



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química

El papel de los metabolitos en la fototoxicidad de filtros  
solares

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Química Sostenible

AUTOR/A: Garcia Castellanos, Marina

Tutor/a: Climent Olmedo, María José

Cotutor/a externo: RODRIGUEZ MUÑIZ, GEMMA MARIA

Director/a Experimental: LHIAUBET, VIRGINIE LYRIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, Dra. Virginie Lhiaubet Vallet por haberme recibido con los brazos abiertos y por la confianza depositada en mí desde el primer momento.

A mi directora de proyecto, Dra. Gemma María Rodríguez Muñiz por resolverme cualquier tipo de duda y guiarme durante todos estos meses de trabajo. Gracias por su paciencia, todo lo que he aprendido estos meses y lo cómoda que me he sentido ha sido en gran parte por ti.

A Meryem El Ouardi y a la Dra. Inmaculada Andreu por la ayuda que me han brindado en la realización de la parte experimental que se ha llevado a cabo en el Hospital Politécnico de la Fe.

Agradecer al aula CIMSA por las ayudas a los Trabajos Fin de Máster, es de vital importancia promover la sostenibilidad en el campo de la investigación.

A mis “compañeras de piso” que han pasado ser parte de mi familia, gracias por vuestro apoyo, sin vosotras no hubiera sido lo mismo.

Por último, gracias a mis padres que han luchado siempre para que pueda alcanzar todo lo que me proponga. Gracias por estar ahí incondicionalmente, por confiar en mí y por ayudarme en los momentos más difíciles. Gracias por inculcarme el espíritu de trabajo bajo el lema siempre de “suerte no, justicia”.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**2,4:** 2,4-dimetoxibenzofenona

**AcN:** Acetonitrilo

**BP:** Benzofenona

**OB:** Oxibenzona

**CIS:** Cruce intersistemas

**CPZ:** Clorpromazina

**dGuo:** 2'-desoxiguanosina

**D<sub>1</sub>-Br:** Acetobromo- $\alpha$ -D-glucosa

**D<sub>2</sub>-Br:** Acetobromo- $\alpha$ -D-glucoronic acid

**EHMC:** Metoxicinamato de etilhexilo (por sus siglas en inglés, *ethylhexyl methoxycinnamate*)

**EHS:** Salicilato de etilhexilo (por sus siglas en inglés, *ethylhexyl salicylate*)

**ESPT:** Transferencia de protón intramolecular en el estado excitado (por sus siglas en inglés, *excited state proton transfer*)

**E<sub>T</sub>:** Energía del estado excitado triplete

**HRMS:** Espectrometría de masas de alta resolución (por sus siglas en inglés, *high resolution mass spectrometry*)

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibidora media

**IUPAC:** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

**LFP:** Fotólisis de destello láser (por sus siglas en inglés, *laser flash photolysis*)

**NRU:** Absorción de rojo neutro (por sus siglas en inglés, *neutral red uptake*)

**PBS:** Tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, *phosphate-buffer saline*)

**Phs:** Fotosensibilizador

**PIF:** Factor de fotoirritación (por sus siglas en inglés, *photo irritation factor*)

**PN:** Perinaftenona

**Pyr:** Pirimidina

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxígeno singlete

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**ROS:** Especie reactiva de oxígeno (por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*)

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**Thd:** Timidina

**TETT:** Transferencia de energía triplete-triplete

**UV:** Ultravioleta

$\delta$ : Desplazamiento químico

$\lambda$ : Longitud de onda

$\lambda_{em}$ : Longitud de onda de emisión

$\lambda_{exc}$ : Longitud de onda de excitación

$\lambda_{phos}$ : Longitud de onda de fosforescencia

$\Phi_{\Delta}$ : Rendimiento cuántico de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

$\tau$ : Tiempo de vida

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Impacto medioambiental de los distintos filtros solares .....	1
1.2	Propiedades fotofísicas y estado excitado triplete .....	3
1.3	Fototoxicidad y fotoalergia. Test de fototoxicidad NRU .....	6
1.4	Principales filtros solares. La oxibenzona (OB) y su metabolismo .....	8
2.	OBJETIVOS.....	12
3.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	13
3.1.	Reactivos y materiales .....	13
3.2.	Instrumentación .....	13
3.2.1	Cromatografía en capa fina y en columna .....	13
3.2.2	Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	13
3.2.3	Espectrofotometría UV-visible (UV) .....	14
3.2.4	Fluorímetro .....	14
3.2.5	Fotólisis de destello láser .....	14
3.2.6	Medidas de oxígeno singlete .....	15
3.2.7	Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer (UPLC-MS) .....	15
3.3	Parte experimental.....	16
3.3.1	Síntesis “one pot” del metabolito M1.....	16
3.3.2	Síntesis en dos etapas del metabolito M2.....	16
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1	Síntesis de los metabolitos M1 y M2.....	21
4.2	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) .....	22
4.3	Fotólisis en estado estacionario-simulador solar .....	23
4.4	Fosforescencia .....	25
4.5	Fotólisis de destello láser .....	25
4.5.1	Determinación de las especies transitorias generadas para M1, M2 y 2,4 .....	26
4.5.2	Reacciones de fotosensibilización .....	29
4.5.2.1	Reacciones de Tipo I .....	29
4.5.2.2	Reacciones de Tipo II .....	31
4.5.2.3	Reacciones de Tipo III .....	33
4.5.2.4	Conclusiones extraídas de las reacciones de fotosensibilización .....	34
4.6	Ensayo <i>in vitro</i> de fototoxicidad por captación de rojo neutro en células 3T3.....	35
5	CONCLUSIONES .....	40

6	BIBLIOGRAFÍA .....	41
7	ANEXO .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Espectro electromagnético Ultravioleta (100- 400nm)-Visible (400- 700nm) ..	1
Figura 2.	Estructura de OB, EHS y EHMC, respectivamente .....	2
Figura 3.	Tautomerización de la Avobenzona en su forma dicetónica en presencia de luz.....	3
Figura 4.	Diagrama de Jablonski.....	4
Figura 5.	Mecanismos de fotosensibilización .....	6
Figura 6.	Placas control positivo Clorpromacina (CPZ) en presencia (UVA) y ausencia de luz (DARK) .....	7
Figura 7.	Cálculo del factor PIF a través de los IC <sub>50</sub> en ausencia (-Irr) y presencia (+Irr) de luz.....	8
Figura 8.	Isomerización del E-OMC (octil- <i>p</i> -metoxi- <i>trans</i> -cinamato) tras la exposición a la luz solar .....	8
Figura 9.	Espectros de absorción de los compuestos OB y de la 2,4-dimetoxibenzofenona (control) a la misma concentración en AcN .....	9
Figura 10.	Metabolitos de Fase II de la OB estudiados en este trabajo.....	10
Figura 11.	Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M1-protégido .....	17
Figura 12.	Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M1.....	17
Figura 13.	Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M2-protégido .....	19
Figura 14.	Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M2.....	19
Figura 15.	Mecanismo de reacción “Königs-Knorr” y etapa de desprotección del metabolito M1 .....	22
Figura 16.	Espectro de absorción UV-Vis de la OB, 2,4, M1 y M2 en AcN.....	22
Figura 17.	Espectros de absorción UV-Vis del M1 en AcN y aire/N <sub>2</sub> a varios tiempos de irradiación .....	23

Figura 18. Espectro de emisión excitando a $\lambda_{ex}$ 286 nm de 2,4, M1 y M2 en PBS (rojo) y EtOH (negro), a 77K .....	24
Figura 19. Espectros de absorción transitoria a $\lambda_{exc}$ 290 nm para 2,4, M1 y M2 en AcN bajo $N_2$ .....	26
Figura 20. Decaimiento a 680 nm de 2,4 a la misma concentración en AcN en $N_2$ , aire y $O_2$ .....	28
Figura 21. Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de $O_2$ para 2,4, M1 y M2 .....	28
Figura 22. Reacción de fotosensibilización Tipo I con la base dGuo (2'-desoxiguanosina) .....	29
Figura 23. Decaimiento en el máximo de absorción a $\lambda_{exc}$ 320 nm de 2,4 (680 nm), M1 y M2 (650 nm) a distintas concentraciones de dGuo.....	30
Figura 24. Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de dGuo para 2,4, M1 y M2.....	31
Figura 24. Esquema de formación de $^1O_2$ .....	31
Figura 26. Decaimiento a $\lambda_{ex}$ 266 nm de 2,4, M1, M2 en presencia de aire.....	32
Figura 27. Proceso de fotosensibilización de la pirimidina (Pyr) para dar dímeros de tipo ciclobutánico .....	33
Figura 28. Decaimiento registrado a $\lambda_{exc}$ 320 nm de 2,4, M1 y M2 (normalizado) a distintas concentraciones de Thd.....	33
Figura 29. Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de Thd para 2,4, M1 y M2 .....	34
Figura 30. Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz del control CPZ (izquierda) y SDS (derecha) .....	36
Figura 31. Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz de la OB y 2,4.....	37
Figura 32. Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz de M1 y M2.....	37
Figura 33. Espectros de absorción de OB (Oxy) y 2,4 .....	38
Figura 34. Espectros de absorción de M1 y M2 .....	39

## RESUMEN

El uso de filtros ultravioleta (UV) se ha extendido en la actualidad para millones de personas. Sin embargo, algunos de ellos no son biodegradables en su totalidad lo que ha provocado su difusión y bioacumulación en diversos ecosistemas provocando un alto impacto ambiental. Dichos filtros solares o sus metabolitos son capaces de reaccionar en presencia de luz provocando efectos altamente negativos sobre el medio ambiente. Dicho impacto afecta directamente al blanqueamiento de corales, entre otros.

