pH = 5,5$.

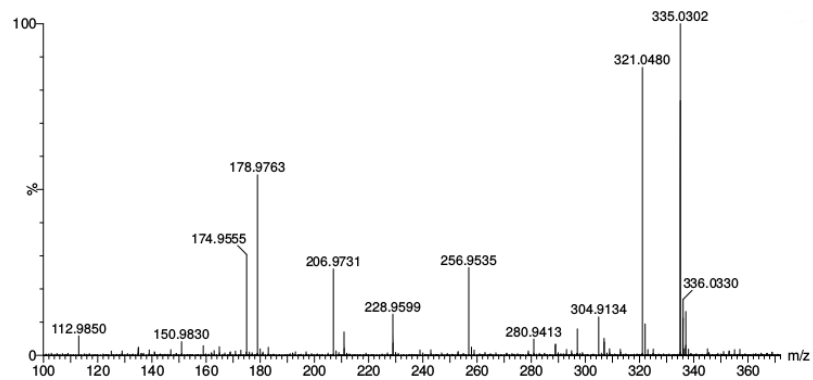
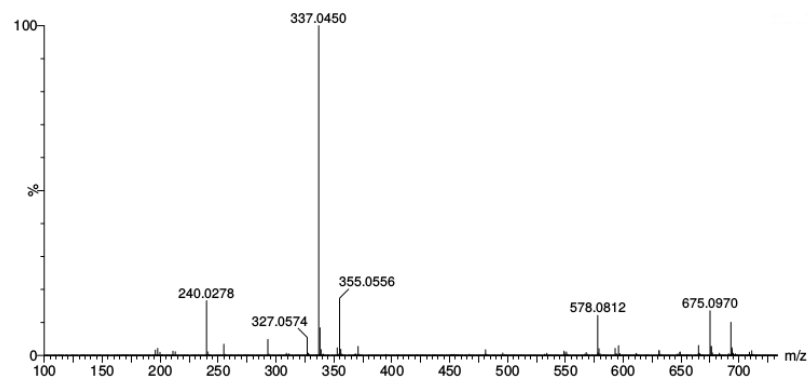
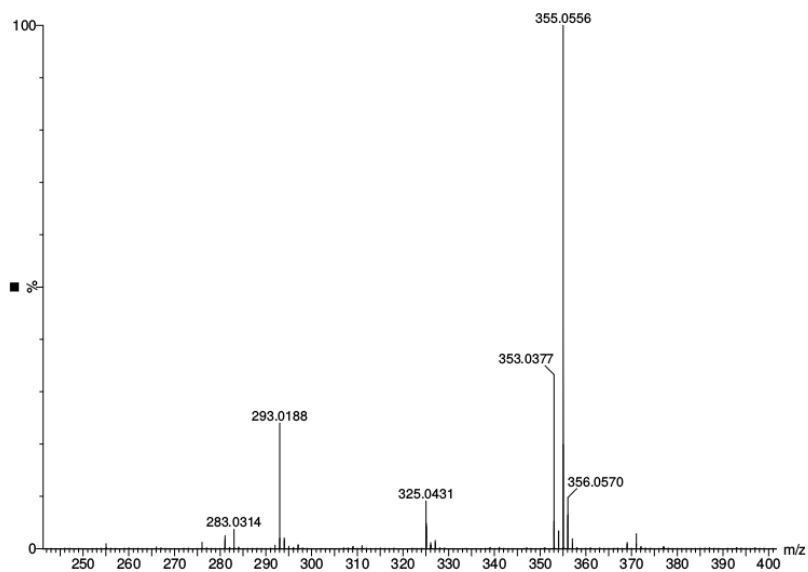
(a) t_r 3,1 min(b) t_r 2,2 min(c) t_r 2,4 min

Figura 141: Espectros MS ESI de los productos de la reacción fotosensibilizada de *dTMP* por *Ptr*. Extraídos de los cromatogramas correspondientes a cada t_r . Registrados en soluciones de *dTMP* y *Ptr* saturadas equilibradas con aire, irradiadas durante 3 horas. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M; pH = 5,5.

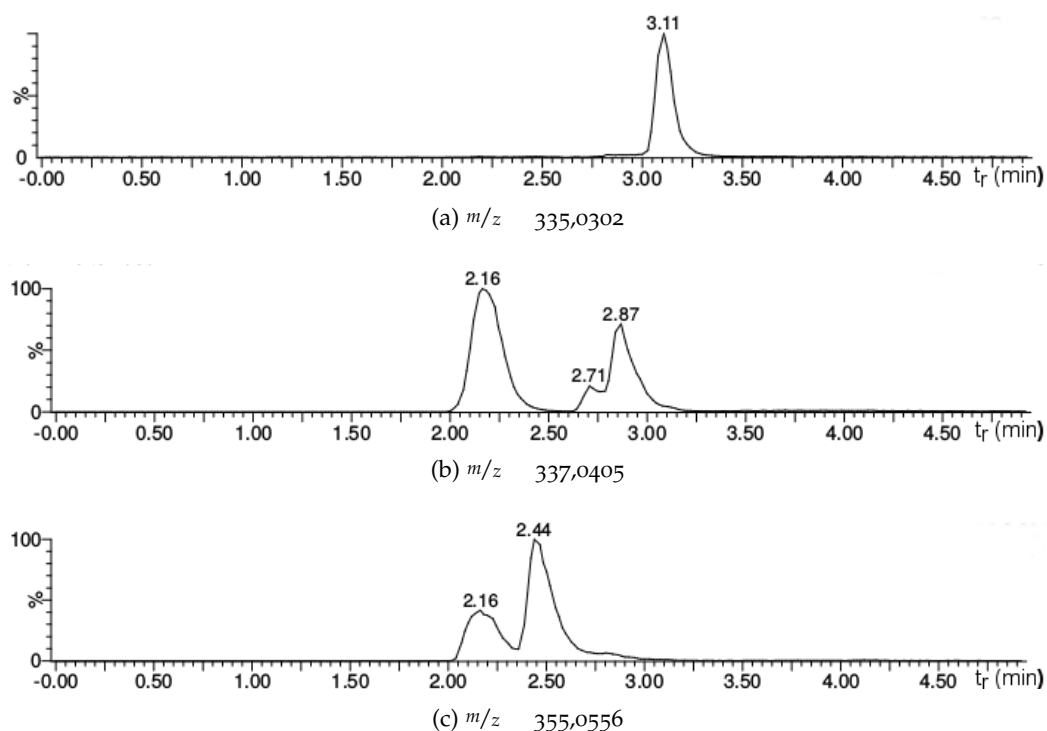


Figura 142: Cromatogramas registrados con el detector MS fijo en el valor de m/z correspondiente a cada producto, en una solución equilibrada en aire de Ptr y dTMP luego de 3 horas de irradiación. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M.

vos iniciales, Ptr y dTMP, donde se observó el patrón de fragmentación típico para cada uno de ellos. En particular el espectro MS/MS de dTMP muestra tres señales principales que se pueden asignar a los fragmentos correspondientes a: i) la base nitrogenada (m/z 125,0339 Da); ii) la desoxiribosa monofosfato (m/z 195,0060 Da); y iii) el fosfato (m/z 96,9686 Da). Además se observaron dos señales más que corresponden a éstas dos últimas, la desoxiribosa monofosfato y el fosfato, luego de la pérdida de una molécula de H_2O a m/z 176,9957 Da y a m/z 78,9566 Da, respectivamente.

Utilizando una solución de Ptr y dTMP equilibrada con aire luego de 3 horas de irradiación, se registraron los espectros MS/MS para las masas encontradas en los espectros MS ESI (Figura 144). En el caso de P_{336} se observaron dos fragmentos principales uno con m/z 195,0060 Da y otro con m/z 139,0150 Da; que corresponden a la desoxiribosa monofosfato y a la base nitrogenada con la incorporación de un O y pérdida de dos H, respectivamente (Figura 144 (a)). El peso molecular y la estructura química se encuentra representado en la Figura 144. Esta estructura coincide con lo reportado en la literatura para reacciones fotosensibilizadas Tipo I [15, 158, 42] y por lo tanto P_{336} se puede asignar al producto conocido como FordUrd (Sección 2.4).

Por otro lado, cuando el producto P_{338} se fragmenta genera varias señales, de las cuales una con m/z 195,0060 Da corresponde nuevamente a la desoxiribosa monofosfato intacta, y otra con m/z 141,0289 Da; se asignó a la base con la incorporación de un átomo de O (Figura 144 b)). Además están presentes las señales correspondientes a la fragmentación

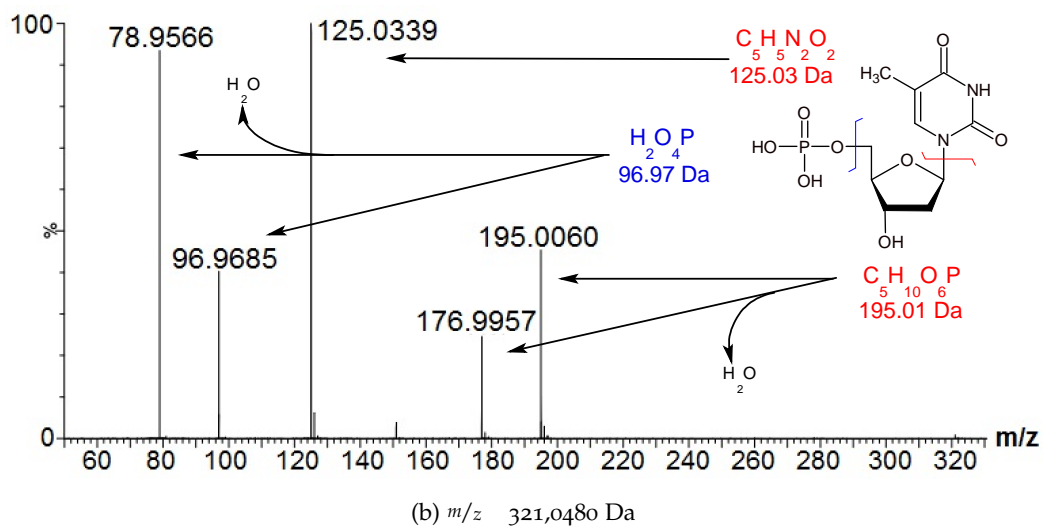
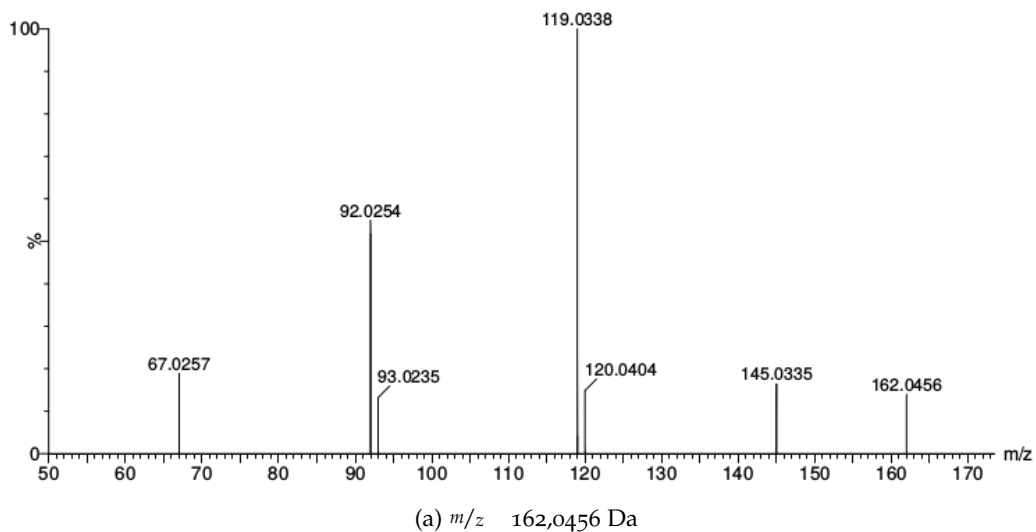


Figura 143: Espectros MS/MS *ESI* correspondiente a los reactivos, *Ptr* y *dTMP*, registrados en una solución equilibrada con aire de *Ptr* y *dTMP* sin irradiar. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M. Estructura química y fragmentación de *dTMP*.

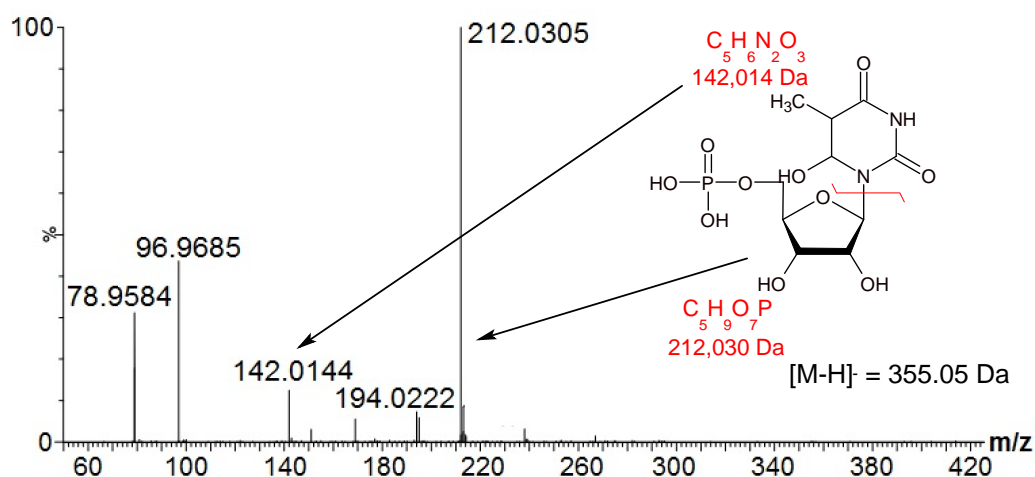
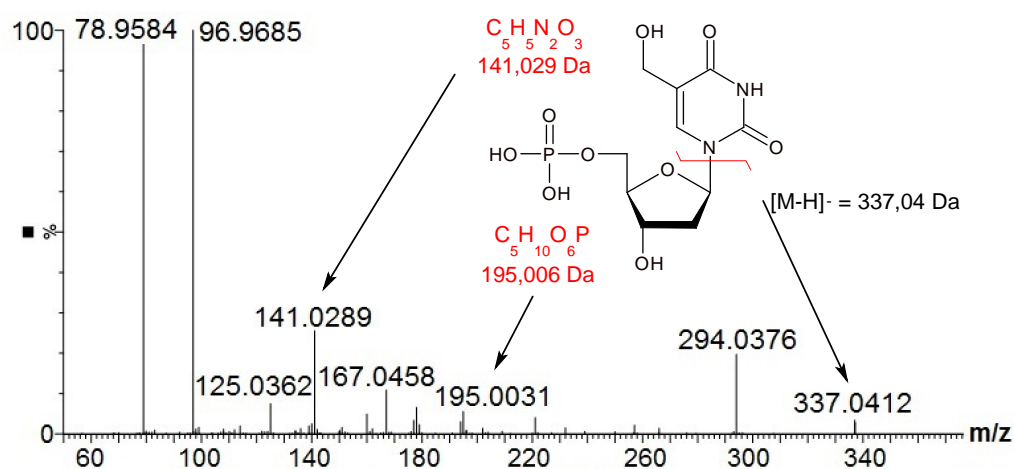
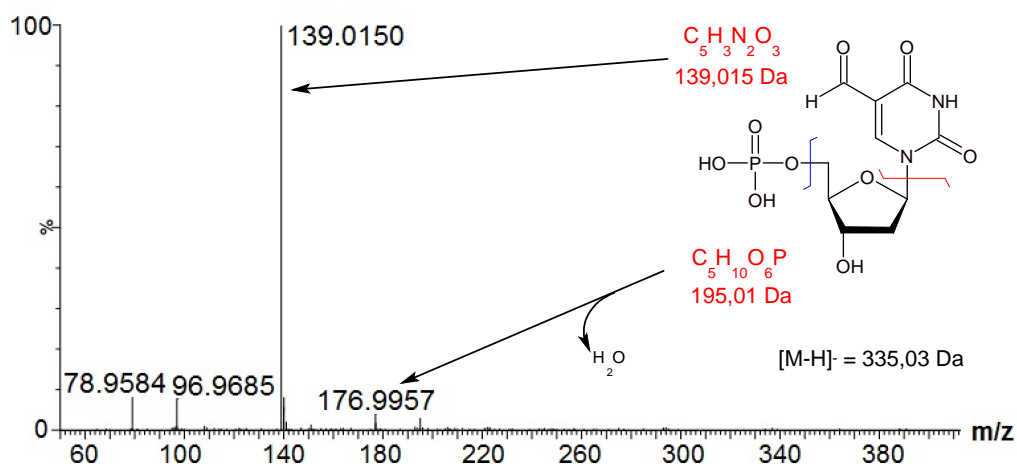


Figura 144: Espectros MS/MS ESI de los productos registrados a partir de una solución equilibrada con aire que contenía dTMP y Ptr luego de 3 horas de irradiación. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M. Estructuras químicas y fragmentos de los correspondientes productos.

del azúcar y el fosfato con la pérdida de una molécula de H_2O . Similares a las observadas en el espectro MS/MS de *dTMP*. Como se dijo anteriormente este átomo de O se puede incorporar en diferentes posiciones y generar distintos productos con el mismo peso molecular. Sin embargo, los espectros MSMS registrados a diferentes t_r mostraron el mismo patrón de fragmentación. En base a estos resultados y considerando los antecedentes en la bibliografía se asignó una estructura química probable para P_{338} . Este producto corresponde a *HMdUrd*, en base a trabajos realizados para la fotooxidación de *dTMP* inducida por benzofenona mediante un mecanismo Tipo I. Allí y en otros trabajos se encuentra reportada la estructura química de este y otros productos de oxidación de *dTMP* [15, 158, 42].

Por último, en el espectro MS/MS del producto P_{356} se observan varios fragmentos, pero ninguno corresponde a la desoxiribosa monofosfato (Figura 144 c)). En este caso, se observó una señal con $m/z = 212,0305$ Da que correspondería a la incorporación de un OH en el azúcar; sin embargo, el producto incorpora en total 2 átomos de O y dos átomos de H. Si el análisis anterior es correcto se debería observar una señal correspondiente a la base con la incorporación de un OH. Esta señal se encontró en el espectro MS/MS de P_{356} con un $m/z = 142,0144$ Da. Además no está presente la señal correspondientes a la fragmentación del azúcar con la pérdida de H_2O . Mientras que sí se observó la señal del fosfato ($m/z = 96,9685$ Da) y luego de la pérdida de H_2O ($m/z = 78,9584$ Da). Similares a las señales observadas en el espectro MS/MS de *dTMP*. Para este producto en particular esta reportado en la literatura un producto con el mismo peso molecular, pero con la incorporación de los 2 átomos de O y los dos átomos de H en la base nitrogenada. Sin embargo, esta estructura no coincide con los resultados presentados. Por otro lado, la incorporación de un OH en la desoxiribosa es un reacción que se ha reportado para *dGMP* [158, 42]. Dado que los OH se pueden incorporar en diferentes posiciones y generar distintos productos con el mismo peso molecular, se registraron los espectros MSMS a diferentes t_r . Sin embargo, mostraron el mismo patrón de fragmentación. En este caso tampoco se logró diferenciar los productos formados. En la Figura 144 (c) se propone una posible estructura química para el producto P_{356} en base a las señales de los fragmentos observados en el espectro MS/MS.

Con estos resultados se confirma que en la reacción fotosensibilizada de *dTMP* inducida por *Ptr* se generan productos oxigenados, es decir que se incorporaron átomos de O en la estructura del sustrato. A través de los espectros MS/MS de los productos se pudo determinar que esa oxigenación se produce no solo en la base nitrogenada del nucleótido, como se ha reportado en la literatura, sino también en el azúcar unido a la base.