En este sentido la Oxibenzona (OB), derivado de la benzofenona, es un filtro solar muy común en los protectores solares, pero se ha demostrado que su absorción por determinados organismos marinos da lugar a su metabolización y a la formación de derivados glucosídicos fototóxicos. En el presente Trabajo de Fin de Máster se han sintetizado y caracterizado dos metabolitos, M1 y M2, de Fase II de la OB con el fin de investigar sus propiedades fotofísicas y fototóxicas.

Se ha demostrado la formación del estado triplete del producto comercial 2,4-dimetoxibenzofenona (2,4), usado como referencia, y de los metabolitos M1 y M2 a través de técnicas de fosforescencia y de fotólisis de destello láser. Mediante esta última técnica se ha comprobado la naturaleza desactivadora del O<sub>2</sub> que da lugar a la disminución del tiempo de vida del estado triplete de los 3 compuestos. Además, se ha comprobado la naturaleza fotosensibilizadora de 2,4, M1 y M2 a través de los tres tipos de reacciones clasificadas en fotobiología como reacciones de Tipo I, II y III.

En cuanto a su toxicidad, se ha evaluado *in vitro*, tanto para la OB como para la 2,4 y los metabolitos, a través de ensayos toxicológicos de viabilidad celular, Neutral Red Uptake (NRU, por sus siglas en inglés), y comprobándose solo fototoxicidad en la 2,4 mientras que la OB mostró ser no fototóxica. En cuanto a M1 y M2, estudios complementarios han demostrado que no internalizan en las células y, por tanto, se ha planteado otro tipo de ensayo toxicológico que permite estudiar la fototoxicidad de ambos metabolitos generados *in situ*.

## ABSTRACT

The use of ultraviolet (UV) filters is now widespread for millions of people. However, some of them are not fully biodegradable, which has led to their diffusion and bioaccumulation in various ecosystems, causing a high environmental impact. These sunscreens or their metabolites are able to react in presence of light causing highly negative effects on the environment. The aforementioned impact directly affects coral bleaching.

Oxybenzone (OB), a benzophenone derivative, is a very common UV filter in sunscreens, but recent studies show that its absorption by certain marine organisms results in its metabolization and formation of phototoxic glycosides. In this Master's Thesis two Phase II metabolites, M1 and M2, of OB have been synthesized and characterized in order to determine their photophysical and phototoxic properties.

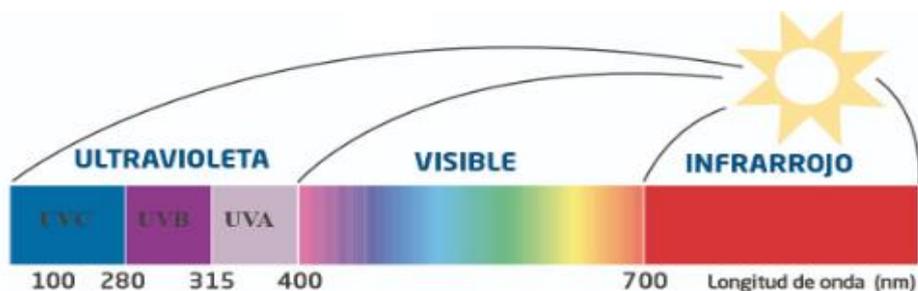
The formation of the triplet state of the commercial product 2,4-dimethoxybenzophenone (2,4) and the metabolites M1 and M2 has been monitored by phosphorescence and laser flash photolysis techniques. By means of the latter, the deactivating nature of O<sub>2</sub> has been verified through the decrease of the triplet state lifetime of the three compounds. In addition, the sensitizing nature of 2,4, M1 and M2 has been observed through the different types of reaction classified in photobiology as Type I, II and III.

Toxicity has been evaluated *in vitro* for OB, 2,4 and the metabolites M1 and M2 through a cell viability toxicological assay (Neutral Red Uptake, NRU). Only 2,4 is phototoxic while OB was shown to be non-phototoxic. In the case of M1 and M2, complementary studies revealed that they do not internalize in cells. Therefore, other type of toxicological assay has been proposed to study the phototoxicity of both metabolites generated *in situ*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Impacto medioambiental de los distintos filtros solares

La concienciación frente a la exposición a los rayos UV procedentes del sol ha crecido notablemente en estas últimas décadas. El sol es la principal fuente de Vitamina D y aporta numerosos beneficios a la salud, por ejemplo: fortalece nuestros huesos, músculos e incluso nuestro sistema inmunológico. Sin embargo, se ha demostrado que una exposición excesiva a la luz solar sin la protección adecuada puede llevar a numerosos efectos negativos tales como quemaduras solares, envejecimiento prematuro o incluso al desarrollo de melanomas. <sup>[1]</sup> La mejor prevención contra tales efectos es la fotoprotección. La luz solar contiene principalmente tres tipos de radiación: infrarroja, visible y UV, siendo esta última la más perjudicial para la salud. La radiación UV comprende el rango del espectro comprendido entre 100-400 nm (ver **Figura 1**), pero solamente entre 290 y 400 nm, es decir, el UVA y una parte del UVB, es el que realmente llega a la superficie terrestre, mientras que el UVC es absorbido en su totalidad por la capa de ozono.

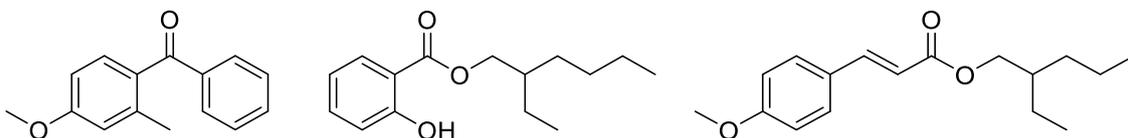


**Figura 1.** Espectro electromagnético Ultravioleta (100- 400nm)-Visible (400- 700nm).

Los fotoprotectores contienen filtros para este tipo de radiación (UVA y UVB), ya sean físicos (inorgánicos) o químicos (orgánicos). <sup>[2]</sup> Estos últimos se caracterizan por tener una estructura basada en anillos aromáticos, presentando dobles enlaces  $-C=C-$  conjugados y/o grupos carbonilo  $-C=O$ . Dicha naturaleza les otorga la capacidad de absorber luz en un amplio rango de longitudes de onda, disminuyendo así la absorción de fotones en la piel procedentes de la radiación solar.

Preservar el medioambiente es en la actualidad un campo emergente con un doble objetivo: proteger la salud de los seres humanos a la vez que proteger la salud de nuestro planeta para generaciones actuales y futuras. El comportamiento humano ha llevado a una transgresión de numerosos límites planetarios, poniendo la salud de los seres humanos y del planeta en riesgo. En este sentido, el uso creciente de los protectores solares ha desencadenado su acumulación en diferentes ecosistemas provocando un alto impacto ambiental [3] así como diferentes problemas de (foto)toxicidad.[4] Los filtros químicos UV que se han encontrado en mayor concentración en diferentes masas de agua son la benzofenona-3 (BP-3), también conocida como oxibenzona (OB) y el salicilato de etilhexilo (EHS) (ver **Figura 2**). [5]

Se ha demostrado la toxicidad de este tipo de filtros en una gran variedad de organismos vivos acuáticos tales como mamíferos, algas y corales. Un ejemplo concreto son las microalgas, organismos altamente estudiados, cuyo crecimiento ha sido alterado en presencia de estos compuestos orgánicos. [6] Además, se ha demostrado el impacto directo sobre los arrecifes de coral cuando se alcanzan altos niveles de concentración de dichos filtros en sistemas de agua marina. [7] El declive de este tipo de ecosistema se atribuye desde un principio a distintos factores globales tales como el aumento drástico de la temperatura, la alta irradiación o la contaminación, pero la disminución de corales es exacerbada por factores antropológicos locales como es el caso del papel de los filtros solares en su blanqueamiento. [8] Es por ello que numerosos destinos turísticos como México o Hawaii han prohibido el uso de ciertos filtros orgánicos en los protectores solares, tales como la OB y el metoxicinamato de etilhexilo (EHMC) (ver **Figura 2**). [9]



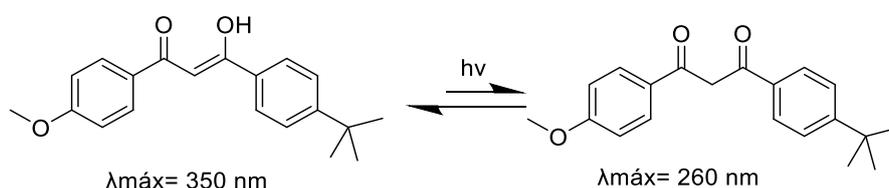
**Figura 2.** Estructura de OB, EHS y EHMC, respectivamente.

Las depuradoras de aguas residuales son fundamentales en el proceso de reciclado del agua. El agua utilizada por humanos pasa por estas instalaciones

para su tratamiento antes de volver a los ríos y arroyos. Estas centrales tienen dificultades para tratar los filtros orgánicos debido a propiedades químicas tales como: que tienen una baja solubilidad en agua, son altamente lipófilos y poseen un alto contenido en carbono en medios acuosos. <sup>[10]</sup> Las concentraciones de filtros orgánicos en diferentes medios acuosos presentan variaciones estacionales, con una mayor concentración en verano. Se calcula que hasta 14.000 toneladas de protectores solares son arrastrados a los arrecifes debido a actividades turísticas, <sup>[11]</sup> siendo la OB un ingrediente activo muy común en este tipo de protectores.

## 1.2 Propiedades fotofísicas y estado excitado triplete

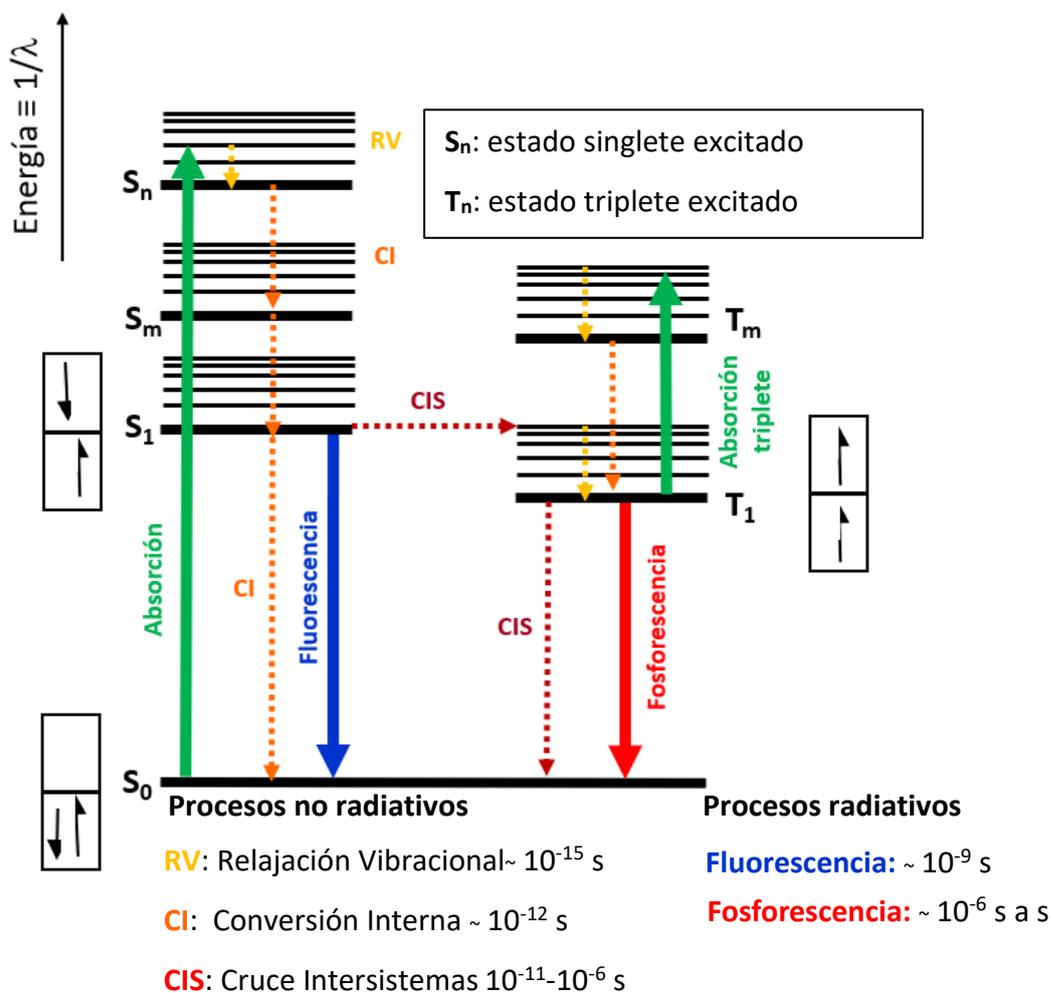
Las propiedades que han de tener los protectores solares para ser efectivos son: alta fotoestabilidad y baja fotorreactividad, es decir, deben ser capaces de absorber la radiación UV, y a su vez ser lo suficientemente estables para evitar que a través de reacciones fotoquímicas se transformen en otros subproductos. Como ejemplo de este tipo de estudio tenemos el trabajo del grupo publicado por Paris *et al.* donde se han evaluado la fotoestabilidad y propiedades fotosensibilizantes de la Avobenzona, filtro UVA típico en los protectores solares. Se ha demostrado que, al exponer la Avobenzona a la radiación UVA se produce una tautomerización en la que se transforma en su forma dicetónica (ver **Figura 3**). Esta tautomerización resulta no solo en la pérdida de protección en el UVA, sino también en el aumento de fotorreactividad.



**Figura 3.** Tautomerización de la Avobenzona en su forma dicetónica en presencia de luz. <sup>[12]</sup>

Asimismo, estudios de absorción transitoria han demostrado la formación del estado excitado triplete del isómero dicetónico, <sup>[12]</sup> así como su reactividad con componentes biológicos como la timidina (Thd) y la 2'-desoxiguanosina (dGuo).

Para que se puedan dar los distintos procesos foto físicos el compuesto ha de ser capaz primero de absorber la radiación incidente (Ley de Grotthus-Draper). El diagrama de Jablonski (ver **Figura 4**) se utiliza para explicar gráficamente los caminos de desactivación/excitación.



**Figura 4.** Diagrama de Jablonski.

El primer paso consiste en la excitación/absorción de la luz a una determinada longitud de onda produciéndose una transición desde el estado electrónico fundamental ( $S_0$ ) a un estado excitado singlete ( $S_{1/2/3\dots}$ ), dependiendo de la energía de la radiación incidente. A continuación, se produce una relajación a través de distintos procesos no radiativos ultrarrápidos hasta alcanzar el nivel vibracional más bajo del estado de más baja energía,  $S_1$ . A partir de este estado,

existen diferentes caminos de desactivación dependiendo de diversos factores, ya sea la naturaleza del cromóforo, el disolvente presente, la temperatura...

Los estados singlete son más energéticos que los estados triplete, pero tienen la desventaja de tener tiempos de vida ( $\tau$ ) más cortos. Así, su reactividad en disolución puede verse limitada por el proceso de difusión. En el presente trabajo nos hemos centrado en los estados excitado triplete, los cuales son más bajos en energía, pero viven un  $\tau$  mayor, lo que favorece los distintos tipos de reacciones de fotosensibilización. El estado triplete se forma a partir de un cruce intersistemas (CIS) desde el  $S_1$  hacia el estado triplete, con una inversión de spin.

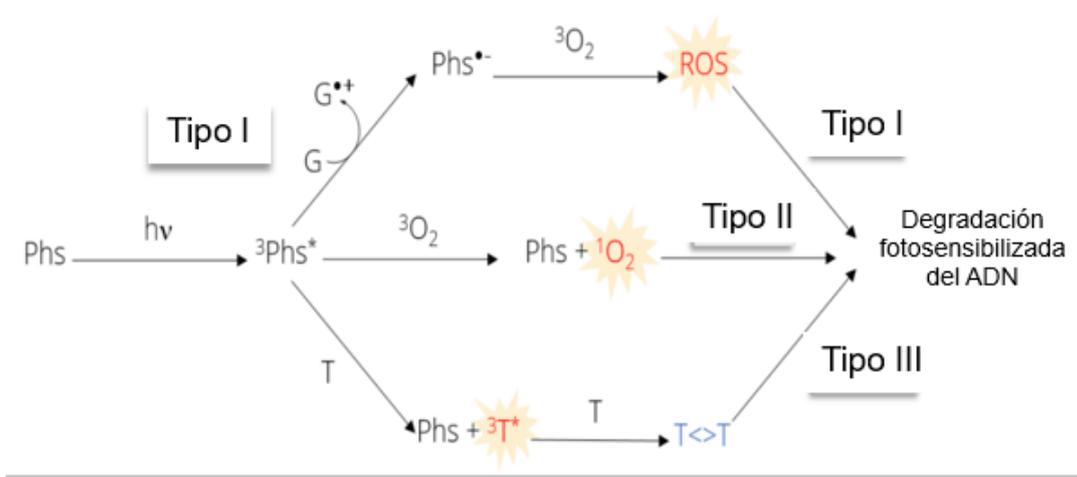
Una vez alcanzado dicho estado electrónico la energía puede disiparse en forma de calor por procesos no radiativos o por emisión en forma de fosforescencia (proceso radiativo), y se pueden llevar a cabo procesos fotoquímicos que generan nuevas especies excitadas o nuevos compuestos. La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés) describe el proceso de fotosensibilización como “el proceso por el cual se produce una alteración fotoquímica o fotofísica en una entidad molecular como resultado de la absorción inicial de radiación por otra entidad molecular denominada fotosensibilizador”. En los procesos con compuestos biológicos se definen tres tipos de reacciones que se pueden llevar a cabo: Tipo I, Tipo II y Tipo III (ver **Figura 5**).<sup>[13]</sup>

Aquellas moléculas que presentan una elevada energía de triplete ( $E_T$ ) y  $\tau$  del estado triplete largo son capaces de transferir su energía de estado triplete (TETT / Tipo III) a moléculas con una energía de estado triplete menor. Este proceso resulta en la desactivación del estado triplete del fotosensibilizador (disminución de  $\tau$ ) y generación del estado triplete del aceptor. Este tipo de reacciones solo se dan en el ADN con pirimidinas, que forman a su vez dímeros de tipo ciclobutano a través de una reacción de cicloadición (2+2).