12.6 MECANISMO DE REACCIÓN

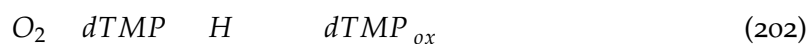
Durante el desarrollo de este capítulo se pudo demostrar, por primera vez que, en medio ácido *Ptr* es capaz de fotosensibilizar nucleótidos de pirimidina, en particular *dTMP*. El mecanismo por el cual se produce la degradación del nucleótido se puede clasificar

como un mecanismo Tipo I. Similar en sus etapas iniciales al mecanismo de fotosensibilización de nucleótidos púricos.

El mecanismo comienza con la absorción de un fotón por parte de Ptr en el estado fundamental, para dar el sensibilizador en el estado singulete excitado (1Ptr), que luego por ISC genera los estados excitados tripletes (3Ptr) (reacción 198). Este último por una transferencia electrónica desde dTMP hacia 3Ptr se forman los correspondientes pares radicales $dTMP$ y Ptr (reacción 199). En medio ácido, el radical catión pierde un protón para generar el radical neutro de dTMP ($dTMP - H$) (reacción 200).

Este radical no reacciona con O_2 para recuperar el nucleótido, como lo hacen los radicales de los nucleótidos púricos. Dado que la velocidad de consumo de dTMP en los experimentos de irradiación continua no se modifica por la presencia de SOD. Es muy probable que ambos radicales no reaccionen para generar productos. Por ende la formación de los productos debería originarse por reacción de $dTMP - H$ con O_2 o con el solvente, en este caso H_2O (reacciones 202 y 203).

Los productos detectados, en todos los casos, corresponden a moléculas que incorporaron oxígeno a su estructura. La porción más susceptible a ser oxidada es la base nitrogenada, todos los productos incorporaron átomos de oxígeno en ella. Sin embargo uno de ellos muestra oxigenación también en el azúcar. Lo cual es muy interesante porque hasta el momento no se habían descripto reacciones de dTMP que involucren modificaciones en dicha porción de la molécula.



FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 2'-DESOXITIMIDINA 5'-MONOFOSFATO INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE OXÍGENO

En el capítulo 12 se estudió el proceso de fotosensibilización de dTMP inducido por Ptr en presencia de O_2 ; se investigaron los fotoproductos y se planteó un mecanismo de reacción que fue clasificado como una fotooxidación Tipo I. Además se mencionó que la reacción fotosensibilizada ocurre también en ausencia de O_2 , lo cual es interesante porque hasta el momento no han sido reportadas fotosensibilizaciones de biomoléculas por pterinas que tengan lugar en condiciones anaeróbicas.

El objetivo del presente capítulo es justamente estudiar el proceso fotosensibilizado inducido por Ptr que se lleva a cabo sin la participación del O_2 . Análogamente a lo expuesto en capítulos anteriores, se realizaron experimentos de irradiación estacionaria en los cuales soluciones acuosas conteniendo el nucleótido, y Ptr se expusieron a radiación UV-A en diferentes períodos de tiempo, pero, en este caso, las soluciones fueron burbujeadas con Ar antes de ser irradiadas. Las soluciones tratadas se analizaron por HPLC para cuantificar el consumo del sustrato y del sensibilizador. Por último, se identificaron los productos de la reacción fotosensibilizada por UPLC-MS/MS. Además, se caracterizaron algunas de sus propiedades fotofísicas por espectrofluorometría y por HPLC acoplado a un detector FL. El análisis de los resultados se enfocará en la dilucidación de los mecanismos de reacción y caracterización de los productos de reacción.

13.1 FOTOSENSIBILIZACIÓN DE dTMP EN CONDICIONES ANAERÓBICAS

13.1.1 *Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar dTMP en ausencia de O_2*

En el capítulo 12 se realizaron experimentos típicos de fotosensibilización en medio ácido (pH 5.5) para evaluar la participación del O_2 en el proceso fotosensibilizado de dTMP inducido por Ptr. Para ello se irradiaron soluciones acuosas de Ptr y dTMP en ausencia de O_2 y se compararon con soluciones irradiadas de las mismas concentraciones de Ptr y dTMP equilibradas con aire. En la Figura 123 (Subsección 12.1.1) se compararon los perfiles de concentración de dTMP en presencia y en ausencia de O_2 , mostrando un consumo apreciable del nucleótido en condiciones anaeróbicas. Este comportamiento no había sido observado anteriormente para ninguna reacción de fotosensibilización de nucleótidos inducido por Ptr. En este mismo experimento, se analizaron los perfiles de concentración de Ptr para ambas condiciones donde se observó consumo del fotosensibilizador en condiciones anaeróbica, incluso mayor que el registrado para soluciones aireadas. Teniendo

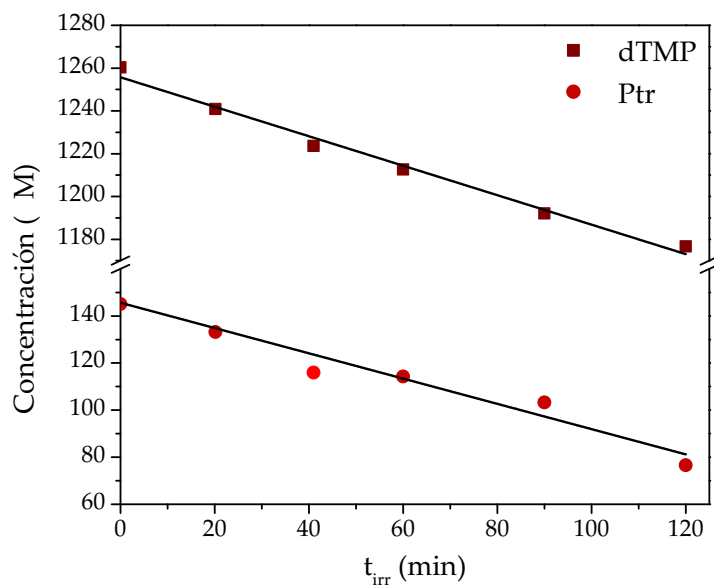


Figura 145: Velocidad de consumo de *dTMP* y *Ptr* a pH 5,5 en Ar.

en cuenta que en ausencia de O_2 no existe fotólisis de la molécula de *Ptr*, los resultados sugieren que existe una reacción fotoquímica, independiente de O_2 , en la cual *dTMP* y *Ptr* reaccionan y se consumen.

Para obtener más información sobre este proceso, se realizaron nuevos experimentos en distintas condiciones experimentales, pero siempre en ausencia de O_2 . A partir de los perfiles de concentración de se calcularon las velocidades iniciales de consumo de los reactivos ($\frac{R}{t}_0$), *Ptr* y *dTMP*, realizando una regresión lineal con los puntos de las curvas de la Figura 145. La $\frac{Ptr}{t}_0$ en estas condiciones fue de $0,6 \pm 0,1 \text{ M min}^{-1}$, mientras que para el nucleótido $\frac{dTMP}{t}_0$ fue igual a $0,7 \pm 0,1 \text{ M min}^{-1}$. Dentro del error experimental, las velocidades de consumo de los reactivos son prácticamente iguales. Lo cual sugiere que por cada molécula de *Ptr* que se consume, reacciona una molécula de *dTMP*.

En la Figura 146 se muestra el cromatograma de una solución de *dTMP* y *Ptr* a pH 5,5 saturada con Ar sin irradiar y luego de 2 horas de irradiación. De allí se extrajo el espectro de absorción del pico que corresponde al producto con $t_r=11,8$ minutos, al que denominaremos de ahora en adelante, P_{483} . El cromatograma muestra la formación de otros productos con tiempo de retención menores, sin embargo el análisis se centrará principalmente en el producto mayoritario P_{483} . En el inset de la Figura 146 se muestra el espectro de absorción de P_{483} , el cual posee dos bandas, una de mayor energía con un máximo aproximadamente en 280 nm, y otra de menor energía con un máximo en 330 nm. Este espectro resultó muy similar al que presentan las pterinas (Sección 3). Por lo tanto, se podría pensar que la molécula precursora del este producto podría ser una pterina que, durante la reacción química no se modificaría demasiado ya que conserva las propiedades espectroscópicas del cromóforo.

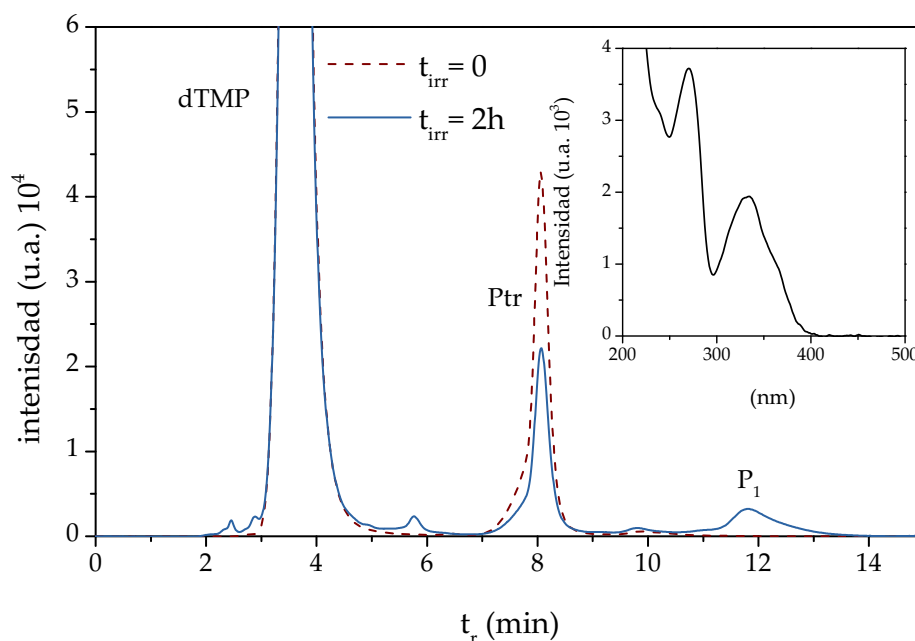


Figura 146: Cromatogramas de soluciones de dTMP y Ptr saturadas con Ar, sin irradiar y luego de 2 horas de irradiación. *Inset*: Espectro de absorción para el producto con $t_r=11,8$ min (P_{488}).

13.1.2 Controles

Los experimentos de control realizados en la Sección 12.1.2, descartaron la reacción térmica entre Ptr y dTMP. En esta sección, en particular se realizó un control que consistió exponer a radiación UV-A soluciones acuosas ácidas (pH 5,5) libres de O_2 que contenían $720 \text{ } \mu\text{M}$ de dTMP. A distintos tiempos de irradiación se registraron espectros UV-visible y se tomaron muestras para cuantificar el cambio de la concentración por HPLC (Figura 147). No se observaron cambios en los espectros ni en la concentración de dTMP, tampoco formación de productos, indicando que no se produjeron cambios químicos en la molécula en presencia de luz y sin en sensibilizador. Este resultado es lógico ya que el nucleótido no absorbe radiación a longitudes de onda mayores a 300 nm, pero al trabajar con concentraciones de dTMP del orden de 1mM es necesario descartar cualquier efecto debido a la absorción directa de radiación. Además al trabajar con una mayor intensidad de radiación, también hay que descartar un efecto térmico debido al calor disipado por las lámparas utilizadas.

Si bien Ptr está aceptada como fotoestable en condiciones anaeróbicas, fue necesario descartar una contribución de su fotólisis o degradación en dichas condiciones. Se utilizaron dos mezclas que contenían la misma concentración de Ptr inicial ($150 \text{ } \mu\text{M}$), una de ellas con el agregado de 1 mM de dTMP. Luego estas soluciones fueron expuestas a la radiación durante diferentes períodos de tiempo. Cuantificando el consumo en ambas condiciones se pudo corroborar que la presencia de dTMP efectivamente produce la degradación de Ptr en ausencia de O_2 (Figura 148). El pequeño consumo de Ptr que se

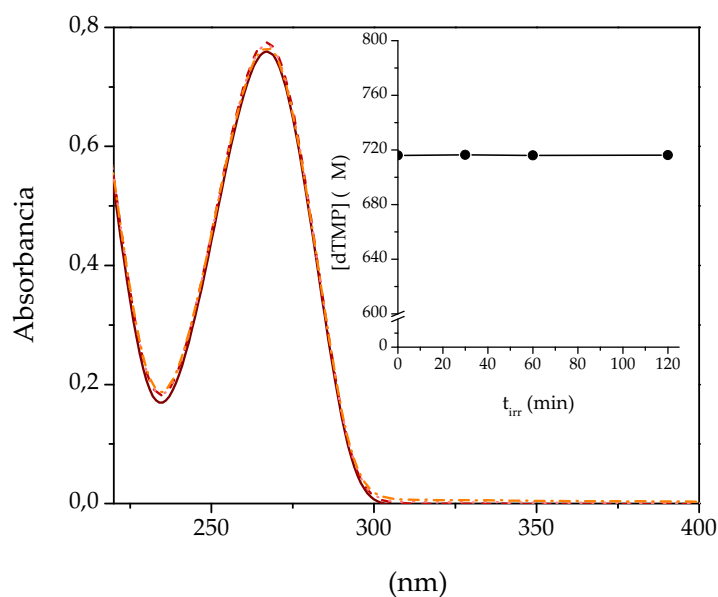


Figura 147: Espectros de absorción de soluciones de *dTMP* saturadas con Ar expuestas bajo radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min). *Inset*: Concentración de *dTMP* en función del tiempo de irradiación determinada por HPLC. $dTMP_0 = 720 \text{ M}$; $pH = 5,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; camino óptico = 0,2 cm.

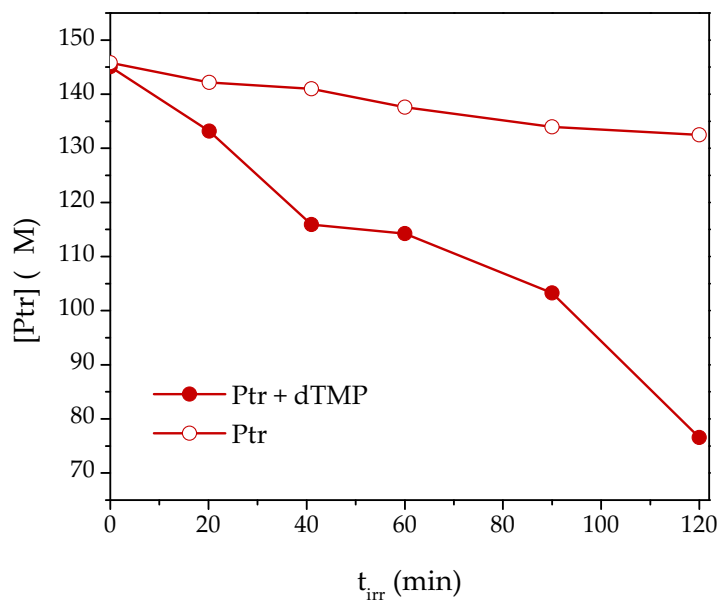


Figura 148: Evolución de la concentración de *Ptr* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con Ar sin y con el agregado de *dTMP*. $dTMP_0 = 1260 \text{ M}$; $Ptr_0 = 145 \text{ M}$.

observa en las soluciones sin dTMP puede deberse a trazas de O_2 que pudieron ingresar a la celda durante la irradiación.

13.2 PARTICIPACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES

En la Sección 12.2 se estudió la interacción de los estados excitados singlete y triplete de Ptr con dTMP por espectrofluorimetría y LFP, respectivamente. Allí se determinaron las constantes de desactivación de los estados excitados por el nucleótido, resultando todas del orden difusional. Se determinó además que, en las concentraciones de dTMP utilizadas en los experimentos de fotosensibilización, el estado excitado que participa en este proceso es el triplete de tiempo de vida largo de Ptr.

13.2.1 Irradiación en presencia de yoduro de potasio

Análogamente a los estudios realizados para las reacciones fotosensibilizadas descritas anteriormente, para investigar la participación de los tripletes de Ptr en el proceso fotosensibilizado en ausencia de O_2 , se realizaron fotólisis en presencia de KI (300 M) (Sección 5.4.1). Los resultados comparativos mostraron claramente el efecto inhibitorio de la presencia de KI en la velocidad de consumo de ambos reactivos, dTMP y Ptr (Figura 149). Esto implica que la reacción entre el nucleótido y el sensibilizador se inicia desde el estado excitado triplete.

13.3 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS

13.3.1 Investigación mediante HPLC-FL

Se registraron cromatogramas de soluciones de Ptr y dTMP irradiadas utilizando el detector FL acoplado al HPLC en busca de productos que posean propiedades fluorescentes. En la Figura 150 se comparan los cromatogramas de soluciones de Ptr y dTMP a pH 5,5 saturadas en Ar sin irradiar y luego de 2 horas de irradiación utilizando dos sistemas de detección, PDA (Figura 150 (a)) y FL (Figura 150 (b)). La fluorescencia se detectó utilizando como $\lambda_{exc} = 330$ nm y registrando la emisión a 450 nm, λ_{emi} . En estas condiciones se observan varios picos, el de mayor intensidad corresponde a la Ptr el cual luego de 2 horas de irradiación disminuye su intensidad en aproximadamente un 50%. Por otro lado, se puede apreciar que hay más de un producto con propiedades fluorescentes que no se logran ver cuando se analiza el mismo cromatograma utilizando el detector PDA. Probablemente por que se forman en una proporción muy pequeña y el detector PDA tiene una sensibilidad menor con respecto al detector FL. A partir de la comparación de los cromatogramas registrados con ambos detectores se puede concluir que, el pico con $t_r = 11,8$ min, que anteriormente había sido asignado al producto P_{483} (Sección 13.1.1), no solo posee un espectro similar al de las pterinas sino que también emite fluorescencia a