Las reacciones de Tipo I son aquellos procesos de fotosensibilización que involucran la formación de radicales (iónicos o neutros) como resultado de la abstracción de un átomo de H o de una transferencia electrónica. La reacción de

abstracción de H por parte de moléculas con grupos carbonilo y triplete de naturaleza  $n\pi^*$  es la más estudiada con diferencia. [14]

Las reacciones de Tipo II son debidas a la formación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Esta especie se clasifica como especie reactiva del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) y se obtiene cuando la energía triplete de un fotosensibilizador es transferida al oxígeno molecular, el cual, debido a su configuración electrónica, es incapaz de oxidar eficientemente biomoléculas y se transforma finalmente en oxígeno singlete.



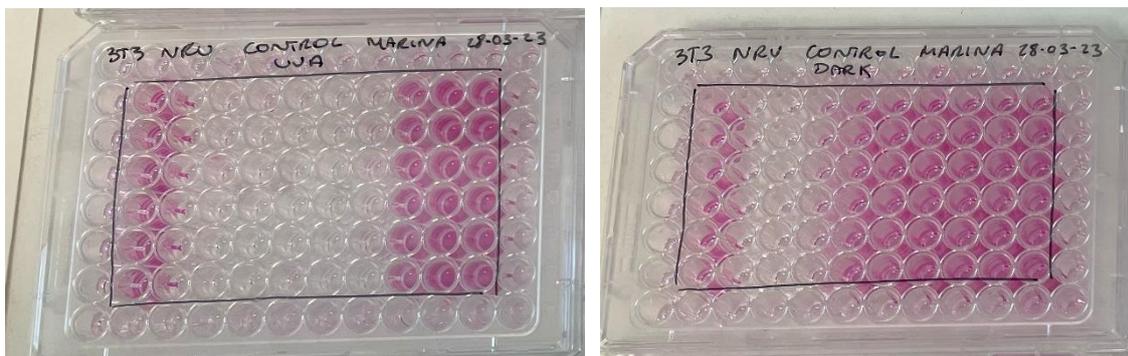
**Figura 5.** Mecanismos de fotosensibilización, donde Phs= Fotosensibilizador, reacción de transferencia de un electrón o protón (Tipo I) siendo G= Guanina, adición de  $^1O_2$  (Tipo II) y transferencia de energía triplete-triplete (Tipo III), donde T= Timina.

### 1.3 Fototoxicidad y fotoalergia. Test de fototoxicidad NRU.

La fotosensibilidad es una reacción adversa al sol (especialmente frente al espectro de luz UV). Este término se subdivide en fototoxicidad y fotoalergia. [15]

Una reacción es fototóxica si no implica una respuesta inmunológica generando un daño tras la exposición a un agente fotosensibilizante que se activa con la radiación UV, y a diferencia de las reacciones de fotoalergia, no requiere una sensibilización previa y puede manifestarse desde la primera exposición. Las reacciones fotoalérgicas se dan con menor frecuencia que las fototóxicas, y por lo general, no dependen de la dosis y afectan tanto a zonas fotoexpuestas como a no fotoexpuestas.

En las últimas décadas el aumento de reacciones de fotosensibilización, así como el cáncer de piel, ha hecho obligatoria la evaluación de fármacos o xenobióticos expuestos a la radiación solar. Así, el ensayo 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) ha sido validado como ensayo *in vitro* para identificar el potencial fototóxico de una sustancia química activada por la exposición a la luz. Se trata de un protocolo establecido y aceptado en Europa (OCDE 2004). Su finalidad es evaluar la fotocitotoxicidad a través de una disminución relativa de la viabilidad de las células (células de ratón) expuestas al compuesto cuya fototoxicidad se quiere evaluar, en presencia o ausencia de luz. Se trata de un ensayo colorimétrico en el que la viabilidad celular se manifiesta por el color rosa de los pocillos debido a que en este caso el colorante rojo neutro penetra dentro de las células vivas y, al contrario, en el caso de muerte celular las células son incapaces de absorber dicho colorante, lo que se traduce por pocillos incoloros (ver **Figura 6**).



**Figura 6.** Placas control positivo Clorpromacina (CPZ) en presencia (UVA) y ausencia de luz (DARK) a concentraciones decrecientes desde 500 a 0,57  $\mu\text{M}$ , 6 repeticiones cada una de ellas.

Todas las sustancias químicas identificadas como positivas en esta prueba pueden ser fototóxicas *in vivo*, tras una aplicación tópica o administración sistémica y su distribución en la piel y/o los ojos. Este ensayo no está diseñado para predecir otros efectos adversos: no aborda términos como fotogenotoxicidad, fotoalergia o fotocarcinogenicidad. El factor de foto-irritación (PIF, por sus siglas en inglés Photo Irritation Factor) es el que determina a través

de dicho ensayo si la sustancia es o no finalmente fototóxica, y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

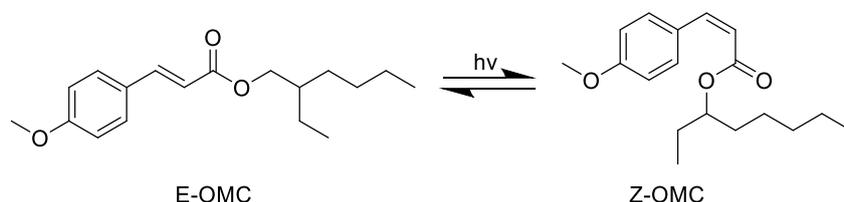
**Figura 7.** Cálculo del factor PIF a través de los  $\text{IC}_{50}$  en ausencia (-Irr) y presencia (+Irr) de luz. <sup>[16]</sup>

La concentración inhibidora media ( $\text{IC}_{50}$ ) es la concentración necesaria de una sustancia para reducir, *in vitro*, la actividad biológica a la mitad.

Un compuesto con un  $\text{PIF} < 2$  se considera como "no fototóxico". Un  $2 < \text{PIF} < 5$  predice una "fototoxicidad equívoca" y un  $\text{PIF} > 5$  supone "fototoxicidad".

#### 1.4 Principales filtros solares. La oxibenzona (OB) y su metabolismo

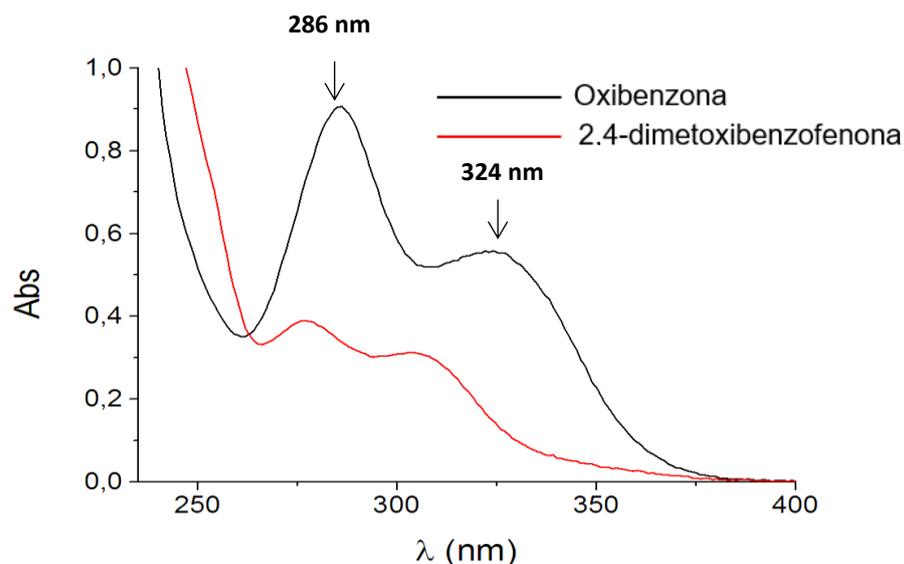
Los filtros químicos se clasifican en grupos dependiendo de su estructura química ya que tanto su espectro de absorción como su relajación no radiativa están directamente relacionados con ella. Uno de éstos son los cinamatos, los cuales presentan un doble enlace entre el grupo fenilo y carbonilo que puede fotoisomerizar de su forma térmicamente estable *trans* a su isómero *cis* (ver **Figura 8**), y permite una desactivación eficiente de los estados excitados. El isómero octil-*p*-metoxi-*cis*-cinamato (Z-OMC), obtenido tras isomerización, presenta efectos adversos en células humanas. <sup>[17]</sup> Este proceso es reversible térmicamente y permite la regeneración de la forma activa del filtro.



**Figura 8.** Isomerización del E-OMC (octil-*p*-metoxi-*trans*-cinamato) tras la exposición a la luz solar.

En el presente trabajo de Fin de Máster, se estudia un filtro derivado de la familia de la benzofenona. La OB es una benzofenona que presenta un grupo hidroxilo en *orto* y metoxi en posición *para* al carbonilo. Estos grupos funcionales dan lugar

desplazamiento batocrómico de su espectro de absorción UV (desplazamiento hacia el rojo) respecto al de la benzofenona. Se observan dos máximos de absorción (ver **Figura 9**): uno a 286 nm (UVB) el cual se atribuye a la transición de naturaleza ( $\pi,\pi^*$ ) localizada en los grupos fenilos y otro a 324 nm (UVA) atribuido a la transferencia de carga debida a la presencia del puente de H formado entre el grupo hidroxilo y el carbonilo. [18]

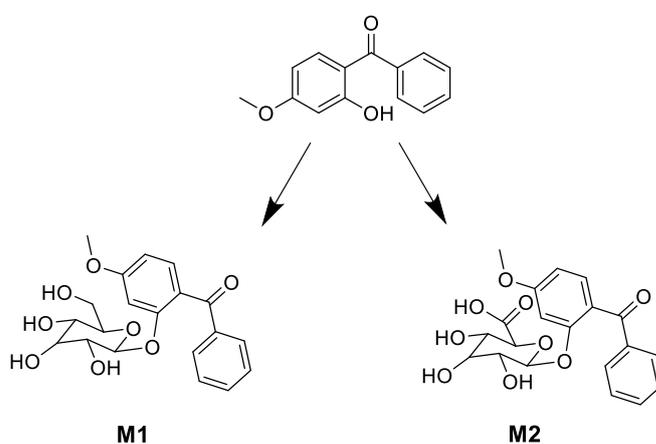


**Figura 9.** Espectros de absorción de los compuestos OB y de la 2,4-dimetoxibenzofenona (control) a la misma concentración en AcN.

La fototoxicidad, en numerosas ocasiones, implica la excitación de moléculas sensibilizadoras y la población del estado triplete, siendo éste capaz de reaccionar con biomoléculas a través de los procesos de Tipo I/II ó III, comentados previamente. A diferencia de la benzofenona, la cual presenta un alto cruce intersistemas y es responsable de reacciones con componentes biológicos, [19] en la OB existen interacciones por puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo (-OH) y el grupo carbonilo (-C=O) dando lugar a una transferencia de protón intramolecular en el estado excitado (ESPT, por sus siglas en inglés Excited State Proton Transfer). Esta interacción aumenta la desactivación no radiativa a partir del estado excitado singlete y disminuye en gran medida el cruce intersistemas y por tanto la formación del estado triplete y posibles reacciones secundarias.

Sin embargo, el problema que pueden presentar algunos filtros UV es su transformación en metabolitos fotoactivos capaces de reaccionar con distintos

componentes de la piel dando lugar a procesos de fototoxicidad y/o fotoalergia. Los productos formados pueden presentar un efecto toxicológico totalmente distinto del filtro UV de partida, por lo que es de vital importancia un estudio detallado de su fotoquímica. El posible potencial fototóxico es estudiado en aquellos filtros que son capaces de absorber en las regiones que se encuentran dentro del espectro solar que llega a la superficie terrestre, es decir, a longitudes de onda mayores de 290 nm. Los metabolitos que pueden formarse son de dos tipos: de Fase I, donde los compuestos sufren reacciones de oxidorreducción e hidrólisis, introduciendo así grupos nucleófilos, y los metabolitos de Fase II donde grupos nucleófilos se conjugan con una molécula endógena, dando lugar a conjugados farmacológicos hidrófilos fácilmente excretables. [20]



**Figura 10.** Metabolitos de Fase II de la OB estudiados en este trabajo. [21]

La **Figura 10** muestra dos conjugados de Fase II de la OB que se forman mediante una reacción de glicosilación en la que se incorpora un derivado de glucosa a la OB. Ambos metabolitos, M1 y M2, absorben en la región del UVB y por lo tanto son potencialmente fototóxicos.

La OB es un componente típico de las cremas solares y sí se trata realmente de un fotoprotector *in vitro*, pero es metabolizada en conjugados glucosídicos, por ejemplo, en la anemona marina *Aiptasia* y el hongo coral *Discosoma*, siendo estos conjugados fototóxicos ya que son fuertemente oxidantes. [21] Estudios preliminares a este reciente trabajo de Vuckovic *et al.* (2022) solo analizaron la presencia de 2,4-dihidroxi-benzofenona y 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, ambos con un grupo hidroxilo libre en la posición *orto* al carbonilo, detectándose

estos 2 metabolitos en muy bajas concentraciones <sup>[22]</sup> suponiendo tan solo el 2% de la masa total metabólica obtenida. Sin embargo, este grupo fue capaz de aislar, además, oxibenzona-glucósido (M1) así como conjugados de la OB de mayor peso molecular. Pero, debido a la baja lipofilia de estos metabolitos, fue imposible determinar su fototoxicidad (coeficiente de partición  $-\log K_{ow}$  para OB y M1 de 3.6 y 1.1, respectivamente) y se utilizó la 2,4-dimetoxibenzofenona (2,4) con un  $\log K_{ow}$  de 3.3 y una fotosensibilización análoga a la de M1 para realizar los estudios de fototoxicidad. En este trabajo, se propone que la inexistencia del enlace H presente en la OB y que da lugar a su eficiente relajación no radiativa abre el camino a procesos fototóxicos, que finalmente resultan en el blanqueamiento del coral. <sup>[21]</sup>

Además de este efecto negativo sobre el medioambiente se ha demostrado que la OB es capaz de penetrar en la piel humana en mayor medida que el resto de los filtros solares. <sup>[23]</sup> La alta capacidad de penetración de este componente ha disparado el estudio de sus efectos sobre el ser humano <sup>[24]-[26]</sup> y se ha demostrado su relación directa en la alteración endocrina. Según un ensayo de unión a receptores, la OB ha mostrado una fuerte actividad antiandrogénica (es capaz de inhibir los efectos biológicos de las hormonas sexuales masculinas) y una débil actividad estrogénica, pero al mismo tiempo también muestra actividad antiestrogénica (bloqueador de estrógeno). <sup>[3]</sup>

En cuanto a su fototoxicidad, ensayos de tipo NRU <sup>[27]</sup> han demostrado que, como se ha de cumplir en un filtro solar, la OB tiene un valor de PIF que indica que no es fototóxico. Sin embargo, sí se ha observado toxicidad de sus distintos metabolitos en plasma de ratón. <sup>[28]</sup>

Por todo lo comentado anteriormente, en el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de dos metabolitos de Fase II de la OB con el fin de estudiar sus propiedades fotofísicas y potencial fototoxicidad.

## 2. OBJETIVOS

Dada la preocupación por la preservación del medio ambiente, así como la protección de la salud humana ante el uso creciente de los filtros UV, para este Trabajo Fin de Máster se han planteado los siguientes objetivos:

- Síntesis de los metabolitos M1 y M2, y caracterización por RMN y HRMS.
- Estudio de las propiedades fotofísicas de los metabolitos: fluorescencia/fosforescencia y fotólisis de destello láser.
- Análisis de posibles reacciones de fotosensibilización: Tipo I, Tipo II y Tipo III.
- Estudio, con el uso del simulador solar, de la posible degradación de los metabolitos M1 y M2 y de la OB y 2,4-dimetoxibenzofenona.
- Evaluación de posible fototoxicidad en células mediante test NRU (por sus siglas en inglés, Neutral Red Uptake) de los metabolitos (M1 y M2) y de la OB y 2,4.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos y materiales

Oxibenzona (>98% pureza), Acetobromo- $\alpha$ -D-glucosa (D<sub>1</sub>-Br), Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid (D<sub>2</sub>-Br), 2,4-dimetoxibenzofenona, óxido de plata (Ag<sub>2</sub>O), hidróxido potásico (KOH), hidróxido de litio (LiOH), tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés Phosphate-Buffered Saline), tetrahidrofurano (THF) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y utilizados sin purificación adicional. Acetato de etilo, n-hexano, diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), metanol (MeOH) utilizados para la purificación por cromatografía en columna, acetonitrilo (AcN), y etanol (EtOH), como disolventes y/o para el estudio de propiedades fotofísicas, fueron obtenidos en Scharlab (Barcelona, España).

### 3.2 Instrumentación

#### 3.2.1 Cromatografía en capa fina y en columna

La purificación se ha llevado cabo por cromatografía en columna abierta y se ha empleado como fase estacionaria SiO<sub>2</sub> ó C18 sílica gel y como fase móvil una mezcla hexano:acetato o MeOH:agua, según el compuesto a purificar. Las reacciones se han seguido por cromatografía en capa fina mediante el uso de placas de Sílica gel 60 matrix F254, con soporte de aluminio o fase reversa C18, grosor de 0.2 mm y como revelador una lámpara ultravioleta (254 nm) donde el compuesto deseado absorbe.

#### 3.2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se han medido utilizando un equipo Bruker Ascend 400. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Se utiliza como patrón interno TMS (tetrametilsilano, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>). Se ha utilizado CD<sub>3</sub>OD como disolvente con su señal residual de referencia tomada en los desplazamientos químicos a 3.31 ppm y a 50.1 ppm para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente. Todas las constantes (*J*) se expresan en Hz.

### **3.2.3 Espectrofotometría UV-visible (UV)**

Los espectros de absorción UV-Visible se han realizado en espectrofotómetros de haz simple Varian Cary 60 y Cary 50, empleando para ello cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### **3.2.4 Fluorímetro**

Los espectros de fosforescencia se han hecho con un espectrómetro Edinburgh FLS1000 equipado con una lámpara de Xénon pulsada (60W), doble monocromadores de rejillas Czerny-Turner en excitación y detección, y un detector refrigerado PMT 980 cubriendo desde 200 hasta 980 nm.

Las soluciones se han preparado en EtOH y PBS, ajustando la absorbancia a 0.4 a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc} = 286$  nm). Las medidas a 77K se han realizado con cubetas de paso óptico de 1 cm utilizando un criostato Optistat DN (Oxford Instruments).