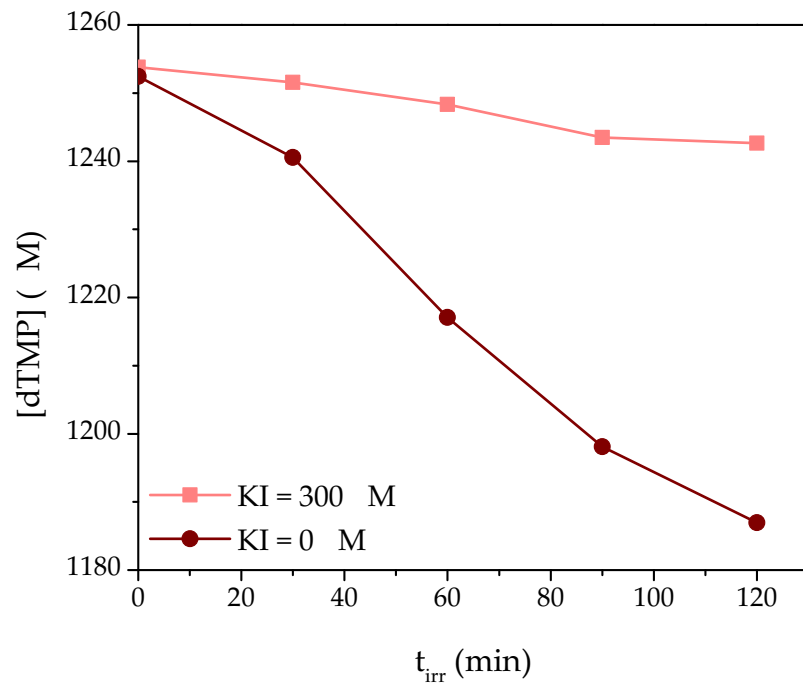
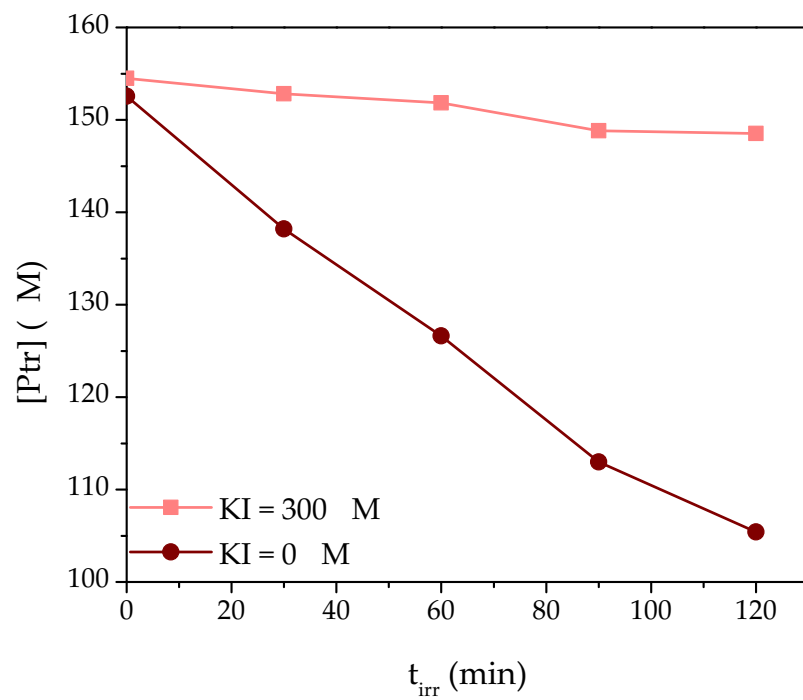
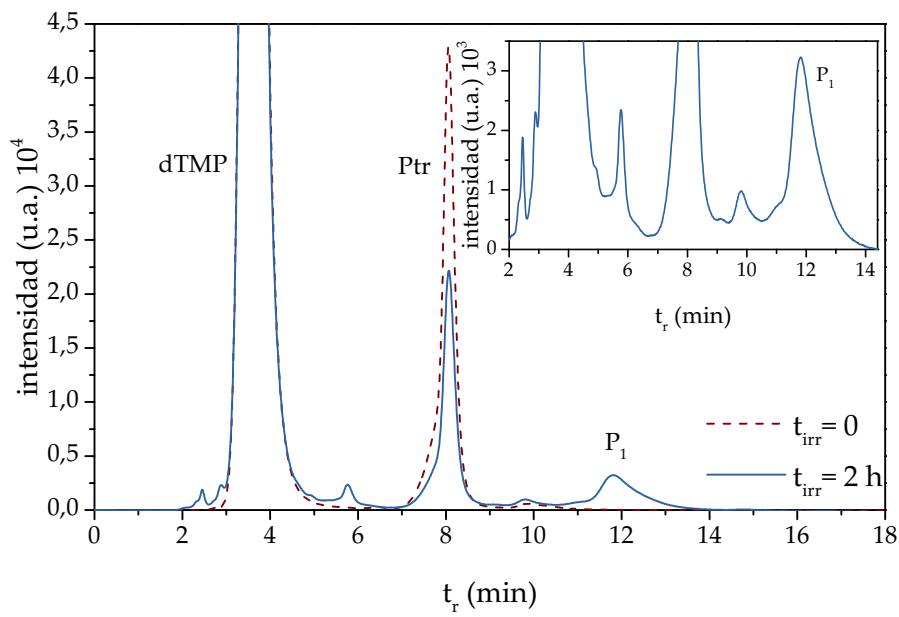
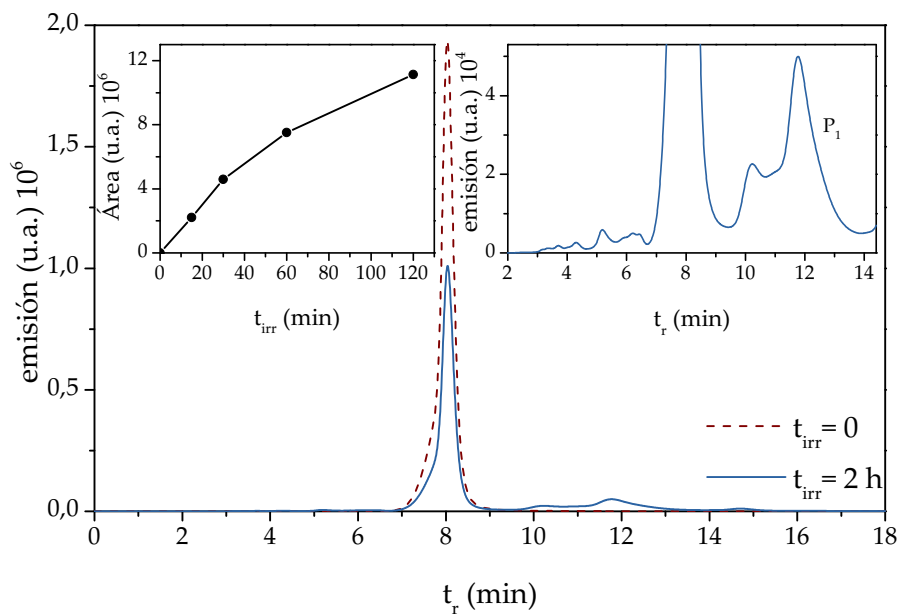
(a) *dTMP*(b) *Ptr*

Figura 149: Evolución de la concentración de *dTMP* y *Ptr* en función del tiempo de irradiación en soluciones acuosas saturadas con Ar sin y con agregado de KI. $dTMP_0 = 1255$ M; $Ptr_0 = 155$ M; $KI = 300$ M.



(a) Detector PDA



(b) Detector FL

Figura 150: Cromatogramas de soluciones de Ptr y dTMP saturadas en Ar sin irradiar y luego de 2 h de irradiación, registrados con un detector: PDA ana 260 nm y FL, exc 330 nm y emi 450 nm. Inset: (derecha) cromatograma para la solución luego de 2 h de irradiación; (izquierda) evolución del área de P_{483} en función del tiempo de irradiación. $dTMP_0$ 1600 M; Ptr_0 151 M.

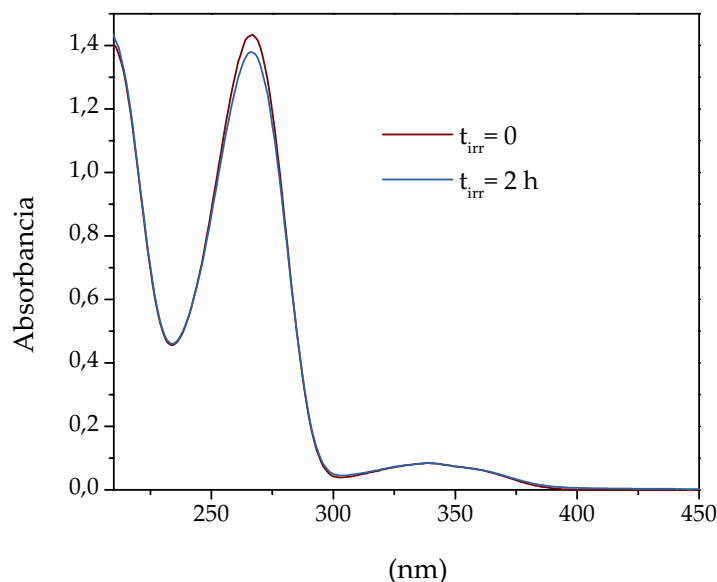


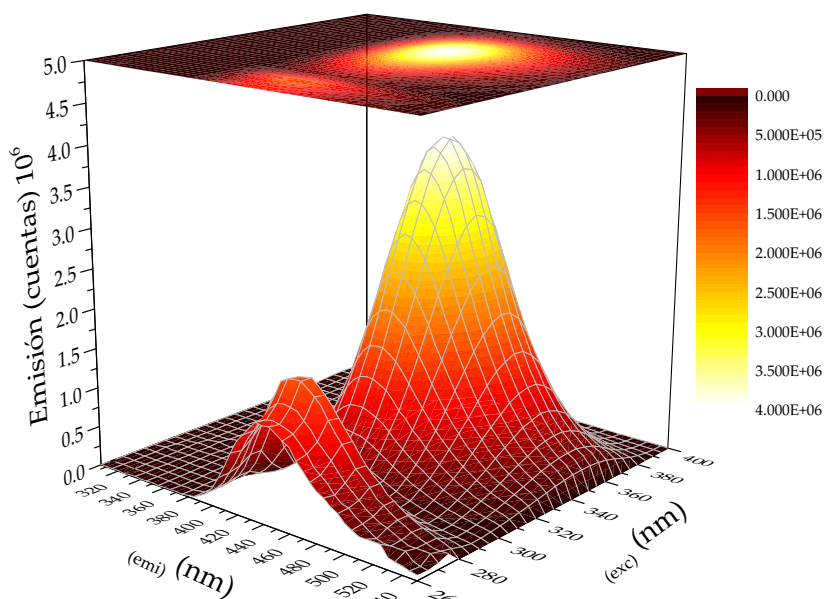
Figura 151: Espectros de absorción de soluciones de *dTMP* y *Ptr* saturadas con Ar expuestas a radiación UV-A durante distintos períodos de tiempo (0 y 120 min). $dTMP_0 = 125,5 \text{ M}$; $Ptr_0 = 15,5 \text{ M}$; pH = 5,5; camino óptico = 1 cm.

la misma, ya que la *Ptr* que se consume durante la reacción y el producto conserva sus propiedades posiblemente este producto sería una pterina modificada. Integrando el área del pico correspondiente a P_{483} , se observa que la formación del mismo es proporcional al tiempo de irradiación (Figura 150 (b), *inset* izquierdo).

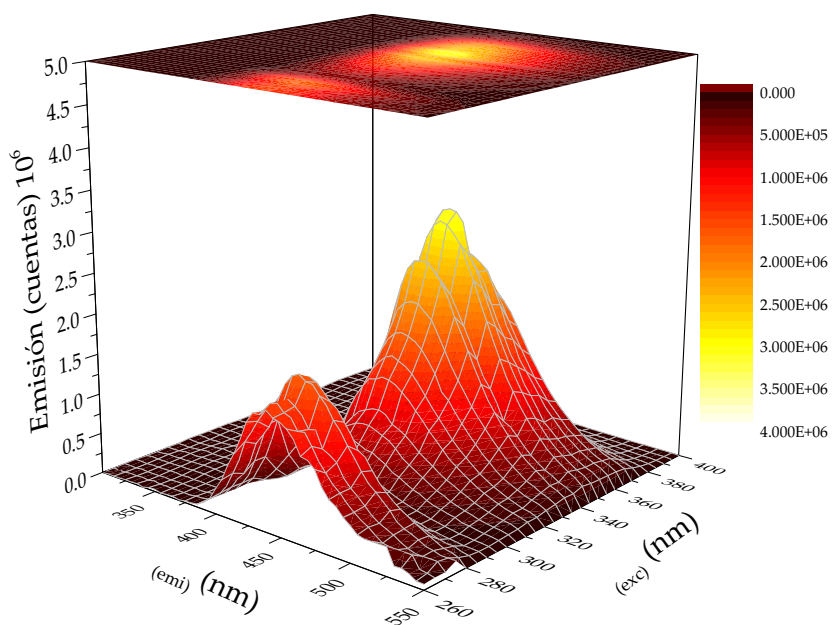
13.3.2 Estudios de emisión de fluorescencia

En las secciones previas se demostró la formación de productos fluorescentes derivados muy probablemente de *Ptr*. Para investigar con mayor detalle las propiedades fluorescentes de dichos productos y compararlas con las de la *Ptr* intacta, se realizaron experimentos de emisión estacionarios y resueltos en el tiempo con el equipo descrito en la Sección 7.1.

Se registraron matrices de excitación-emisión de soluciones que contenían *Ptr* y *dTMP* sin irradiar y luego de 2 horas de irradiación. Cabe aclarar que se realizaron diluciones de las muestras (1:10) para disminuir la absorbancia por debajo de 0,1 a 350 nm y evitar de esta manera el efecto de filtro interno (Figura 151). A pesar del consumo de *Ptr* durante la reacción fotosensibilizada, los productos formados poseen, aparentemente, un espectro similar. Dado que no se observan cambios significativos en el espectro de absorción luego de 2 horas de irradiación en la zona comprendida entre 300 y 400 nm. Las matrices se construyeron excitando a las muestras entre 260 y 400 nm y registrando la emisión entre 300 y 550 nm (Figura 152). El efecto global de la reacción fotosensibilizada es la disminución de la emisión de fluorescencia, y no se observó aparición de nuevos máximos



(a) Solución sin irradiar.



(b) Solución luego de 2 h de irradiación.

Figura 152: Matrices de excitación-emisión registradas en soluciones sin irradiar y luego de 2 h de irradiación que contienen Ptr y dTMP saturadas con Ar. $dTMP_0 = 125,5 \text{ M}$; $Ptr_0 = 15,5 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

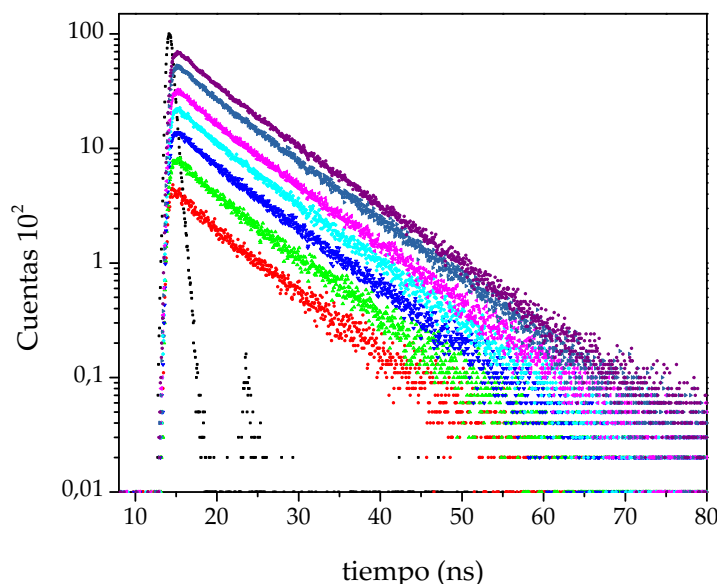


Figura 153: Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados entre 390 y 450 nm en una solución de *dTMP* y *Ptr* saturada con Ar expuesta a la radiación UV-A durante 2 horas. $dTMP_0 = 125,5 \text{ M}$; $Ptr_0 = 15,5 \text{ M}$; $pH = 5,5$.

de fluorescencia en la matriz de la solución irradiada. Por lo tanto, se superpone la emisión de fluorescencia de los compuestos, la *Ptr* y los productos.

Con el objetivo de separar la emisión proveniente de cada fluoróforo se registraron los espectros TRES de una solución saturada en Ar que contenía *dTMP* y *Ptr* expuesta a la radiación UV-A durante 2 horas. Estos espectros se construyen a partir de la variación de los factores pre-exponenciales de los decaimientos obtenidos a diferentes τ_{emi} (Subsección 7.1.2.3). Los espectros se midieron excitando la muestra con un NanoLED de 341 nm y registrando los decaimientos entre 360 y 560 nm (Figura 153). En la Figura 154 se muestra la comparación entre un ajuste mono y biexponencial con la distribución de los residuos para los respectivos tratamientos para un decaimiento de fluorescencia registrado a 450 nm en una solución de *Ptr* y *dTMP* luego de 2 h de irradiación. Las trazas obtenidas presentan un comportamiento biexponencial en todo el rango de τ_{emi} registradas, lo cual indica la presencia de al menos dos fluoróforos con τ_F diferentes. Realizando un análisis global de las trazas, se encontraron dos τ_F , uno corto $\tau_{F1} = 2,0 \text{ ns}$ y otro $\tau_{F2} = 8,4 \text{ ns}$. Éste último coincide con el reportado para *Ptr* [87], por lo tanto, el primero correspondería a uno o más productos fluorescentes de la reacción fotosensibilizada. Analizando la variación de los factores pre-exponenciales de los ajustes de las trazas se obtuvo el espectro de emisión asociado a cada τ_F (Figura 155). El espectro que corresponde a la especie de τ_{F2} , tiene características similares al de las pterinas, con un máximo alrededor de 450 nm (Sección 4.1). La disminución del τ_F podría deberse a que la pterina modificada tenga unido una molécula que desactive el estado excitado singlete de éste.

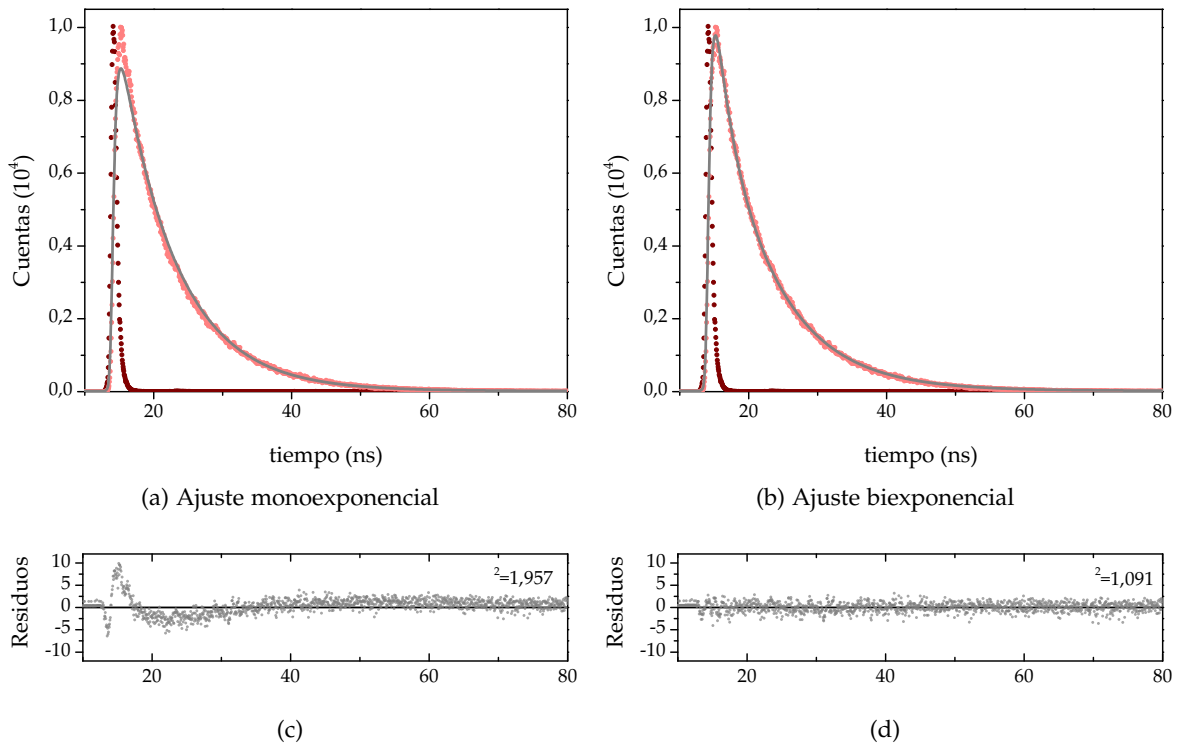


Figura 154: Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados a 450 nm en una solución de dTMP y Ptr saturada con Ar expuesta a la radiación UV-A durante 2 horas. Ajuste de las señales y distribución de los residuos para el tratamiento de los datos con una cinética monoexponencial y biexponencial. $dTMP_0 = 125,5 \text{ M}$; $Ptr_0 = 15,5 \text{ M}$; $\text{pH} = 5,5$; camino óptico = 1 cm.

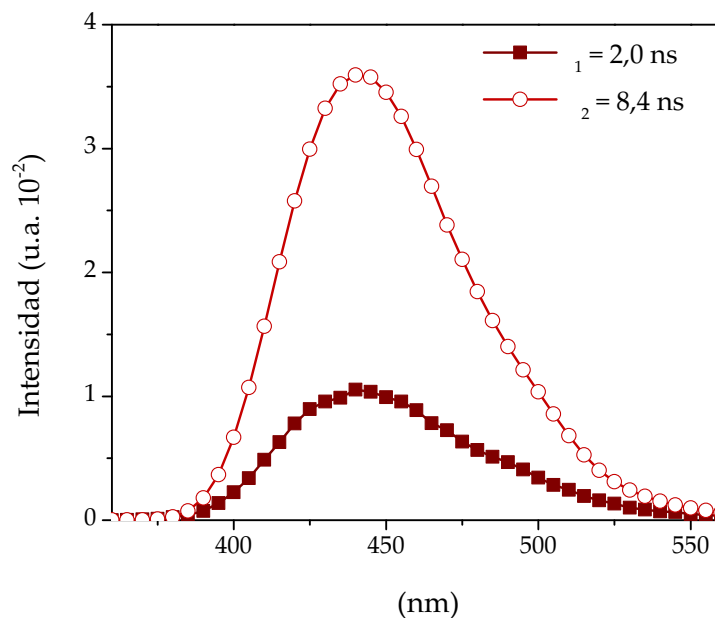


Figura 155: Variación de las amplitudes de cada uno de los componentes con la λ_{emi} , registrada en una solución de Ptr y dTMP saturada con Ar luego de 2 horas de irradiación.

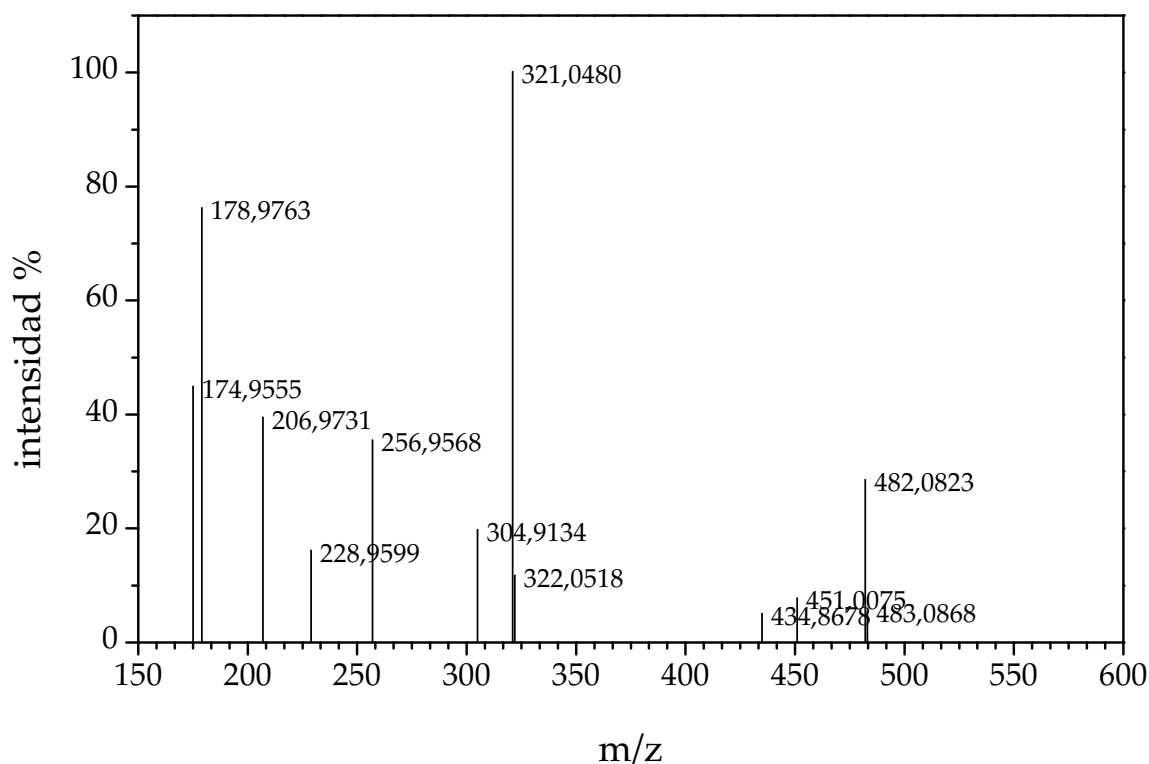


Figura 156: Espectro MS ESI del producto P_{483} con t_r 3,6 minutos. Registrado en una solución de dTMP y Ptr saturada con Ar irradiada durante 3 horas.

13.3.3 Investigación por UPLC-MS/MS

Con el objeto de investigar los productos de la reacción fotosensibilizada, se decidió realizar un estudio de los mismos empleando la técnica UPLC-ESI-MS/MS (Sección 6.3). Análogamente al capítulo 12 se registraron y compararon los cromatogramas obtenidos con el UPLC-MS-ESI tanto en soluciones de dTMP y Ptr irradiadas como no irradiadas pero en este caso previamente saturadas en Ar. Los dos picos, a t_r 2,4 minutos y t_r 3,0 minutos, corresponden los reactivos Ptr y dTMP, respectivamente. Luego de 3 horas de irradiación se observa la aparición de varios picos, de los cuales el mayoritario corresponde al producto con t_r 3,6 minutos. Al analizar los espectros MS de este pico, se observaron varias señales de las cuales una corresponde al ion molecular intacto de dTMP ($[M-H]^- = [dTMP-H]^-$) a m/z 321,05 Da. Por otro lado, se observó una señal a m/z 482,08 Da que corresponde al producto P_{483} (Figura 156). Vale la pena aclarar, que la señal a m/z 321,05 Da está presente en el espectro de este pico, debido a que el mismo comienza a eluir, aún cuando el pico correspondiente a dTMP de t_r 3,0 min, no ha terminado de hacerlo y además se encuentra en una concentración mucho mayor con respecto a P_{483} .

En la Sección 12.5 se analizaron los espectros MS/MS de los picos correspondientes a los reactivos, Ptr y dTMP, en las soluciones sin irradiar. Con el objetivo de identificar los productos que se forman en ausencia de O₂, se registraron los espectros MS/MS en

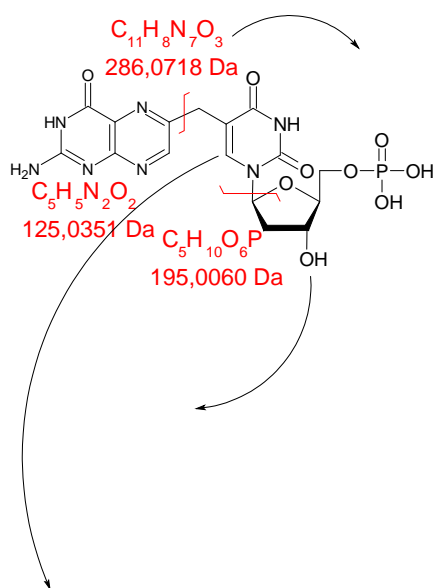


Figura 157: Espectro MS/MS ESI del producto P_{483} correspondiente al ion con m/z 482,0823 Da registrado en una solución saturada en Ar de Ptr y dTMP luego de 3 horas de irradiación. $dTMP_0=1$ mM; $Ptr_0=150$ M. Fragmentación y estructura química propuesta para P_{483} .

un solución de Ptr y dTMP luego de 3 horas de irradiación. El espectro de la [Figura 157](#) corresponde al producto P_{483} , allí se observa la señal correspondiente al ion molecular de P_{483} ($[M-H]^- = [P_{483}-H]^-$) a m/z 482,08 Da y tres fragmento principales:

i) m/z 286,08 Da; ii) m/z 195,01 Da; y iii) m/z 96,97 Da. Los últimos dos fragmentos coinciden con los observados para dTMP correspondientes a la desoxiribosa monofosfato y al fosfato. Además se observó una señal pequeña correspondiente a la base nitrogenada intacta con m/z 125,03 Da. Por lo tanto, el producto P_{483} debería tener en su estructura al nucleótido de timina. La primer señal con m/z 286,08 Da es exactamente igual a la masa de la base nitrogenada más una molécula de Ptr con la pérdida de tres hidrógenos $dTMP + Ptr - 3H$. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, el producto P_{483} correspondería a un aducto formado entre una molécula de Ptr y otra de dTMP. Aunque resulta difícil especular sobre la estructura de este aducto, queda claro que se forma un enlace covalente entre la base nitrogenada y la Ptr. Por otro lado, la estructura de la Ptr debería permanecer inalterada, al menos la parte que le confiere las características espectroscópicas debido a que éstas prácticamente no se modifican, al igual que las propiedades fluorescentes. Si por el contrario, la reacción fuera una adición 2+2 no se perderían hidrógenos en la reacción y las propiedades espectroscópicas de Ptr deberían modificarse considerablemente.

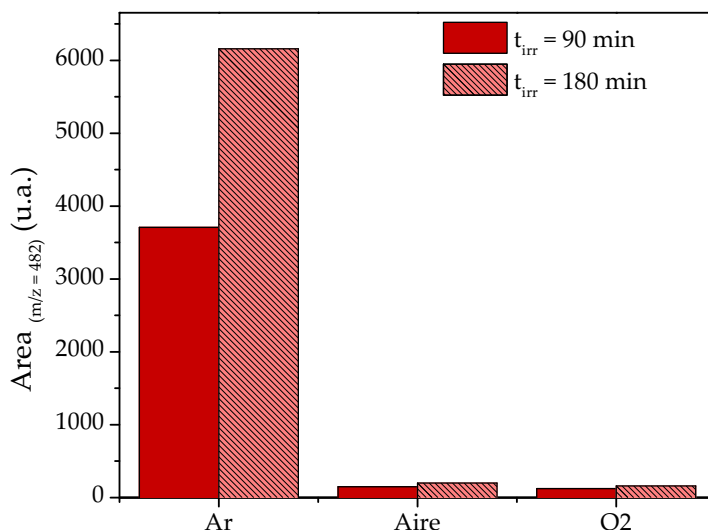


Figura 158: Evolución del área del producto P_{483} con el tiempo de irradiación en soluciones de *dTMP* y *Ptr* saturadas con Ar, equilibradas con aire y saturadas con O_2 .

Por último, se determinó la formación del aducto en diferentes condiciones con el objetivo de evaluar la competencia del proceso que se lleva a cabo en presencia y ausencia de O_2 y además aportar información para dilucidar el mecanismo de formación del aducto *Ptr-dTMP*. Para ello, se irradiaron soluciones acuosas que contenían *Ptr* y *dTMP* en las siguientes condiciones: i) saturadas con Ar; ii) equilibradas con aire; y iii) saturadas con O_2 . Las soluciones irradiadas se analizaron por UPLC-MS y se cuantificó la formación del aducto en las diferentes condiciones. Para esto se integraron los cromatogramas obtenidos con el detector MS para el producto con $m/z = 482,08 \text{ Da}$. El área bajo la curva del pico con $t_r = 3,59$ minutos corresponde al aducto *Ptr-dTMP*, es proporcional a la cantidad de producto formado en la reacción, y aumenta con el tiempo de irradiación. La [Figura 158](#) muestra el área correspondiente al aducto *Ptr-dTMP* en diferentes condiciones experimentales para dos tiempos de irradiación (90 y 180 minutos). En ausencia de O_2 la formación del aducto es máxima, siendo esta reacción la vía mayoritaria y responsable del consumo del nucleótido y del sensibilizador. En soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 la formación del aducto disminuye más de 30 veces para el tiempo de irradiación de 180 minutos. Este efecto se debe por un lado, a la competencia del O_2 por los 3Ptr que serían los precursores del aducto. Por otro lado, el O_2 también reacciona con el radical *Ptr* para generar anión O_2^- por transferencia electrónica.

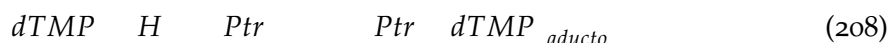
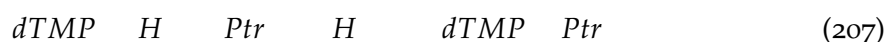
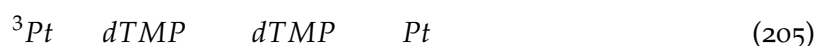
13.4 MECANISMO DE REACCIÓN

En el presente capítulo se estudió el proceso de fotosensibilización de *dTMP* inducido por *Ptr* independiente de O_2 . Se demostró la formación de un producto, el cual conserva las características espectrales de la *Ptr* y sus propiedades fluorescentes. Por espectrometría de masas se pudo identificar el producto, resultando este un aducto entre el sensibilizador

y el sustrato. En experimentos de fotosensibilización de soluciones que contenían Ptr y dTMP libres de O_2 en presencia de KI se pudo determinar la participación de los estados excitados tripletes en la formación del aducto.

Teniendo en cuenta los antecedentes en literatura (Capítulo 1), y habiendo descartado la transferencia de energía entre Ptr y dTMP, la degradación de dTMP fotoinducida por Ptr puede clasificarse como un mecanismo Tipo I. El mecanismo inicia con la absorción de un fotón por parte de Ptr en el estado fundamental, para dar el sensibilizador en el estado singulete excitado (1Ptr), que luego por cruce intersistema (ISC) genera dos estados excitados tripletes (3Ptr) (reacción 204). Luego por una transferencia electrónica desde dTMP hacia 3Ptr se forman los correspondientes pares radicales $dTMP$ y Ptr (reacción 205). En medio ácido, el radical catión pierde un protón para generar el radical neutro de dTMP ($dTMP-H$) (reacción 206). En ausencia de O_2 , estos radicales pueden recombinar para dar la Ptr y dTMP en el estado fundamental (reacción 207), o bien avanzar hacia productos generando el aducto Ptr-dTMP (reacción 208).

Cuando el O_2 está en el medio, existe una competencia del O_2 por los 3Ptr para generar oxígeno singlete (1O_2), y por el radical Ptr para generar O_2 , esto explicaría la disminución significativa en la formación del aducto en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 .



PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTOSENSIBILIZADORAS DE 7,8-DIHIDROPTERINAS

En los capítulos anteriores se comprobó la participación de pterinas oxidadas en procesos fotosensibilizados, utilizando como sustratos nucleótidos de purina y de pirimidina. En el presente capítulo se presentaran resultados de estudios realizados con pterinas reducidas, en particular 7,8-dihidroderivados los cuales son relevantes desde el punto de vista biomédico, ya que se encuentran formando parte de sistemas biológicos y cumpliendo una amplia variedad de funciones. Específicamente H_2Bip , participa en el metabolismo de aminoácidos y es particularmente interesante porque es el primer compuesto que "escapa" de las vías metabólicas de los aminoácidos generando pterinas oxidadas en la piel de pacientes con vitiligo (Sección 3.6). Es decir que este compuesto, aún en situaciones fisiológicas y en muy bajas concentraciones, siempre está presente en piel.

14.1 7,8-DIHIDROBIOPTERINA COMO SENSIBILIZADOR

En primer lugar se investigó si las 7,8-dihidropterinas eran capaces de participar en procesos fotosensibilizados tal como lo hacen sus derivados oxidados. Para éste estudio se utilizó el derivado reducido de Bip, denominado 7,8-dihidrobiopterina (H_2Bip). Este compuesto fue elegido entre otros dihidroderivados justamente por que H_2Bip bajo irradiación UV-A experimenta fotooxidación del anillo de pirazina para generar principalmente Bip. La reacción fotoquímica de H_2Bip fue estudiado en detalle previamente (Subsección 4.2.4). Por lo tanto resulta interesante indagar si este compuesto posee actividad fotosensibilizadora como su foto producto principal, Bip.

Se realizaron experimentos típicos de fotosensibilización utilizando soluciones acuosas estabilizadas con aire que contenían H_2Bip como sensibilizador y dGMP como sustrato. A diferencia de las pterinas oxidadas, las pterinas reducidas tienen un $pK_a \approx 10$ por lo tanto a $pH = 7$ estará presente en mayor proporción la especie protonada. Considerando que este compuesto se encuentra presente en la piel y su valor de pK_a , en éstos experimentos se trabajó a pH neutro para asemejar las condiciones fisiológicas.

Se irradiaron soluciones conteniendo dGMP y H_2Bip durante diferentes períodos de tiempo y luego se cuantificaron por HPLC la degradación del nucleótido, de H_2Bip y la formación de los productos de fotoquímica del sensibilizador. En la [Figura 159](#) se muestran los correspondientes perfiles de concentración para todos compuestos. En los primeros 4 minutos de irradiación H_2Bip disminuye su concentración rápidamente para generar su análogo oxidado, Bip. Éste bajo irradiación genera Fop y Cap. Un comporta-

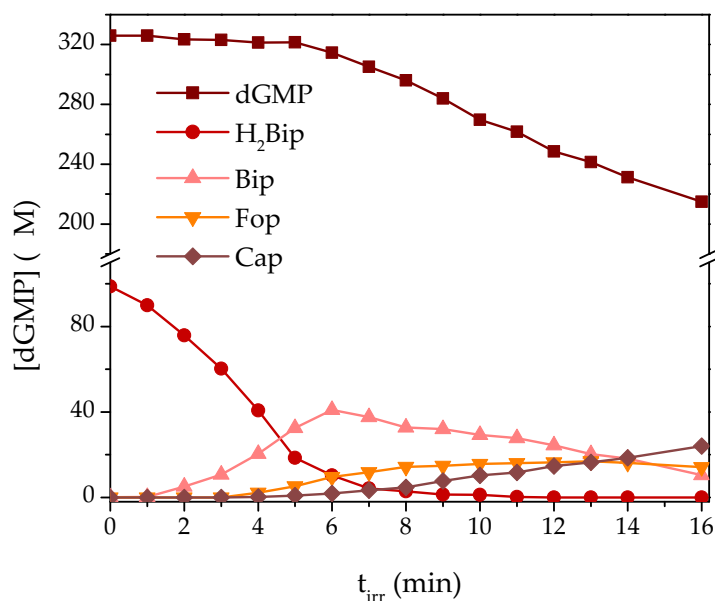


Figura 159: Evolución de la concentración de reactivos y productos con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP y H₂Bip. dGMP₀ = 322 M; H₂Bip₀ = 100 M; pH= 7.

miento análogo al observado para la fotoquímica de Bip. Es decir que, cualitativamente, la fotoquímica de los compuestos no se ve afectada por la presencia del nucleótido.

Con respecto a la evolución de la concentración de dGMP, no se observa consumo apreciable en los primeros minutos de reacción, sino hasta que las pterinas oxidadas comienzan a aumentar su concentración en la mezcla, es cuando se observa degradación del nucleótido. Este resultado, se puede interpretar considerando que las pterinas reducidas por lo general actúan como antioxidantes en los sistemas biológicos, y a diferencia de sus análogos oxidados casi no producen especies reactivas de O₂, principalmente ¹O₂, por lo tanto es lógico esperar que no actúen como sensibilizadores por ninguno de los mecanismos conocidos. Este resultado sugiere que H₂Bip no fotosensibiliza a dGMP y que, por el contrario, son sus fotoproductos, los cuales son eficientes fotosensibilizadores, los que provocan el consumo del sustrato.