### **3.2.5 Fotólisis de destello láser**

Las medidas de fotólisis de destello láser se han llevado a cabo en un sistema LP980 (Edinburgh Instruments) constituido de un oscilador paramétrico óptico (OPO, EKSP LA NT342) bombardeado con el tercer armónico de un láser Nd:YAG (EKSP LA PS5062). Los experimentos se han realizado a una longitud de onda de excitación de 290 ó 320 nm con un pulso de 5 ns y una energía de 6-9 mJ. Para la adquisición de perfiles temporales, se ha utilizado una lámpara pulsada de Xenón (150W) como lámpara de análisis, un monocromador (TMS302-A, red de 150 líneas/mm) y un PMT (Hamamatsu Photonics). Las disoluciones se han ajustado a una absorbancia de ~0.4 a la longitud de onda de excitación de 290/320 nm. Las medidas se han realizado en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico tras burbujear N<sub>2</sub> durante 15 min, en atmosfera de aire o de O<sub>2</sub> (15 min de burbujeo).

Se ha usado timidina (Thd) y 2'-desoxiguanosina (dGuo) como desactivadores de los estados triplete de la 2,4 y los metabolitos M1 y M2. El experimento se ha

llevado a cabo añadiendo cantidades crecientes de nucleósido (de 0 a 6.82 mM) a partir de una disolución madre de concentración 0.075 M a una solución de 2,4 y los metabolitos M1 y M2 y se registró la cinética de desactivación a 650 (para M1 y M2) y 680 nm (para 2,4).

### **3.2.6 Medidas de oxígeno singlete**

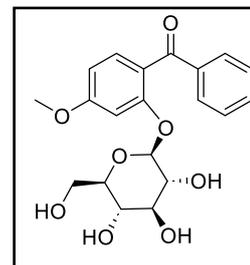
La cinética de desactivación del oxígeno singlete generado se ha registrado a 1270 nm con un detector de emisión NIR (Near InfraRed, por sus siglas en inglés) de Hamamatsu (Peltier enfriado a -62.8°C con un voltaje de 800 V, acoplado a un monocromador de rejilla) tras la excitación de los metabolitos y de la 2,4 con un láser Nd:YAG excitando a 266 nm. La energía del pulso ha sido de 8 mJ pulso<sup>-1</sup>. Como patrón de referencia se ha usado la perinaftenona preparada a 266 nm a la misma absorbancia que los compuestos a estudiar, cuyo rendimiento cuántico de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de 0.98. [29]

### **3.2.7 Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer (UPLC-MS)**

La caracterización de la masa exacta de los compuestos, se ha realizado utilizando un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp) acoplado con un detector QToF. Cuenta con un automuestreador acondicionado a 4°C. La separación se ha llevado a cabo en una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 4.6 mm d.i., 3.5 µm, Agilent). Se llevado a cabo un gradiente de elución utilizando AcN y agua (50:50 hasta 5:95, en 20 min) (ambos conteniendo un 0.1% de ácido fórmico) como fase móvil. El volumen de inyección ha sido de 10 µL. El espectrómetro ACQUITY™ XevoQToF (Waters Corp.) se conectó al sistema UPLC a través de una interfaz de ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva con el voltaje capilar a 1.6 kV. Las temperaturas de la fuente y desolvatación se han fijado en 120°C y 400°C, respectivamente.

Los flujos de cono y gas de desolvatación han sido de 10 Lh<sup>-1</sup> y 800 Lh<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos los datos recopilados en el modo Centroide se han adquirido utilizando Software Masslynx™ (Waters Corp.). Se ha usado leucina-

encefalina como bloqueo de masa generando un ion  $[M+H]^+$  ( $m/z$  556.2771) a una concentración de 250 pg/mL y un flujo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  para garantizar la precisión durante el análisis de MS.



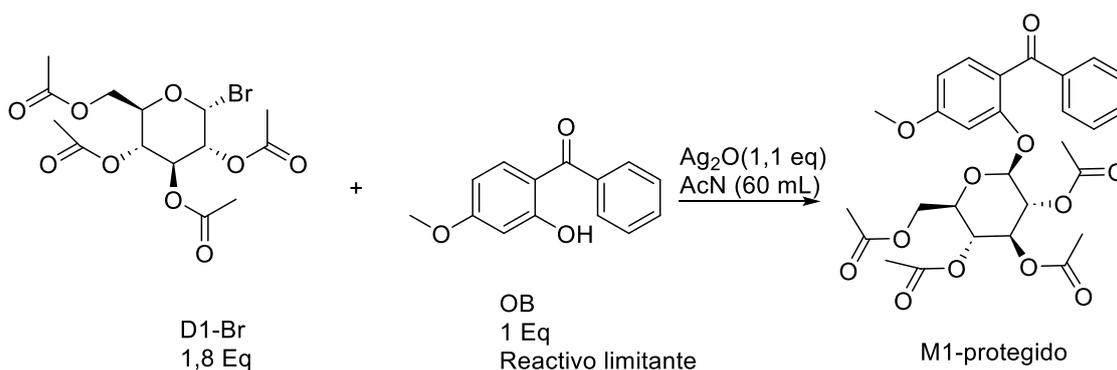
### 3.3 Parte experimental

#### 3.3.1 Síntesis “one-pot” del metabolito M1

La síntesis del metabolito M1 se ha llevado cabo en dos etapas. Primero se han hecho reaccionar los productos de partida mediante la reacción de “Königs-Knorr” de glicosilación. Después se ha llevado a cabo la reacción de desprotección con el fin de obtener el metabolito con los respectivos grupos hidroxilo.

La síntesis de M1 protegido se ha comenzado purgando un matraz aforado de dos bocas, una de entrada de  $\text{N}_2$  y otra salida de aire. Se ha añadido al balón la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (OB, 1 g, 4.4 mmol, reactivo limitante, RL) junto al derivado de Br ( $\text{D}_1\text{-Br}$ , 2.2 g, 7.92 mmol, 1.8 equivalentes) con ayuda de un embudo de sólidos. Simultáneamente, se ha purgado con  $\text{N}_2$  un matraz con AcN anhidro y se ha añadido con la ayuda de una aguja un volumen de 50 mL de dicho disolvente sobre el matraz de dos bocas y a continuación  $\text{Ag}_2\text{O}$  (1 g, 4.7 mmol, 1.1 equivalentes). Tras 10 minutos bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , se pincha un globo con dicho gas para mantener la atmósfera inerte y se ha calentado a  $35^\circ\text{C}$  (ver **Figura 11**).

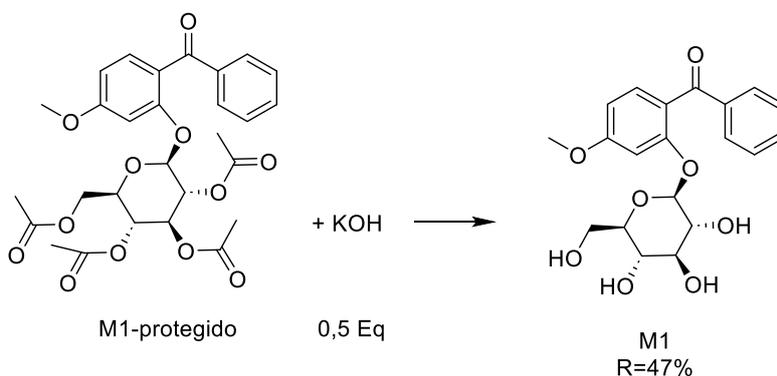
El transcurso de la reacción se ha seguido a distintos tiempos por cromatografía en capa fina utilizando una mezcla de eluyente de hexano/acetato de etilo 3.5:1.5. Trascorridas 5 h, se ha filtrado el producto y se ha procedido a su desprotección (reacción “one-pot”).



**Figura 11.** Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M1-protegido. Reacción de OB con D<sub>1</sub>-Br en AcN anhidro con por Ag<sub>2</sub>O a 35°C, t = 5 h, N<sub>2</sub>.

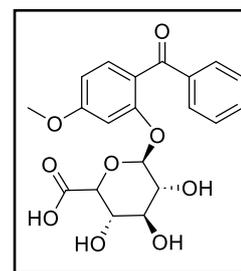
A continuación, M1-protegido se ha desprotegido como sigue:

Se ha añadido en un balón de 100 mL nuestro intermedio de reacción purificado junto con 0.130 g (2.2 mmol, 0.5 equivalentes) de hidróxido potásico (KOH) en 44 mL de MeOH. El transcurso de la reacción se ha seguido a varios tiempos mediante cromatografía en capa fina (diclorometano/ MeOH 5:0.1). Tras una agitación vigorosa durante 30 minutos se ha parado la reacción mediante la adición en pequeñas cantidades de acetato de etilo que ha hecho precipitar el exceso de KOH (ver **Figura 12**). Se ha concentrado en el rotavapor a una temperatura de 40°C para eliminar el exceso de disolvente y finalmente, el producto M1 (0.8 g, 2.05 mmol) con aspecto cristalino y de color blanco se ha analizado por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y por HRMS. El rendimiento total de la reacción fue del 47%.



**Figura 12.** Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M1. Reacción de intermedio de reacción (M1-protegido) con KOH en MeOH, a temperatura ambiente, t=30 min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 7.76 (m, 2H), 7.62 – 7.58 (m, 1H), 7.47 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.72 (dd,  $J = 8$  y 2.3 Hz, 1H), 4.92 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 4.59 (s, 1H), 3.90 (dd,  $J = 12$  y 2.2 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (dd,  $J = 12$  y 6.2 Hz, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.46 – 3.39 (m, 2H), 3.17 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 196.5, 163.9, 157.9, 138.5, 132.6, 132.0, 129.7, 127.9, 121.5, 107.6, 102.4, 101.7, 77.1, 76.4, 73.5, 69.9, 61.3, 54.8. HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_8$ , 391.1393, encontrada 391.1412.