Para confirmar esta hipótesis, se realizaron experimentos colocando inicialmente la misma cantidad de Bip y H₂Bip en presencia de dGMP. La mezcla se irradió y se cuantificó el consumo del nucleótido. Se trabajó con una concentración mayor de nucleótido a fin de favorecer la reacción fotosensibilizada, pero no lo suficientemente alta como para llegar a desactivar el estado excitado singulete del sensibilizador. En la [Figura 160](#) se muestran los perfiles de concentración de las pterinas y del sustrato obtenidos en el experimento. Se observó que al comenzar a degradarse H₂Bip aumenta la concentración de Bip hasta que llega a un punto máximo donde comienza su fotooxidación. Mientras que el nucleótido se consume a partir, aproximadamente, de los dos minutos de irradiación. Cuando la concentración de H₂Bip es prácticamente cero y la concentración de Bip es máxima. Esto confirma que de los dihidroderivados, H₂Bip, no es capaz de fotosensibilizar al nu-

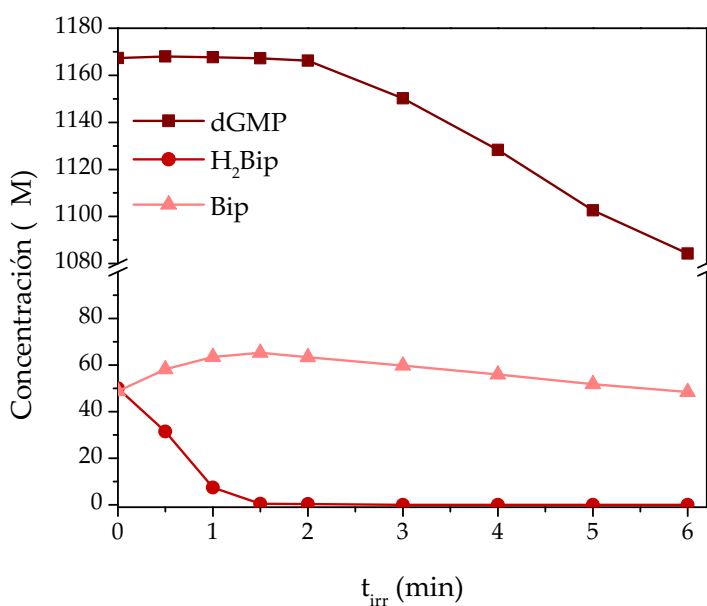


Figura 160: Evolución de la concentración de reactivos y productos con el tiempo de irradiación en soluciones acuosas equilibradas con aire de dGMP, H₂Bip y Bip. $dGMP_0 = 1170 \text{ M}$; $H_2Bip_0 = 50 \text{ M}$; $H_2Bip_0 = 50 \text{ M}$; pH= 7.

cleótido de guanina. Este comportamiento es opuesto a lo observado en experimentos similares con su análogo oxidado Bip, a pesar de la mínima diferencia desde el punto de vista estructural, sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas son marcadamente diferentes.

En estudios previos se demostró que mientras las pterinas oxidadas son eficientes fotosensibilizadores de ¹O₂, los dihidroderivados no lo son. Esto sugiere que estos últimos compuestos no generan estados excitados tripletes y, teniendo en cuenta que las reacciones de fotosensibilización de nucleótidos ocurren en general por reacción de los tripletes de los sensibilizadores, esto explicaría por qué los dihidroderivados no son capaces de fotoinducir oxidación en los nucleótidos.

14.2 PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE 7,8-DIHIIDROPTERINAS

La emisión de fluorescencia de algunas pterinas aromáticas se conoce desde hace varias décadas y se utiliza para diversas aplicaciones analíticas. Estos compuestos serían los responsables de la fluorescencia característica emitida después de un examen con luz de Wood de las manchas blancas en la piel de pacientes con vitiligo [87] y sus propiedades de emisión fluorescente han sido estudiados en detalle. [98, 99, 58] Bajo irradiación UV-A (320-400 nm), las pterinas oxidadas no conjugadas presentan bandas de emisión anchas centradas aproximadamente en 450 nm, con $\tau_F = 0,10$ y τ_F entre 2 a 14 ns.

A pesar de su interés biológico no se han realizados estudios sistemáticos para caracterizar los estados excitados de las pterinas reducidas, excepto trabajos realizados con derivados reducidos del ácido fólico [161]. Esto se podría deber principalmente a inconvenientes técnicos. En primer lugar, las soluciones acuosas de dihidropterinas son inestables

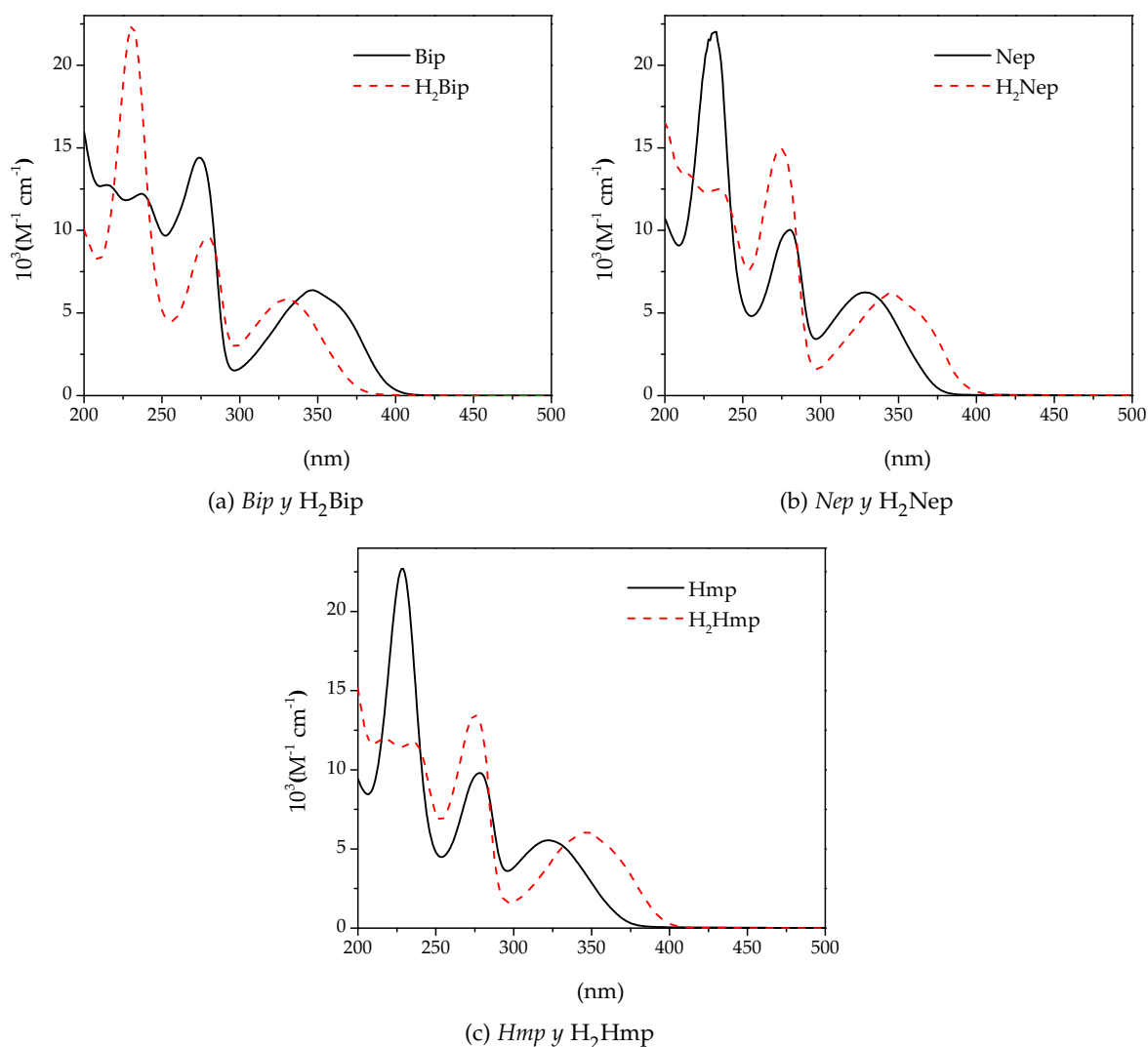
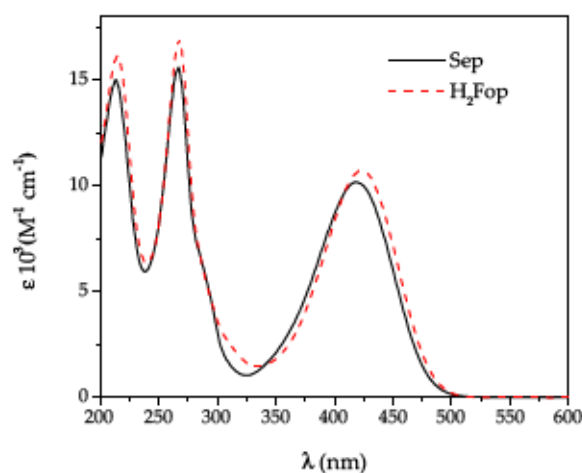


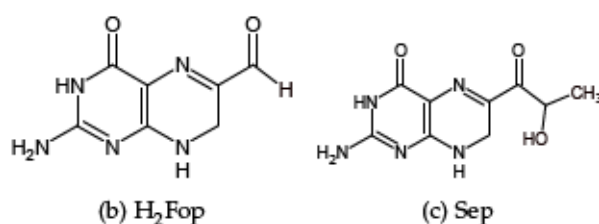
Figura 161: Espectros de absorción a pH 6 de pterinas oxidadas (línea continua) y pterinas reducidas (línea punteada).

en aire. Estos compuestos experimentan una oxidación con una velocidad que depende de la naturaleza química del sustituyente del anillo de pirazina [64]. Por otro lado, estudios preliminares revelaron dos hechos, que en conjunto constituyen un problema a resolver : (i) la emisión de dihidropterinas es muy débil y, (ii) las soluciones preparadas a partir de los compuestos de la más alta pureza disponible comercialmente están contaminados con pequeñas trazas de pterinas oxidadas. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los espectros de absorción de dihidropterinas y pterinas oxidadas están en general más o menos superpuestos (Figura 161), la emisión de éstas últimas es la principal interferencia en el análisis de la fluorescencia de las primeras.

El objetivo de esta sección fue investigar las propiedades fluorescentes de dihidropterinas en su forma neutra, en solución acuosa y bajo irradiación UV-A. Dado que las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las pterinas, en general, dependen fuertemente de la naturaleza química del sustituyente en posición 6 del anillo de pirazina [87], se eli-



(a)

(b) H₂Fop

(c) Sep

Figura 162: Espectros de absorción a pH 7 y estructura química de H₂Fop y Sep.

gió para este estudio una serie de dihidroderivados que presentan espectros de absorción diferentes (Figura 161) y diferente distribución de densidad electrónica en el anillo de pirazina: H₂Fop, Sep, H₂Bip, H₂Nep y H₂Hmp (Sección 3.1). En particular, se registraron los espectros emisión y determinaron los valores de Φ_F y τ_F .

14.2.1 6-Formildihidropterina y sepiapterina

Para comenzar el estudio de las propiedades fluorescentes de las dihidropterinas elegidas, se comenzó con los dos casos más sencillos de la serie de compuestos, H₂Fop y Sep. En contraste con los derivados de pterinas aromáticas y reducidas, H₂Fop y Sep presentan una banda de absorción amplia e intensa en la región comprendida entre 350 y 500 nm (Figura 162). Esta característica particular es el resultado de una transferencia de carga a través del sistema conjugado entre el grupo amino en la posición 2 del anillo de pterina y el grupo carbonilo del sustituyente en la posición 6 [60]. La fluorescencia de estos compuestos puede ser estudiado sin la interferencia de la emisión de pterinas oxidadas, ya que éstas no absorben por encima de 410 nm (Figura 161), [98, 99]. Estas dihidropterinas pueden ser excitadas selectivamente con radiación entre 420-470 nm, incluso en presencia de una concentración un significativa de derivados oxidados. La Figura 163 muestra los espectros de emisión normalizados registrados en soluciones acuosas equilibradas con aire de H₂Fop y Sep a pH = 6,5, excitando a 425 nm. Los espectros de fluorescencia de los

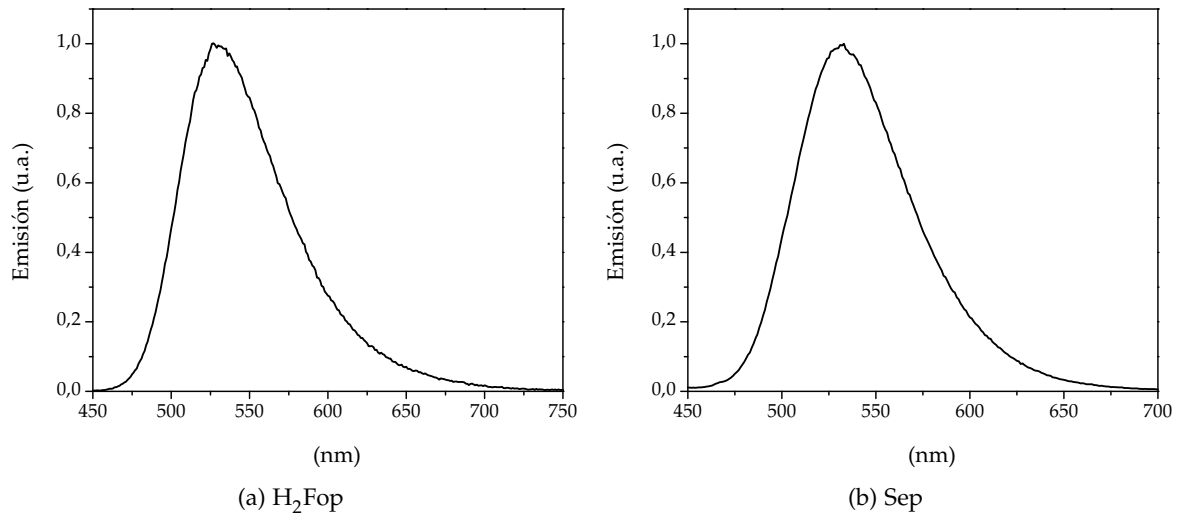


Figura 163: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 6,5 de H_2Fop y Sep excitando a 425 nm.

dos compuestos son similares y muestran una banda de emisión ancha centrada en 525 nm.

Para la determinación de los F se utilizaron las medidas de emisión en estado estacionario y se aplicó la ecuación 209,

$$F = \frac{I}{I^R} \frac{A^R}{A} \quad (209)$$

donde I es la integral de intensidad de fluorescencia, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación y el superíndice R se refiere al fluoróforo de referencia. En este experimento se utilizó como referencia la fluoresceína en buffer acuoso de CO_3^{2-}/HCO_3^- a pH = 9,6 [5] ($F = 0,85$) [162]. Tanto la muestra como la referencia se excitaron a la misma λ_{exc} . Para evitar efectos de filtro interno, la absorbancia de las soluciones a la λ_{exc} se mantuvo por debajo de 0,10. Se obtuvieron valores de $F = 8,7 \cdot 10^{-3}$ y $7,0 \cdot 10^{-3}$ para H_2Fop y Sep respectivamente. Estos valores son muchos menores a los reportados previamente para pterinas aromáticas no conjugadas (Sección 4.1).

En otro grupo de experimentos, se determinaron los τ_{emi} de cada compuesto utilizando como fuente de excitación un NanoLED de 461 nm, y registrando la señal de decaimiento de la emisión fluorescente para soluciones equilibradas con aire a pH 6,5 de H_2Fop y Sep . Ambos compuestos decaen con una cinética de primer orden a la λ_{emi} . A partir del ajuste de las trazas con una ecuación monoexponencial se determinaron los τ_{emi} , dando valores iguales a 0,34 ns y 0,06 ns para H_2Fop y 0,28 ns y 0,05 ns para Sep . Estos valores son mucho menores a los reportados para los derivados de pterinas oxidadas no conjugadas [98, 99, 58].

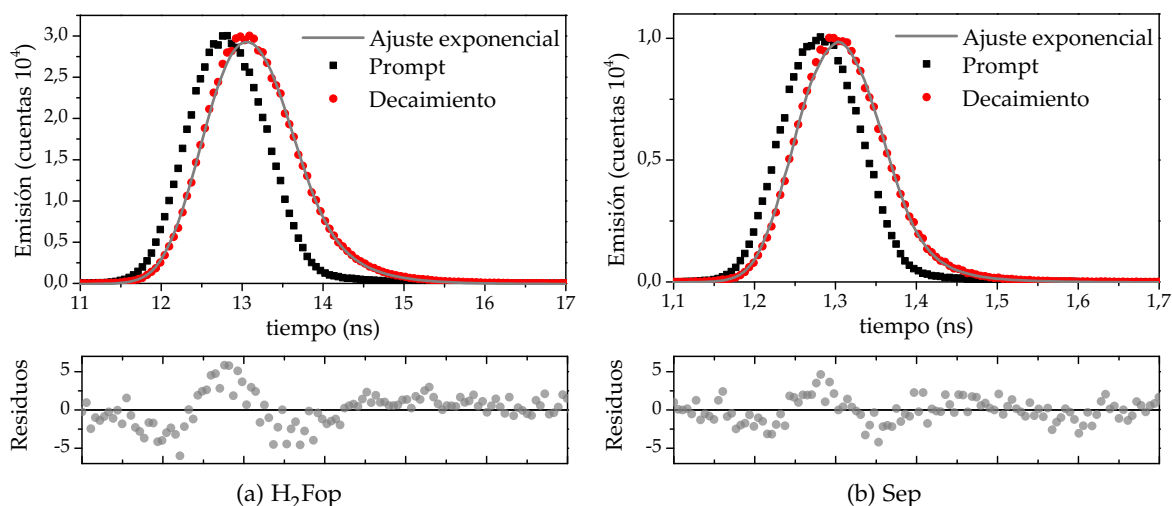


Figura 164: Decaimiento de la emisión fluorescente de soluciones equilibradas en aire a pH 6,5 de H_2Fop y Sep , exc 461 nm y emi 530 nm.

14.2.2 Dihidrobiopterina, dihidroneopterina y 6-hidroximetildihidropterina

14.2.2.1 Análisis por HPLC

Como se mencionó antes, las soluciones de dihidropterinas están inevitablemente contaminadas con pterinas oxidadas. Excepto para los casos especiales discutidos en la sección 14.2.1, las contaminaciones, aunque estén presentes en cantidades muy bajas, pueden interferir significativamente en el estudio de las propiedades de emisión de dihidropterinas debido a: (i) la superposición parcial de los espectros de absorción de ambas clases de derivados de compuestos y las grandes diferencias en los valores de $F, \left(\frac{H_2Pt}{F} \quad \frac{Pt}{F} \right)$. Por lo tanto, para evaluar la naturaleza química y la magnitud de la contaminación, las soluciones de los dihidroderivados (H_2Bip , H_2Nep , y H_2Hmp) se analizaron por HPLC. En todos los casos se determinó que la solución de un dihidroderivado se encontraba contaminada con su análogo oxidado y con pequeñas cantidades de H_2Xap . Una evaluación del espectro de absorción de H_2Xap (Figura 165) muestra que la absorción por encima de 330 nm es muy baja. Por otro lado, es de esperar que el valor del $\frac{H_2Xap}{F}$ sea del orden del F de otros dihidroderivados. Por lo tanto, la impureza de H_2Xap no causará una interferencia significativa en la determinación de las propiedades fluorescentes de los compuestos antes mencionados.

Se determinaron los porcentajes en concentración molar de la contaminación con los correspondientes análogos oxidados y de H_2Xap en las muestras de H_2Bip , H_2Nep , y H_2Hmp . Estos valores se calcularon a partir de los cromatogramas determinados por HPLC, utilizando soluciones de los compuestos preparadas a partir de patrones comerciales. Los resultados se presentan en la Tabla 18.

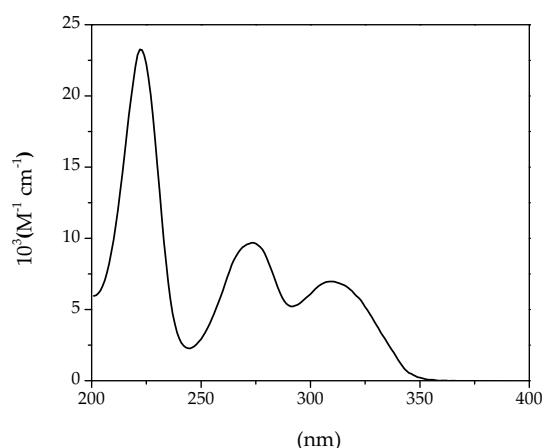


Figura 165: Espectro de absorción de H_2Xap en solución acuosa a pH 7.

COMPUESTO	% IMPUREZA	
	Pt	H_2Xap
H_2Bip	1,3	0,7
H_2Nep	0,3	1,2
H_2Hmp	0,6	3,1

Tabla 18: Porcentaje de las impurezas en soluciones de H_2Pt calculadas por HPLC

14.2.2.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia

El grupo de dihidroderivados que se estudian en esta sección experimentan una auto-oxidación en presencia de O_2 , pero a una velocidad bastante baja. Esta reacción, llamada de auto-oxidación, para soluciones acuosas equilibradas en aire a 25 °C, tiene un $t_{1/2}$ mayor a 48 horas. Para los tres compuestos, del porcentaje de reactivo consumido, más del 90% se convierte en H_2Xap . La baja reactividad de los compuestos frente al O_2 , es suficiente para poder realizar las medidas sin degradar significativamente al reactivo. Además, considerando las propiedades de H_2Xap discutidas anteriormente, la auto-oxidación por el O_2 disuelto no sería una interferencia adicional para el estudio de las propiedades fluorescente de estos compuestos. Mientras si lo es la contaminación con las pterinas oxidadas.

Se realizaron medidas de espectros *TRES* excitado las muestras con un NanoLED de 341 nm. A esta λ_{exc} tanto el dihidroderivado como el derivado oxidado absorben radiación. La emisión se registró entre 370 y 500 nm. En la [Figura 166](#) se muestra un espectro *TRES* para soluciones acuosas a pH = 7 de H_2Bip y H_2Nep . Estos espectros se construyen a partir de una señal tridimensional, donde se registran las señales de decaimiento de fluorescencia en un rango de λ_{emi} determinado, y manteniendo la λ_{exc} fija (Subsección 7.1.2.3). De estas medidas se extraen los decaimientos registrados a cada λ_{emi} para su posterior análisis. En la [Figura 167](#) se muestra, a modo de ejemplo, el comportamiento biexponencial que presentaron los decaimientos registrados en una solución de H_2Bip . Para todos los com-

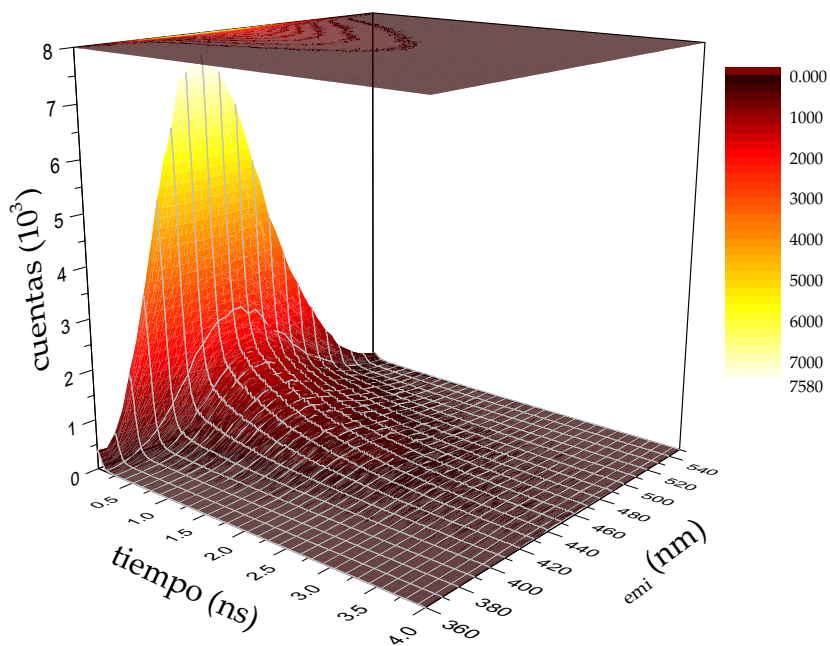
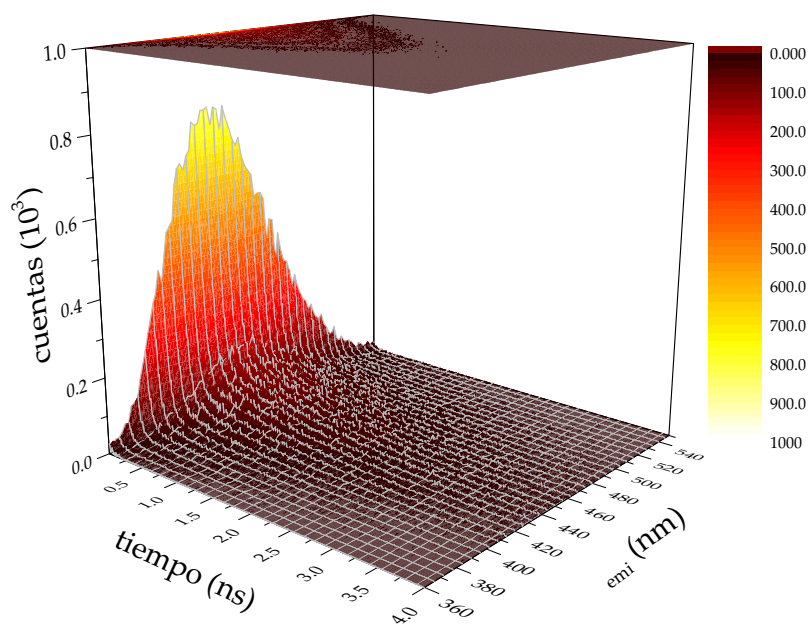
(a) H₂Bip(b) H₂Nep

Figura 166: Espectros TRES registrados en soluciones acuosas equilibradas en aire de H₂Bip y H₂Nep a pH 7, *exc* 341 nm.

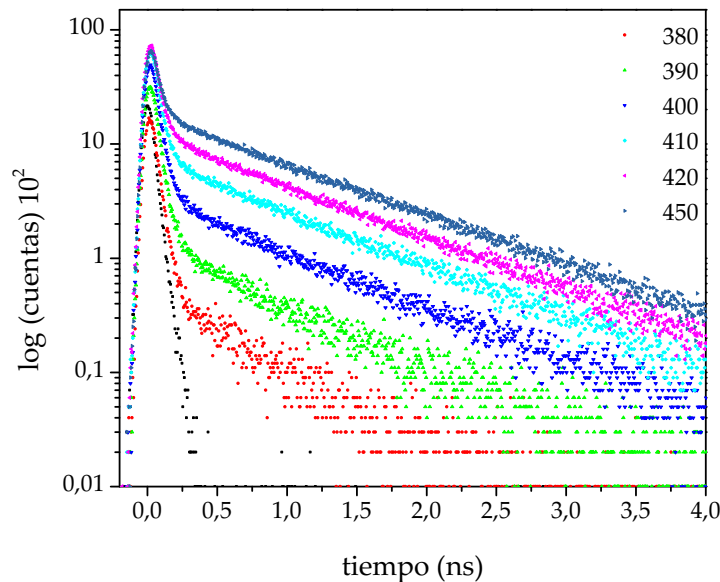


Figura 167: Decaimientos de emisión de fluorescencia registrados entre 380 y 450 nm en una solución de H₂Bip.

puestos investigados, los decaimientos de la emisión fueron claramente biexponenciales y se ajustaron utilizando la ecuación 210 (Subsección 7.1.2.3).

$$I(t) = I_0 \left[\exp\left(-\frac{t}{F_1}\right) + \exp\left(-\frac{t}{F_2}\right) \right] \quad (210)$$

Los ajustes realizados arrojaron un componente que posee un F_1 corto (≈ 1 ns) y otro de F_2 más largo (1 ns $< F_2 < 5$ ns). El componente con F_1 es del mismo orden de magnitud que los valores determinados para H₂Fop y Sep (sección 14.2.1). Mientras que, el componente con F_2 es del mismo orden de magnitud de los F que presentan las pterinas oxidadas. Los valores de F para ambos componentes fueron constantes independientemente de la λ_{emi} . Sin embargo, una evaluación comparativa de los factores pre-exponenciales mostró una mayor contribución del componente F_2 con el aumento de la λ_{emi} (Figura 168). Se puede calcular un espectro de emisión registrado a partir del cambio del factor pre-exponencial con la λ_{emi} a un determinado tiempo luego de la excitación del NanoLED. En la Figura 169 se muestran dos espectros calculados de esta forma, a 0,27 ns y 8,95 ns luego de la excitación con el NanoLED. En principio, los espectros se podrían asociar a cada una de las especies que se observan en los decaimientos biexponenciales.

A partir del análisis global los espectros TRES se calcularon los espectros de emisión de cada componentes en la mezcla. Es decir, realizando la convolución de las señales de decaimiento con respecto a la señal del perfil temporal del NanoLED a todas las λ_{emi} donde se registró el espectro TRES (Subsección 7.1.2.3). Este análisis estuvo de acuerdo con los resultados discutidos hasta el momento. Presentaron decaimientos biexponenciales y mostraron una dependencia de los factores pre-exponenciales con la λ_{emi} . Del análisis global de cada dihidroderivado estudiado, el componente de F_2 coincide con los valores reportados previamente para los correspondientes derivados oxidados. Este hecho se co-

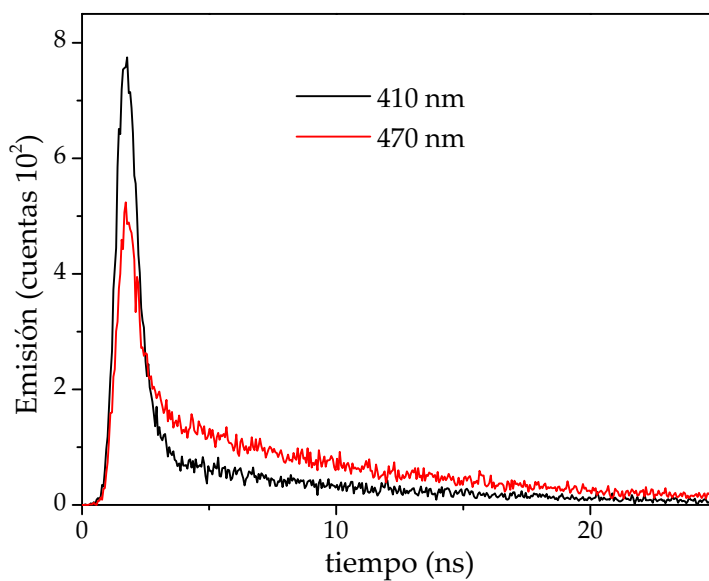


Figura 168: Decaimiento de la emisión fluorescente en soluciones equilibradas en aire a pH = 7 de H₂Bip, *exc* 341 nm.

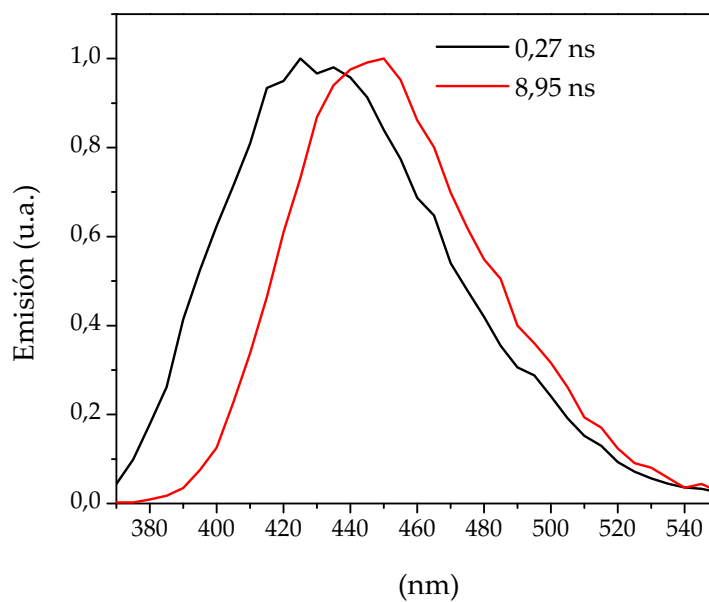


Figura 169: Variación de factores pre-exponenciales normalizados registradas a 0,27 y 8,95 ns en una solución equilibrada en aire a pH 7 de H₂Bip, *exc* 341 nm.

COMPUESTO	F_{35}	$F_{40,4}$
	nm	ns
H ₂ Bip	444	9,4
H ₂ Nep	443	9,2
H ₂ Hmp	449	10,8

Tabla 19: Resultados del análisis global de los espectros TRES correspondiente al componente de F_{35} largo para las soluciones de dihidroderivados.

COMPUESTO	Datos reportados		Análisis global	
	F_{35}	$F_{40,4}$	F_{44}	$F_{40,4}$
	nm	ns	nm	ns
Bip	441	9,1	445	9,7
Nep	440	8,9	445	9,6
Hmp	449	11,0	440	10,8

Tabla 20: Resultados del análisis global de los espectros TRES registrados con soluciones de derivados oxidados.

robó en experimentos independientes realizando el análisis global de espectros TRES registrados utilizando soluciones de pterinas oxidadas. Los valores arrojados de estos experimentos coinciden con los datos calculados anteriormente (Tabla 19 y Tabla 20). En la Figura 170 se comparan el espectro asociado al componente de F_{35} largo, obtenido a partir del análisis global de los TRES registrados en soluciones de los dihidroderivados, con el espectro obtenido aplicando el análisis global a los espectros TRES registrados en soluciones acuosas de los correspondientes derivados oxidados. De esta manera se lograron separar dos espectros, uno que corresponde a una especie con F_{35} corto y coincide con la especie reducida. Y por otro lado, una especie con un F_{35} más largo que se asigna al correspondiente derivado oxidado. Los espectros correspondientes a los dihidroderivados se muestran en la Figura 171 y en la Tabla 21 se resumen los valores de F_{35} y $F_{40,4}$ de cada compuesto estudiado.

Los F_{35} de estos compuestos no pueden ser calculados directamente a partir de las medidas de los espectros registrados en estado estacionario utilizando la ecuación 209 como en el caso de H₂Fop y Sep. Debido a que la integral de la intensidad bajo la curva del espectro tiene una contribución significativa del correspondiente derivado oxidado. Sin embargo, este hecho que en principio se presenta como un inconveniente, puede ser utilizado como una ventaja para el cálculo del F_{35} . Teniendo en cuenta que se conocen los valores de F_{35} del correspondiente derivado oxidado se puede utilizar al compuesto como

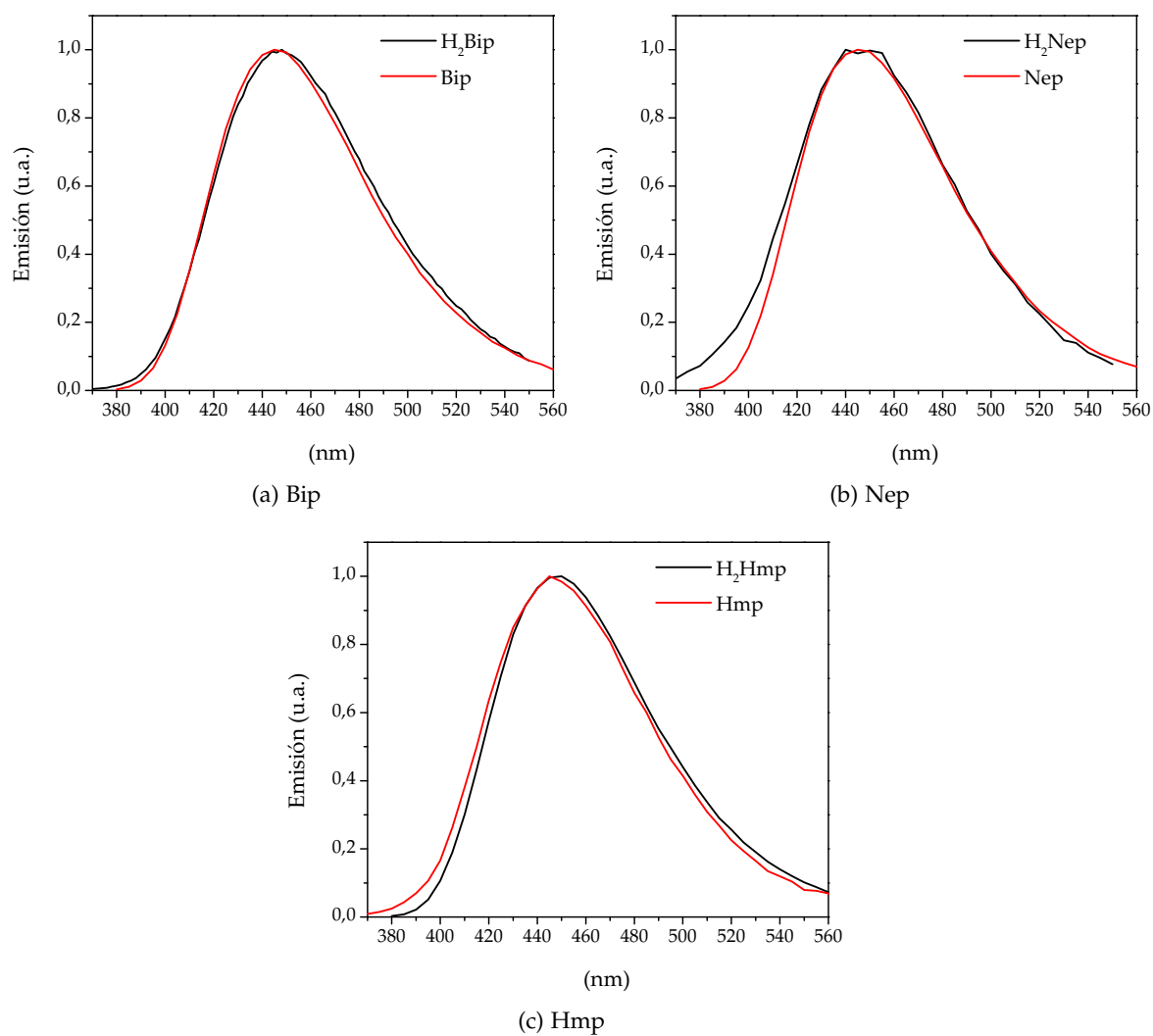


Figura 170: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 7 de dihidroderivados correspondientes al componente de largo (F_2) (línea continua), espectro extraído del análisis global de la solución de cada derivado oxidado (línea punteada). $\lambda_{exc} = 341 \text{ nm}$.