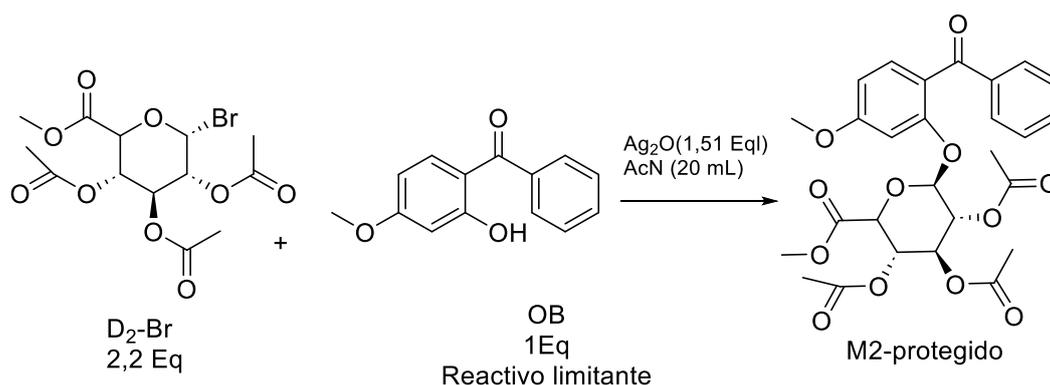


### 2.3.2 Síntesis en dos etapas del metabolito M2

Análogamente se llevó a cabo la reacción para obtener M2.

En un matraz de dos bocas purgado bajo  $\text{N}_2$ , se han añadido 0.317 g (1.14 mmol, R.L) de OB junto con 1 g (2.5 mmol, 2.2 equivalentes) de  $\text{D}_2\text{-Br}$  y en este caso se ha añadido un volumen de 20 mL de AcN anhidro. Finalmente, se ha añadido al balón de reacción 0.35 g (3.2 mmol, 1.5 equivalentes) de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . El curso de la reacción se ha seguido por cromatografía en capa fina (hexano/acetato de etilo 3.5:1.5) y la reacción se ha parado a las 5 h. El producto se ha purificado mediante columna cromatográfica (hexano/acetato de etilo 3.5:1.5) se ha analizado por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y por HRMS. La masa obtenida del metabolito protegido ( $\text{M}_2$ -protegido) ha sido de 0.5 g (0.94 mmol). El rendimiento de esta etapa ha sido 67%.

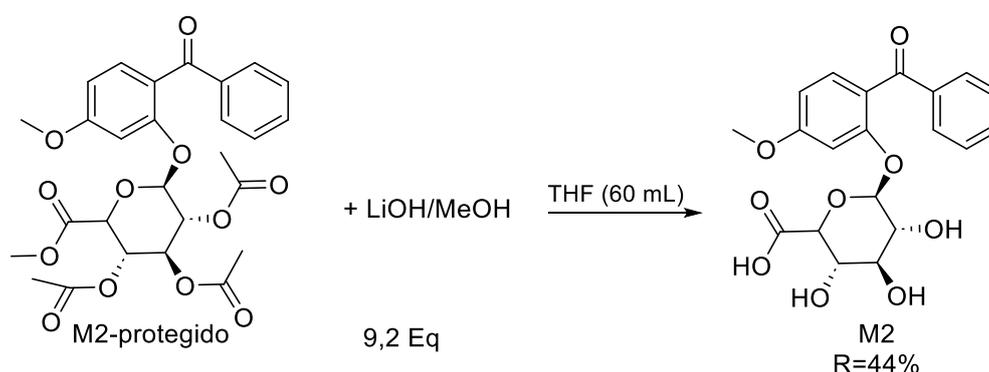
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 7.72 (m, 2H), 7.60 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 12$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.2$  y 2.3 Hz, 1H), 5.38 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 5.30 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 5.11 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 4.78 - 4.74 (m, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.47 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.86 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 195.7, 170.0, 169.7, 169.3, 167.5, 163.1, 155.8, 138.0, 132.9, 130.8, 129.5, 128.1, 122.6, 108.0, 103.0, 98.4, 71.9, 71.6, 70.7, 70.0, 54.8, 51.0, 48.3, 19.1, 19.1, 19.0. HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_{12}$ , 531.4846, encontrada 531.4860.



**Figura 13.** Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M2-prottegido. Reacción de OB con D<sub>2</sub>-Br en AcN, catalizada por Ag<sub>2</sub>O a 35°C, t = 5 h.

La segunda etapa de la síntesis de M2 ha consistido en la disolución del metabolito prottegido (M2-prottegido) en 60 mL de THF a una temperatura de 0°C. Una vez disuelto se ha añadido poco a poco una disolución de LiOH (0.2 g, 9.2 mmol) en 30 mL de MeOH. La disolución tenía un color amarillento y esta tonalidad fue acentuándose a brillante a medida que transcurrió la reacción.

La reacción se ha seguido por cromatografía de la fase reversa en capa fina con eluyente 2:1 MeOH/H<sub>2</sub>O. El tiempo de reacción ha sido de 3 h, seguidamente se ha concentrado en el rotavapor y se ha purificado en columna cromatográfica con la misma proporción de eluyente. Su caracterización se ha llevado a cabo por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y por HRMS. Se han obtenido 0.240 g (0.6 mmol) de M2 con color amarillo brillante, el rendimiento total de la reacción ha sido 44%.



**Figura 14.** Esquema de reacción para la síntesis del metabolito M2. Reacción de M2-prottegido con LiOH en THF, a temperatura de 0°C, t = 3 h.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 7.77-7.75 (m, 2H), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.47 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.90 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.74 (dd,  $J = 8.6$  y 2.3 Hz, 1H), 5.02 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.94 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.54 – 3.43 (m, 2H), 3.18 (t,  $J = 8.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 196.4, 163.8, 157.5, 138.6, 132.1, 129.8, 127.9, 121.7, 107.5, 102.6, 101.4, 75.7, 75.2, 73.1, 71.31, 54.81. HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$ :  $[\text{M} - \text{H}]^-$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_9$ , 403.1029, encontrada 403.1022.

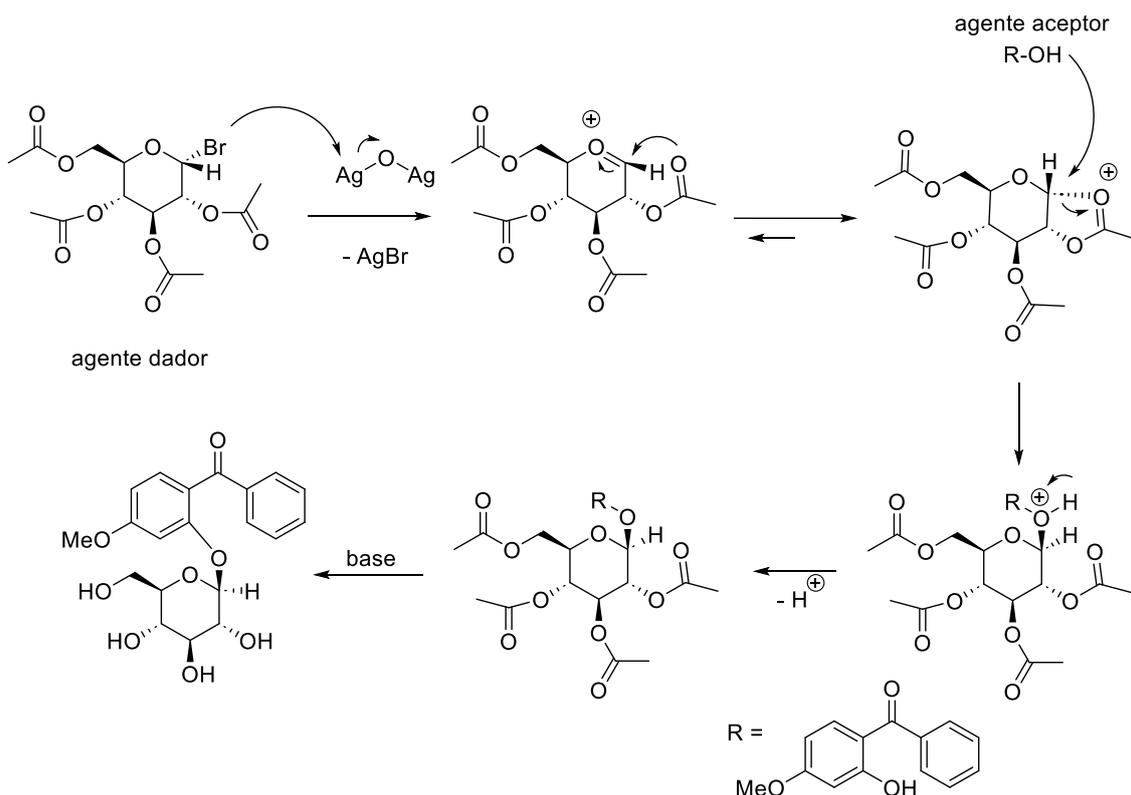
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La radiación solar y sus efectos adversos sobre el ser humano es un tema preocupante tanto para la comunidad científica como para el resto de la población, por ello es necesario un estudio detallado de la fotoquímica y posible formación de fotoproductos de aquellos filtros que son fotoestables y están presentes en los protectores solares que combaten este tipo de radiación. En el presente trabajo se han sintetizado dos metabolitos de Fase II de uno de los filtros más utilizados en la actualidad, la oxibenzona (OB) y se han estudiado sus propiedades fotofísicas y fototóxicas.