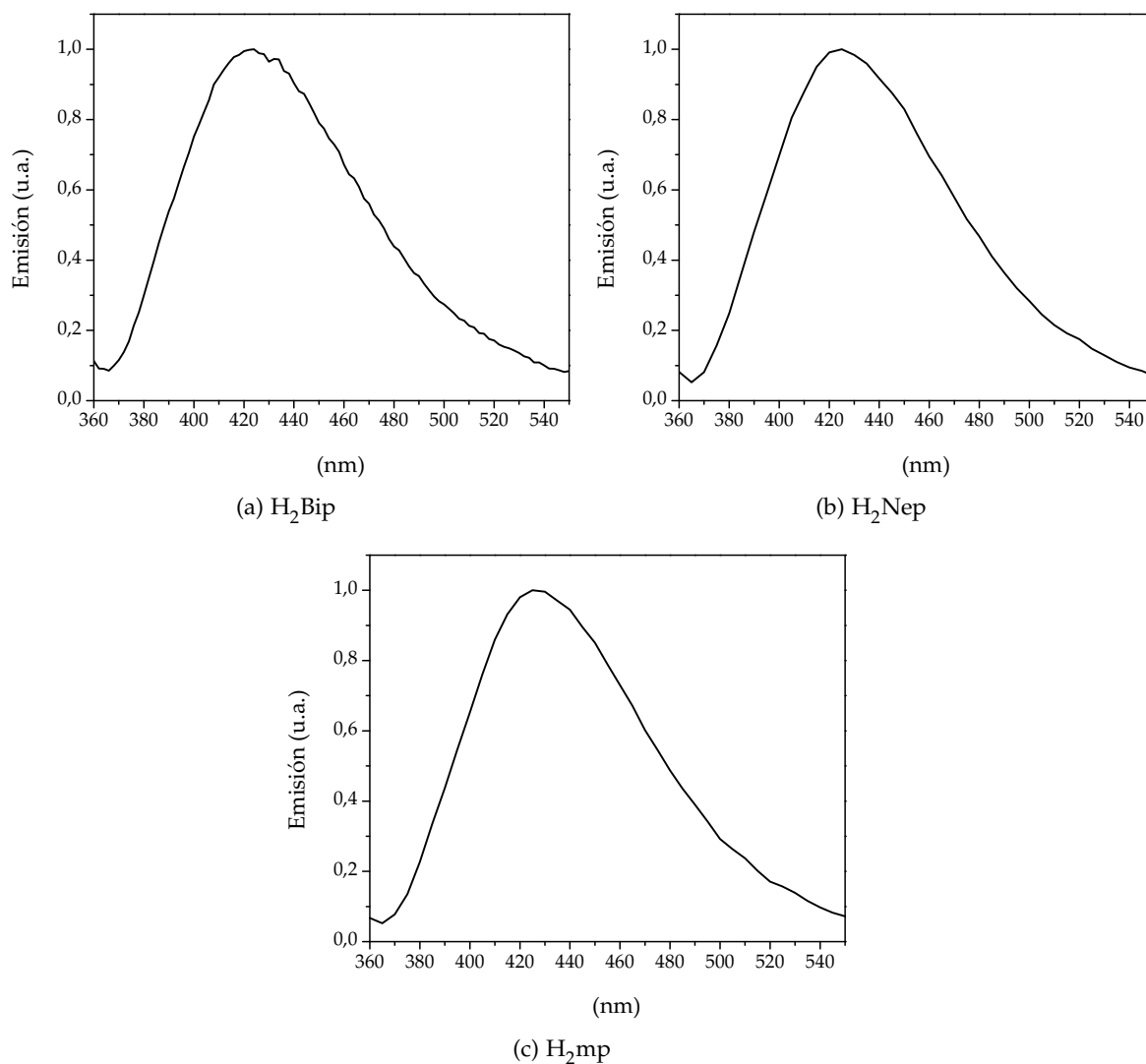


Figura 171: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de soluciones equilibradas en aire a pH 7 de dihidroderivados correspondientes al componente corto (λ_{F1}), λ_{exc} 341 nm.

COMPUESTO	λ_{F1} nm	ϕ_F ns	$\tau_F \cdot 10^3$
H ₂ Fop	528	0,34	8,7(0,3)
Sep	533	0,28	7,0(0,6)
H ₂ Bip	425	0,30	9(2)
H ₂ Nep	425	0,31	5(1)
H ₂ Hmp	425	0,21	3(1)

Tabla 21: Longitud de onda máxima de fluorescencia (λ_{F1}), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) y tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) para soluciones de H₂Pt calculadas a partir del análisis global.

referencia para calcular ϵ_F . Considerando la marcada diferencia entre los valores ϵ_F de las pterinas oxidadas y el de los dihidroderivados, se puede calcular este último valor a partir de los datos arrojados por el análisis global de los espectros TRES, modificando la ecuación 209. En este caso, la intensidad de emisión de cada cada componente se calculó integrando el área bajo la curva de la variación del factor pre-exponencial (ϵ) en función de la longitud de onda (I_{TRES}) (Figura 171). La intensidad total será proporcional al producto entre esta integral y el ϵ_F de cada componente. El $\epsilon_F^{H_2Pt}$ se calculó aplicando la ecuación 211,

$$\epsilon_F^{H_2Pt} = \frac{\epsilon_F^{H_2Pt} \int_{TRES}^{H_2Pt} A^{Pt}}{\epsilon_F^{Pt} \int_{TRES}^{Pt} A^{H_2Pt}} \quad (211)$$

donde los los superíndices H_2Pt y Pt corresponden a un determinado dihidroderivado y su correspondiente derivado oxidado, respectivamente. A es la absorbancia a 341 nm. A^{H_2Pt} y A^{Pt} se calcularon utilizando la ley de Labert y Beer (ecuación 212),

$$A_{341} = \epsilon_{341} l c \quad (212)$$

donde ϵ_{341} es el coeficiente de absorción molar a 341 nm determinado previamente, l es el camino óptico de la celda de fluorescencia (1 cm), y c es la concentración de la muestra determinada por HPLC. Los valores de ϵ_F para los dihidroderivados estudiados se resumen en la Tabla 21. Estos valores son del mismo orden a los determinados para H_2Fop y Sep (sección 14.2.1) y, por lo tanto, mucho menores a los valores reportados para los correspondientes derivados oxidados ($\epsilon_F^{Bip} = 0,36$, $\epsilon_F^{Nep} = 0,38$ y $\epsilon_F^{Hmp} = 0,53$).

Parte IV

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

Las pterinas se encuentran en la naturaleza principalmente como pigmentos en insectos y como cofactores enzimáticos de muchas reacciones del metabolismo de aminoácidos y ácidos nucleicos. Por otro lado, se ha demostrado que algunos derivados se acumulan en la piel de pacientes que sufren vitiligo, enfermedad cutánea que cursa con déficit de pigmentación, debido a la interrupción total o parcial de la síntesis de melanina, el pigmento natural de la piel del ser humano. El déficit de melanina hace que el tejido afectado no pueda filtrar la radiación UV y, por ende, los procesos fotoquímicos que involucran compuestos presentes en la piel adquieren gran interés.

El daño provocado a los componentes del ADN por la radiación UV-A es producido indirectamente por mecanismos fotosensibilizados en los que interviene una segunda molécula, denominada fotosensibilizador. Existen antecedentes en la literatura acerca de reacciones de oxidación de ácidos nucleicos fotoinducidas por pterina (Ptr). En esos estudios se han utilizado distintas moléculas blanco, como ser, nucleótidos libres, fragmentos de ADN doble cadena y plásmidos, y en todos los casos se demostró que Ptr es capaz de producir alteraciones químicas sobre el sustrato utilizado. En estudios recientes se planteó que los mecanismos de reacción involucrados en estos procesos ocurren a través de una competencia entre mecanismos Tipo II (oxidación por oxígeno singlete (1O_2)) y mecanismos Tipo I (transferencia electrónica).

El presente trabajo de Tesis Doctoral aporta información sobre los mecanismos implicados en las reacciones de fotosensibilización de nucleótidos púricos y pirimidínicos por pterinas de interés biomédico en medio acuoso y bajo irradiación UV-A. Se eligieron como fotosensibilizadores derivados pterínicos presentes en la piel de pacientes afectados con vitiligo, biopterina (Bip), 6-formilpterina (Fop) y 6-carboxipterina (Cap); y con Ptr como fotosensibilizador modelo. Se eligieron para este estudio dos nucleótidos púricos, 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP); y un nucleótido de pirimidina 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP). Los tres compuestos son susceptibles a sufrir oxidaciones fotosensibilizadas iniciadas una reacción de transferencia electrónica hacia los estados excitados de fotosensibilizadores. Siendo los nucleótidos pirimidínicos menos propensos a sufrir fotooxidaciones de este tipo debido a su mayor potencial de oxidación. Por otro lado, sólo dGMP es capaz de reaccionar con 1O_2 y dTMP es el único de los tres nucleótidos capaz de sufrir fotosensibilización por un mecanismo de transferencia de energía.

Las conclusiones generales obtenidas en este trabajo de tesis se dividen en cuatro grupos principales y se exponen a continuación:

CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS TRIPLETES Y SU INTERACCIÓN CON LOS NUCLEÓTIDOS

Se caracterizaron los estados excitados tripletes de los sensibilizadores, Bip, Fop, Cap y Ptr. Se determinó la existencia de dos estados excitados tripletes, que corresponden a una especie de tiempo de vida corto (T_c) y otro triplete que posee un tiempo de vida más largo (T_l). Se determinaron las constantes de desactivación total (k_{t_T}) de ambas especies por O_2 y por los nucleótidos en solución acuosa y en medio ácido (pH=5,5), obteniendo valores del orden difusional para estas últimas. Los resultados se resumen en la [Tabla 22](#).

		Ptr		Bip		Fop		Cap	
T_s	T_c	0,36	0,08	0,34	0,04	0,8	0,2	0,6	0,1
	T_l	3,9	0,7	2,5	0,5	2,9	0,6	2,1	0,5
$k_{t_T}^{O_2}$	T_c	0,5	0,1	0,6	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2
	T_l	1,6	0,8	0,8	0,2	0,6	0,2	1,7	0,5
$10^9 M^{-1} s^{-1}$	T_c	0,6	0,1	0,9	0,1	0,9	0,1	0,2	0,1
	T_l	1,4	0,2	1,1	0,2	1,3	0,2	1,6	0,3
$k_{t_T}^{dGMP}$	T_c	2,0	0,1	0,6	0,1	0,9	0,2		0,05
	T_l	5,4	0,1	1,6	0,3	2,0	0,3	0,10	0,05
$10^9 M^{-1} s^{-1}$	T_c	0,4	0,1	-		-			-
	T_l	1,5	0,3	-		-			-

Tabla 22: Tiempos de vida (T) y constantes de desactivación total (k_{t_T}) de los estados excitados tripletes por O_2 ($k_{t_T}^{O_2}$) y por los nucleótidos dAMP ($k_{t_T}^{dAMP}$), dGMP ($k_{t_T}^{dGMP}$) y dTMP ($k_{t_T}^{dTMP}$); en solución acuosa y a pH=5,5.

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE NUCLEÓTIDOS PÚRICOS POR PTERINAS PRESENTES EN LA PIEL

- Se demostró que bajo irradiación UV-A los tres compuestos analizados, Bip, Fop y Cap son capaces de fotoinducir el consumo de los nucleótidos dGMP y dAMP en soluciones acuosas equilibradas con aire. Siendo Fop el sensibilizador más eficiente del grupo de compuestos estudiados.
- La fotosensibilización de dAMP inducida por Bip y Fop ocurre exclusivamente a través de un mecanismo Tipo I. El cual se inicia a partir de la transferencia electrón-

nica desde dAMP hacia uno de los estados excitados tripletes del sensibilizador, la especie T_1 .

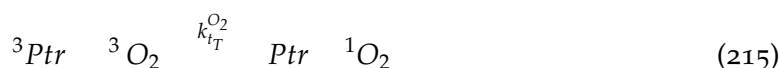
- Por otro lado, aunque una contribución de una oxidación mediada por 1O_2 no puede ser completamente desechada, el principal mecanismo responsable de la fotosensibilización de dGMP involucra también un proceso de transferencia electrónica inducido por Bip. Nuevamente, se confirmó que es el estado excitado triplete del sensibilizador, T_1 , el responsable de la fotooxidación.
- Por otra parte, se demostró que 7,8-dihidrobioppterina (H_2Bip) no es capaz de participar en procesos fotosensibilizados como su análogo oxidado, Bip. Los pequeños valores determinados para el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de fluorescencia ($\Phi_F = 10^{-3}$ y $\tau_F = 1\text{ ns}$, respectivamente) revelan una eficiente desactivación, por procesos no radiativos, del estado excitado singlete. Esta característica disminuye la probabilidad de la formación de los estados excitados tripletes, especies responsables de las reacciones fotosensibilizadas. Esto explica por qué los dihidroderivados no participan en este tipo de procesos.

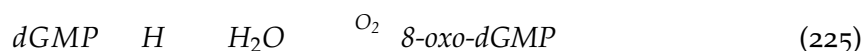
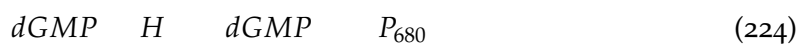
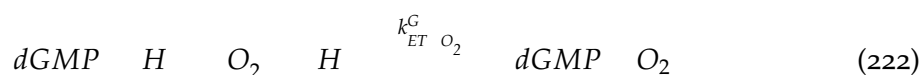
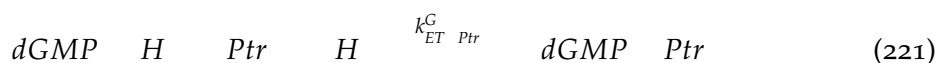
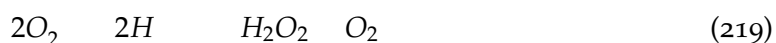
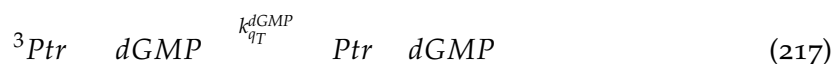
MECANISMO GENERAL DE FOTOSENSIBILIZACIÓN DE *dGMP* POR PTERINAS OXIDADAS

- Se logró dilucidar un mecanismo general de fotosensibilización de dGMP inducido por pterinas oxidadas a partir de un análisis cinético. Se utilizó como sensibilizador modelo a Ptr , el cual es fotoquímicamente más estable que Bip y Fop. El mecanismo se inicia con la transferencia electrónica desde el nucleótido al estado excitado triplete T_1 de Ptr (3Ptr) (reacción 216), y podría emplearse para explicar observaciones experimentales de otros procesos fotosensibilizados que involucran biomoléculas (reacciones 213 a 229).
- Se comprobó la existencia de una reacción de transferencia electrónica entre los radicales anión del sensibilizador y el radical neutro del sustrato, que explica la recuperación del nucleótido y del sensibilizador en ausencia de O_2 (reacción 221). Se determinó la constante para dicha reacción, siendo ésta del orden difusional ($k_{ET}^G = 5,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Por lo tanto, la ausencia de consumo en condiciones anaeróbicas en una reacción fotosensibilizada, se explica mediante una recombinación de los radicales formados y, contrariamente a lo que se ha asumido muchas veces, no descarta un mecanismo Tipo I.
- Se determinó la constante de reacción química entre 3Ptr y dGMP, siendo ésta del orden difusional ($k_{ET}^{dGMP} = 1,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (reacción 216). Comparando éste valor con el valor de la constante de desactivación total del estado T_1 de Ptr por dGMP (k_{tT}^{dGMP}) (Tabla 22), se concluye que solo alrededor del 30% de la desactivación del T_1 de Ptr por dGMP corresponde al proceso de transferencia

electrónica. Aun así es el proceso responsable del consumo de dGMP en soluciones acuosas equilibradas con aire en presencia de Ptr y bajo irradiación UV-A.

- Se determinaron los valores de la constante de desactivación total de 1O_2 por dGMP (k_t^{dGMP}) (reacción 226), resultando, un orden de magnitud mayor k_{ET}^{dGMP} que k_t^{dGMP} . Por lo tanto, Ptr genera eficientemente 1O_2 pero la reacción de los 3Ptr con el sustrato es mucho más rápida y, por ende, ésta última es la vía responsable del consumo de dGMP en las condiciones de concentración y pH utilizadas. Del análisis de la participación del 1O_2 en el proceso fotosensibilizado de dGMP se puede concluir que, si un sensibilizador genera de forma eficiente 1O_2 , el sustrato reacciona con esta especie reactiva y, además el O_2 es necesario para que la reacción ocurra, esto no implica que el proceso se lleve a cabo exclusivamente por mecanismo Tipo II.
- Se determinó que la reacción entre el anión O_2^- y el radical $dGMP^{\cdot-}$, por un lado, recupera al nucleótido y, en otra reacción, se consume para dar como producto principal imidazolona (IdZ) (reacción 223), que en reacciones posteriores genera oxazolona (dZ) como producto final (reacción 227). El primero es un producto típico de oxidaciones fotosensibilizadas Tipo I.
- Al eliminar el O_2 del medio, la velocidad de consumo de dGMP aumenta considerablemente. Se determinó que la aceleración del consumo de dGMP se debe a una reacción entre una molécula de dGMP y otra molécula del nucleótido con su base nitrogenada modificada para formar un producto dimérico, producto al cual se denominó P_{680} (reacción 224). Sería la primera vez que se observan dímeros formados por nucleótidos púricos en reacciones fotosensibilizadas.
- Se determinó como producto de la reacción entre dGMP y el 1O_2 a la espiroimidihidantoina (Sp), la cual se forma en muy pequeña proporción en soluciones acuosas ácidas conteniendo dGMP y Ptr bajo irradiación UV-A.
- Se determinó la formación de 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (8-oxo-dGMP) (reacción 225) en forma indirecta detectando la formación de sus productos de reacción. Estos corresponden a guanidinodihidantoina (dD) (reacción 229) y dihidroguanidinodihidantoina (HdD) (reacción 228). La formación de 8-oxo-dGMP se produce principalmente por un mecanismo Tipo I.

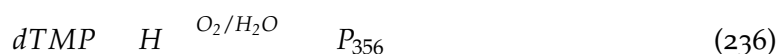
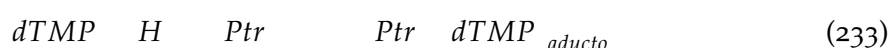
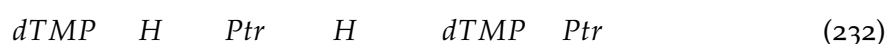
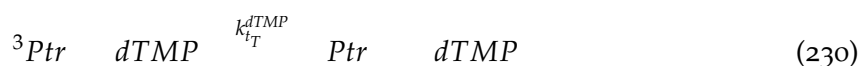




FOTOSENSIBILIZACIÓN DE NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS INDUCIDO POR PTERINA

- Se demostró, por primera vez, que las pterinas poseen capacidad para fotoinducir modificaciones químicas en nucleótidos de pirimidina, en particular dTMP. Este proceso se lleva a cabo tanto en ausencia como en presencia de O_2 . Se determinó que el mecanismo de fotosensibilización se inicia con la transferencia electrónica desde dTMP hacia el estado excitado triplete T_1 de Ptr (reacción 230), mientras que, se descartó la existencia de un proceso de transferencia de energía.

- Con respecto al proceso que se lleva a cabo independiente del O_2 , existen dos reacciones competitivas. Por un lado la recuperación del nucleótido por una reacción de recombinación entre los radicales $dTMP \cdot H$ y Ptr (reacción 232) y, por otro lado, una reacción entre ellos que avanza hacia un aducto estable entre el sensibilizador y el nucleótido (reacción 233). Éste aducto conserva la mayoría de la propiedades espectroscópicas de su precursor Ptr , incluso sus propiedades fluorescentes. Es la primera vez que se reporta una reacción fotosensibilizada inducida por Ptr donde el sensibilizador se consume para dar un aducto con el sustrato.
- En el proceso dependiente de O_2 se determinó la formación de al menos tres productos de reacción. Dos de ellos, 5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina ($HMdUrd$) (reacción 234) y 5-formil-2'-desoxiuridina ($FordUrd$) (reacción 235), son productos conocidos y reportados en la literatura para reacciones fotosensibilizadas de $dTMP$ inducidas por otros sensibilizadores mediante un mecanismo Tipo I. Éstos poseen la porción correspondiente a la base nitrogenada oxidada. Por otro lado, se determinó la formación de un producto que incorpora una modificación química tanto en la base nitrogenada como en el azúcar, el cual no fue reportado previamente y se denominó como P_{356} (reacción 236).



Parte V

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Freire, P. *La educación como práctica de la libertad*; Colección Del taller: Serie "Educación."; Siglo Veintiuno, 1978.
- [2] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer, 2006.
- [3] Gilbert, V. A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1991.
- [4] Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; Univeristy Science Books, 1991.
- [5] Scaiano, J. *CRC handbook of organic photochemistry*; Scaiano 1945-, J. C. J. C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Fla, 1989; Vol. II.
- [6] Braslavsky, S. E. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, *79*, 293–465.
- [7] Wayne, C. E.; Wayne, R. P. *Photochemistry*; Oxford Univerity Press: Oxford, 1996.
- [8] Braun, A.; Maurette, M.; Oliveros, E.; Serpone, N. *Photochemical technology*, 1991; Vol. 104.
- [9] Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*; John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, 2009.
- [10] Foote, C. *Photochemistry and photobiology* **1991**, *54*, 8655191.
- [11] Rovira, M. *El sol*; Eudeba: Buenos Aires, 2011.
- [12] Gasparro, F. P. In *Sunscreen Photobiology*; Spring-Verlag: New York, 1997.
- [13] Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Príncipios de Bioquímica*, 2002; Vol. 2.
- [14] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [15] Ravanat, J. L.; Douki, T.; Cadet, J. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2001**, *63*, 88–102.
- [16] Daya-Grosjean, L.; Sarasin, A. *Mutation research* **2005**, *571*, 43–56.
- [17] Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 13765–70.
- [18] Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N. *Toxicology and applied pharmacology* **2004**, *195*, 298–308.

- [19] Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2006**, *5*, 215–37.
- [20] Coohill, T. P.; Peak, M. J.; Peak, J. G. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, *46*, 1043–1050.
- [21] Hiraku, Y.; Ito, K.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. *Photochemistry and photobiology* **2007**, *83*, 205–12.
- [22] Cadet, J.; Anselmino, C.; Douki, T.; Voituriez, L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1992**, *15*, 277–298.
- [23] Kumar, S.; Sharma, N. D.; Davies, R. H.; Phillipson, D. W.; McCloskey, J. A. *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*, 1199–1216.
- [24] Koning, T. M. G.; Davies, R. J. H.; Kaptein, R. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 277–284.
- [25] Wei, H.; Cai, Q.; Rahn, R.; Zhang, X. *Free Radical Biology and Medicine* **1997**, *23*, 148–154.
- [26] Sancar, A. *Chemical reviews* **2003**, *103*, 2203–37.
- [27] Delatour, T.; Douki, T.; D'Ham, C.; Cadet, J. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, *44*, 191–198.
- [28] Steenken, S. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, 503–520.
- [29] Steenken, S.; Jovanovic, S. V. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 617–618.
- [30] Giese, B. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 631–636.
- [31] Schuster, G. B. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 253–260.
- [32] Wan, C.; Fiebig, T.; Schiemann, O.; Barton, J. K.; Zewail, A. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 14052–14055.
- [33] Candeias, L. P.; Steenken, S. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 1094–1099.
- [34] Cadet, J.; Berger, M.; Buchko, G. W.; Joshi, P. C.; Raoul, S.; Ravanat, J. L. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7403–7404.
- [35] Misiaszek, R.; Crean, C.; Joffe, A.; Geacintov, N. E.; Shafirovich, V. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 32106–15.
- [36] Shafirovich, V.; Cadet, J.; Gasparutto, D.; Dourandin, A.; Geacintov, N. E. *Chemical Research in Toxicology* **2001**, *14*, 233–241.

- [37] Lu, C.; Lin, W.; Wang, W.; Han, Z.; Yao, S.; Lin, N. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2*, 329–334.
- [38] Cadet, J. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *531*, 5–23.
- [39] Wood, M. L.; Esteve, A.; Morningstar, M. L.; Kuziemko, G. M.; Essigmann, J. M. *Nucleic Acids Research* **1992**, *20*, 6023–6032.
- [40] Bernstein, R.; Prat, F.; Foote, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 464–465.
- [41] Shi, Y.; Huang, C.; Wang, W.; Kang, J.; Yao, S. *Radiation Physics and Chemistry* **2000**, *58*, 253–260.
- [42] Cadet, J.; Wagner, J. R. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2013**, *5*.
- [43] Cadet, J.; Treoule, R. *Photochemistry and Photobiology* **1978**, *28*, 661–667.
- [44] Sheu, C.; Foote, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 10446–10447.
- [45] Ravanat, J. L.; Cadet, J. *Chemical Research in Toxicology* **1995**, *8*, 379–388.
- [46] Luo, W.; Muller, J. G.; Rachlin, E. M.; Burrows, C. J. *Organic Letters* **2000**, *2*, 613–616.
- [47] Cadet, J.; Berger, M.; Buchko, G. W.; Incardona, M.-F.; Morin, B.; Raoul, S.; Ravanat, J. In *Oxidative Processes and Antioxidants*; Paoletti, R.; Samuelsson, B., Eds.; Raven Press: New York, 1995; pp 97–115.
- [48] Henderson, P. T.; Delaney, J. C.; Muller, J. G.; Neeley, W. L.; Tannenbaum, S. R.; Burrows, C. J.; Essigmann, J. M. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9257–9262.
- [49] Hopkins, F. G. *Proceedings of the Chemical Society, London* **1889**, *5*, 117.
- [50] Hopkins, F. G. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **1942**, *130*, 359–379.
- [51] Hopkins, F. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B* **1895**, *186*, 661–682.
- [52] Purrmann, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1940**, *544*, 182–190.
- [53] Purrmann, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1941**, *548*, 284–292.
- [54] Schöpf, C.; Reichert, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1941**, *548*, 82–94.
- [55] Albert, A. *Biochem. J.* **1953**, *54*, 640–646.
- [56] Monópoli, V. D.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. *International Journal of Chemical Kinetics* **2000**, *32*, 231–237.

- [57] Thomas, A. H.; Feliz, M. R.; Capparelli, A. L. *Transition Metal Chemistry* **1996**, *21*, 317–321.
- [58] Lorente, C.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 167–173.
- [59] Thomas, A. H.; Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; Martino, R.; Capparelli, A. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, *135*, 147–154.
- [60] Pfleiderer, W. *Chemistry and properties of dihydropterins, in Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*; Pfleiderer, W. H. Wachter, J. A. B. W. d. G. . C., Ed.; Berlin, New York, 1987.
- [61] Pfleiderer, W. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **1978**, *1*, 54–60.
- [62] Maharaj, G.; Selinsky, B. S.; Appleman, J. R.; Perlman, M.; London, R. E.; Blakley, R. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4554–4560.
- [63] Dántola, M. L.; Ph.D. thesis; La Plata; 2008.
- [64] Dantola, M. L.; Vignoni, M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Thomas, A. H. *Helvetica Chimica Acta* **2008**, *91*, 411–425.
- [65] Lorente, C.; Ph.D. thesis; La Plata; 2003.
- [66] Cabrerizo, F.; Thomas, A. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 349–365.
- [67] Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. *Photochemistry and Photobiology* **2005**, *81*, 793–801.
- [68] Thomas, A. H.; Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; García Einschlag, F. S.; Martino, R.; Baiocchi, C.; Pramauro, E.; Capparelli, A. L. *Helvetica Chimica Acta* **2002**, *85*, 2300–2315.
- [69] Laura Dántola, M.; Schuler, T. T. M.; Paula Denofrio, M.; Vignoni, M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Thomas, A. H.; Dántola, M. L. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8692–8699.
- [70] Dántola, M.; Thomas, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Lorente, C. *The Journal of Physical Chemistry* **2007**, *2*, 4280–4288.
- [71] Cabrerizo, F. M.; Laura Dántola, M.; Petroselli, G.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Lorente, C.; Oliveros, E. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, *83*, 526–534.
- [72] Ohue, T.; Koshimura, K.; Lee, K.; Watanabe, Y.; Miwa, S. *Neuroscience Letters* **1991**, *128*, 93–96.
- [73] Frye, R. E.; Huffman, L. C.; Elliott, G. R. *Neurotherapeutics* **2010**, *7*, 241–249.
- [74] Gross, S. S.; Levi, R. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 25722–25729.

- [75] Sumi-Ichinose, C.; Urano, F.; Kuroda, R.; Ohye, T.; Kojima, M.; Tazawa, M.; Shiraishi, H.; Hagino, Y.; Nagatsu, T.; Nomura, T.; Ichinose, H. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 41150–41160.
- [76] Nichol, C. A.; Smith, G. K.; Duch, D. S. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 729–764.
- [77] Reif, A.; Fröhlich, L. G.; Kotsonis, P.; Frey, A.; Bömmel, H. M.; Wink, D. A.; Pfeleiderer, W.; Schmidt, H. H. H. W. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 24921–24929.
- [78] Klatt, P.; Schmid, M.; Leopold, E.; Schmidt, K.; Werner, E. R.; Mayer, B. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 13861–13866.
- [79] Nishida, C. R.; de Montellano, P. R. O. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 5566–5571.
- [80] Marletta, M. A. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 12231–12234.
- [81] Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 20496–20501.
- [82] Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Körner, C.; Harle, K. M.; Schulz-Douglas, V.; Werner, E. R. *Biochimica et biophysica acta* **1998**, *1382*, 339–44.
- [83] Jimbow, K.; Pathak, M. A.; Fitzpatrick, T. B. *Yale Journal of Biology and Medicine* **1973**, *46*, 411–426.
- [84] Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Pittelkow, M. R.; Gütlich, M.; Lemke, K. R.; Rödl, W.; Swanson, N. N.; Hitzemann, K.; Ziegler, I. *Science* **1994**, *263*, 1444–1446.
- [85] Schallreuter, K. U.; Schulz-Douglas, V.; Bünz, A.; Beazley, W. D.; Körner, C. *Journal of Investigative Dermatology* **1997**, *109*, 31–35.
- [86] Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Ziegler, I.; Lemke, K. R.; Pittelkow, M. R.; Lindsey, N. J.; Gütlich, M. *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, *1226*, 181–192.
- [87] Lorente, C.; Thomas, A. *Accounts of chemical research* **2006**, *39*, 395–402.
- [88] Kaufman, S. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245*, 4751–4759.
- [89] Huang, C. Y.; Max, E. E.; Kaufman, S. *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 4235–4241.
- [90] Ayling, J. E.; Rebrin, I.; Thöny, B.; Bailey, S. W. In *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*; Pfeleiderer, W.; Rokos, R., Eds.; Blackwell Science: Berlin, 1997; pp 565–570.
- [91] Curtius, H. C.; Matasovic, A.; Schoedon, G.; Kuster, T.; Guibaud, P.; Giudici, T.; Blau, N. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 3923–3930.

- [92] Davis, M. D.; Ribeiro, P.; Tipper, J.; Kaufman, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 10109–10113.
- [93] Schallreuter, K. U.; Moore, J.; Wood, J. M.; Beazley, W. D.; Gaze, D. C.; Tobin, D. J.; Marshall, H. S.; Panske, A.; Panzig, E.; Hibberts, N. A. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **1999**, *4*, 91–96.
- [94] Aronoff, S. *Science* **1965**, *150*, 72–73.
- [95] Rokos, H.; Beazley, W. D.; Schallreuter, K. U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 805–811.
- [96] Moore, J.; Wood, J. M.; Schallreuter, K. U. *Journal of Raman Spectroscopy* **2002**, *33*, 610–617.
- [97] Vignoni, M.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Claparols, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, *8*, 800–10.
- [98] Lorente, C.; Capparelli, A. L.; Pokhrel, M. R.; Oliveros, E.; Thomas, A. H.; Braun, A. M. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, *1*, 421–426.
- [99] Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Capparelli, A. L. *Photochemistry and photobiology* **2005**, *81*, 793–801.
- [100] Chahidi, C.; Aubailly, M.; Momzikoff, A.; Bazin, M.; Santus, R. *Photochemistry and Photobiology* **1981**, *33*, 641–649.
- [101] Ledbetter, J. W.; Pfleiderer, W.; Freisheim, J. H. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *62*, 71–81.
- [102] Parker, R. T. *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 1921–1926.
- [103] Thomas, A.; Lorente, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 245.
- [104] Cabrerizo, R.; Vignoni, M.; Erra-Balsells, R.; Franco, M.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Cabrerizo, F. M. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 1090–1104.
- [105] Suárez, G.; Cabrerizo, F. M. F.; Lorente, C.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, *132*, 53–57.
- [106] Thomas, A. H.; Suarez, G.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L. *Helvetica Chimica Acta* **2001**, *84*, 3849–3860.
- [107] Mengel, R.; Pfleiderer, W.; Knappe, W. R. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 2817–2820.
- [108] Vignoni, M.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Thomas, A. H. *Photochemistry and Photobiology* **2009**, *85*, 365–373.
- [109] Pfleiderer, W. *Pteridines* **2009**, *20*, 18–21.

- [110] Rokos, H.; Schallreuter, K. In *Chemistry and biology of pteridines and folates*; Milstien, S.; Kapatos, G.; Levine, R. A.; Shane, B., Eds.; Kluwe Academic, 2002; pp 55–59.
- [111] Momzikoff, A.; Santus, R. *Sur les proprietes photosensibilisatrices des pterines. Exemple de la biopterine. Comparaisons avec la riboflavine* **1981**, 293, 15–18.
- [112] Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 3001–3011.
- [113] Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Capparelli, A. L.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Organic & biomolecular chemistry* **2007**, 5, 2792–9.
- [114] Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 3001–3011.
- [115] Ito, K.; Kawanishi, S. *Biochemistry* **1997**, 36, 1774–1781.
- [116] Hirakawa, K.; Suzuki, H.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, 410, 261–268.
- [117] Lorente, C.; Thomas, A. H.; Villata, L. S.; Hozbor, D.; Lagares, A.; Capparelli, A. L. *Pteridines* **2000**, 11, 100–105.
- [118] Offer, T.; Ames, B. N.; Bailey, S. W.; Sabens, E. A.; Nozawa, M.; Ayling, J. E. *FASEB Journal* **2007**, 21, 2101–2107.
- [119] Denofrio, M.; Hatz, S. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, 8, 1539–49.
- [120] Denofrio, M. P.; Lorente, C.; Breitenbach, T.; Hatz, S.; Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H.; Ogilby, P. R. *Photochemistry and Photobiology* **2011**.
- [121] Thomas, A. H.; Serrano, M. P.; Rahal, V.; Vicendo, P.; Claparols, C.; Oliveros, E.; Lorente, C. *Free radical biology & medicine* **2013**, 63, 467–75.
- [122] Castaño, C.; Dántola, M. L.; Oliveros, E.; Thomas, A. H.; Lorente, C. *Photochemistry and photobiology* **2013**.
- [123] Castaño, C.; Lorente, C.; Martins-Froment, N.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, 12, 3877–86.
- [124] Thomas, A. H.; Lorente, C.; Roitman, K.; Morales, M. M.; Dántola, M. L. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2013**, 120, 52–8.
- [125] Laura Dántola, M.; Gojanovich, A. D.; Thomas, A. H. *Biochemical and biophysical research communications* **2012**, 424, 568–72.
- [126] Cavaluzzi, M. J.; Borer, P. N. *Nucleic acids research* **2004**, 32, e13.
- [127] Salomaa, P.; Schaleger, L. L.; Long, F. A. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86, 1–7.

- [128] Guidi, G.; Giuffrida, S.; Condorelli, G.; Costanzo, L. L.; Miano, P.; Sortino, S. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 455–462.
- [129] Denofrio, M. P.; Ogilby, P. R.; Thomas, A. H.; Lorente, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13*, 1058–65.
- [130] Ogilby, P. R.; Foote, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 3423–3430.
- [131] Foote, C. S.; Clennan, E. L. In *Active Oxygen in Chemistry*; Foote, C. S.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F., Eds.; Chapman & Hall: London, 1995; pp 105–140.
- [132] Martinez, L. A.; Martinez, C. G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, *58*, 94–107.
- [133] Bourdelande, J.; Nonell, S.; Acuña, A.; Sastre, R. *Glosario de términos usados en fotoquímica*, 1999.
- [134] Krasnovskii Jr, A. A. *Biophysics* **1979**, *24*, 769–771.
- [135] Rizzi, A.; Ph.D. thesis; Santa Fe; 2003.
- [136] Janzen, E. G. *Accounts of Chemical Research* **1971**, *4*, 31–40.
- [137] Villamena, F. A.; Zweier, J. L. *Antioxidants and Redox Signaling* **2004**, *6*, 619–629.
- [138] Villamena, F. A. *Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 1153–1160.
- [139] Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Journal of American Chemistry Society* **1980**, *102*, 4994–4999.
- [140] Lewis, G.; Kasha, M. *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 2100–2116.
- [141] Ravanat, J.-L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H.; Di Mascio, P.; Cadet, J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, *423*, 23–30.
- [142] Ali, S. M.; Yosipovitch, G. *Acta dermato-venereologica* **2013**, *93*, 261–7.
- [143] Lorente, C.; Thomas, A. H. *Accounts of Chemical Research* **2006**, *39*, 395–402.
- [144] Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *The journal of physical chemistry. A* **2009**, *113*, 1794–9.
- [145] Hodgson, E. K.; Fridovich, I. *Photochemistry and Photobiology* **1973**, *18*, 451–455.
- [146] Eriksen, J.; Foote, C. S.; Parker, T. L. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 6455–6456.
- [147] Fridovich, I. *Annual review of biochemistry* **1995**, *64*, 97–112.
- [148] McCord, J. M.; Fridovich, I. *The Journal of biological chemistry* **1969**, *244*, 6056–6063.

- [149] Braslavsky, S. E. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, *79*, 293–465.
- [150] Fukuzumi, S.; Miyao, H.; Ohkubo, K.; Suenobu, T. *The journal of physical chemistry. A* **2005**, *109*, 3285–3294.
- [151] Kwee, S.; Lund, H. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1973**, *297*, 285–296.
- [152] Song, Q.-H.; Hwang, K. C. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *185*, 51–56.
- [153] Candeias, L. P.; Steenken, S. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 2437–2440.
- [154] Morrison, H. **2003**, *77*, 370–375.
- [155] Olmsted III, J.; Meyer, T. J. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91*, 1649–1655.
- [156] Pedzinski, T.; Markiewicz, A.; Marciniak, B. *Research on Chemical Intermediates* **2009**, *35*, 497–506.
- [157] Al-Sheikhly, M. *Radiation Physics and Chemistry* **1994**, *44*, 297–301.
- [158] Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cadet, J.; Miranda, M. A. *Accounts of chemical research* **2012**, *45*, 1558–70.
- [159] Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J.; Paxton, J. *Mol Pharmacol* **1979**, *16*, 676–685.
- [160] Dántola, M.; Vignoni, M.; González, C. *Free Radical Biology ...* **2010**, *49*, 1014–22.
- [161] Tyagi, A.; Penzkofer, A.; Batschauer, A.; Wolf, E. *Chemical Physics* **2009**, *361*, 75–82.
- [162] Rabek, J. F. *Experimental methods in photochemistry and photophysics, Part 2*; John Wiley and Sons: Chichester, England, 1982.