### 4.1 Síntesis de los metabolitos M1 y M2

La síntesis de ambos metabolitos de Fase II de la OB (ver **Figura 10**) se ha llevado a cabo según la reacción selectiva de “Königs-Knorr” que consiste en una sustitución nucleofílica en presencia de óxido de plata, u originalmente carbonato de plata, entre un alcohol y un 1-halomonosacárido poliacetilado para obtener el 1-alcoximonosacárido correspondiente (ver **Figura 15**). El  $\text{Ag}_2\text{O}$  es el compuesto que se utiliza para que tenga lugar la salida del Br del derivado de la glucosa, en forma de AgBr. <sup>[30]</sup> La temperatura de ambas reacciones se ha mantenido a 35°C con agitación vigorosa durante 5 h y los rendimientos de reacción están en torno al 50%. El papel del óxido de plata en la reacción de glicosilación ha sido ampliamente estudiado y utilizado desde la primera vez que se llevó a cabo. <sup>[31]-[34]</sup>

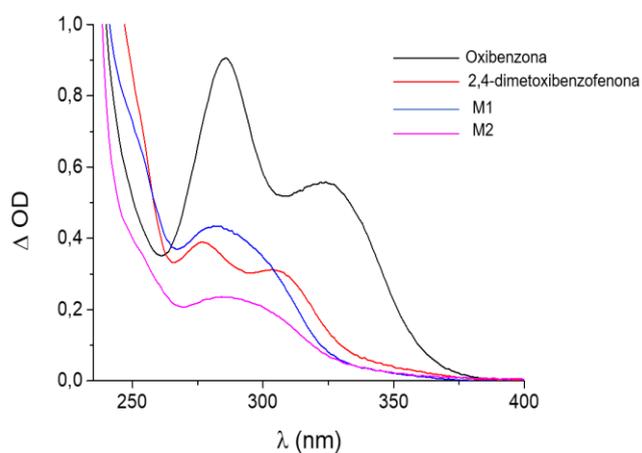
Una vez sintetizado y purificado el metabolito protegido se ha procedido a su desprotección en medio básico, con KOH en el caso de M1. El metabolito M2 protegido posee un grupo ácido por lo ha sido necesario el uso de una base más fuerte (LiOH) y mayor tiempo de reacción, 3h frente a los 30 minutos necesarios en la desprotección de M1.



**Figura 15.** Mecanismo de reacción “Königs-Knorr” y etapa de desprotección para la formación del metabolito M1.

## 4.2 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Como ya se ha comentado en este trabajo, los filtros solares se caracterizan por ser capaces de absorber la radiación UVB/UVA (280-400 nm) evitando su penetración en la piel. En este caso se ha estudiado la absorción tanto de la OB, de su derivado comercial 2,4-dimetoxibenzofenona (2,4) y de los dos metabolitos sintetizados M1 y M2.

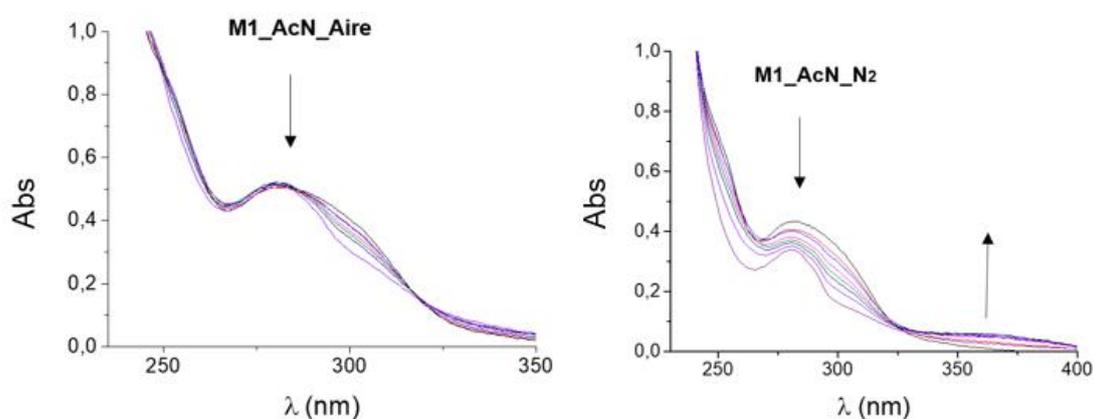


**Figura 16.** Espectro de absorción UV-Vis de la OB, 2,4, M1 y M2 en AcN, a la misma concentración.

Como se puede observar en la **Figura 16** el máximo de absorción de los metabolitos aparece a 286 nm, el derivado 2,4 presenta dos máximos de absorción a 266 nm y 310 nm. El espectro muestra un desplazamiento hipsocrómico de la absorción del derivado comercial y de los metabolitos con respecto a la OB. La banda menos energética (a longitudes de onda más altas) de la OB se ha asignado a la presencia del grupo hidroxilo que da lugar a una interacción por puente de H con el grupo carbonilo, y presenta un máximo de absorción a 324 nm. En el caso de M1 y M2 al no existir este grupo OH libre solo tienen un máximo a 286 nm, similar a la banda  $\pi\pi^*$  de la OB.

### 4.3 Fotólisis en estado estacionario-simulador solar

Al no presentar la interacción por puente de H, responsable de la eficiente desactivación de los estados excitados de la OB, se ha planteado la posibilidad de la descomposición tanto de los metabolitos como de la 2,4 bajo irradiación con un simulador solar. Así, se han llevado a cabo irradiaciones en distintas atmósferas (aire y  $N_2$ ) y disolventes (PBS y AcN). Las reacciones se han seguido por espectrometría UV-Vis y los experimentos han revelado que, de los dos metabolitos, solo M1 se descompone. Esta degradación se observó en ambas atmósferas, siendo más acusada en  $N_2$  y solamente en AcN (ver **Figura 17**).



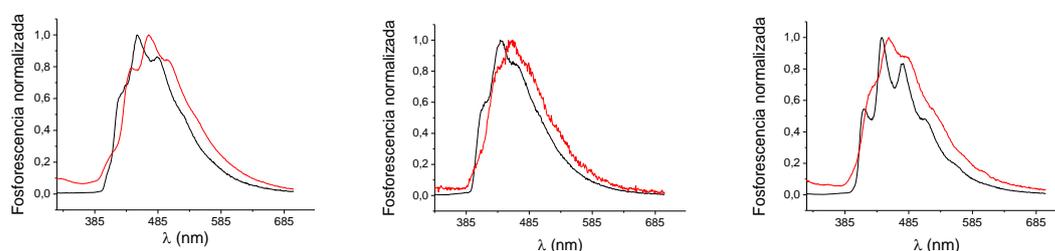
**Figura 17.** Espectros de absorción UV-Vis del M1 en AcN y aire/ $N_2$  a varios tiempos de irradiación.

La caracterización de los fotoproductos no se ha llevado a cabo durante este trabajo de fin de Máster, al no ser parte de los objetivos inicialmente planteados. Sin embargo, este estudio revela la alta fotolabilidad de M1. Por ello, se ha tenido un cuidado especial en preparar disoluciones frescas y mantenerlas en la oscuridad previamente a los estudios espectroscópico o de viabilidad celular.

#### 4.4 Fosforescencia

El proceso de fosforescencia es un proceso radiativo que ocurre desde el estado triplete menos energético, el  $T_1$ , hacia el estado fundamental,  $S_0$ . Por lo tanto, a diferencia de la fluorescencia, implica una inversión de spin, correspondiendo a un proceso “prohibido”. Como resultado, la fosforescencia es un proceso mucho más lento, del orden de los  $\mu s$  hasta  $s$ , que la fluorescencia.

Se ha estudiado la emisión tanto de la 2,4 como de ambos metabolitos. La fluorescencia se ha medido a temperatura ambiente, pero en ninguno de los casos se ha obtenido señal. En el caso de la fosforescencia se ha medido en matriz sólida a 77K y en dos disolventes distintos: PBS y EtOH.



**Figura 18.** Espectro de emisión excitando a  $\lambda_{exc} = 286$  nm de 2,4, M1 y M2, respectivamente, en PBS (rojo) y EtOH (negro), a 77K.

Los máximos de emisión de son  $\lambda_{phos}$  430, 440 y 485 nm para la 2,4 en EtOH. Los  $\lambda_{phos}$  de M1 se han registrado a 410, 435 y 465 nm, y en el caso de M2 a  $\lambda_{phos}$  410, 435, 485 y 510 nm (ver **Figura 18**). Como se puede observar, el espectro de emisión en PBS se encuentra desplazado a mayores longitudes de onda, es decir, existe un efecto batocrómico (desplazamiento hacia el rojo). Este desplazamiento en la fosforescencia puede deberse a la mayor polaridad del PBS frente al EtOH lo que genera una estabilización del orbital “n” presente en

los distintos compuestos disminuyendo la energía y apareciendo, por tanto, a mayores longitudes de onda. La energía de triplete ( $E_T$ ) se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$E_T = (N \cdot h \cdot c) / \lambda_{0,0}$$

Donde  $N$  es el número de Avogadro ( $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ),  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ),  $c$  es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ ), y  $\lambda_{0,0}$  es la longitud de onda, expresada en m, obtenida a partir de la primera banda de fosforescencia.

La siguiente tabla muestra un resumen de las  $E_T$  en cada disolvente junto a sus respectivas  $\lambda_{0,0}$ .

	$\lambda_{0,0}(\text{nm})$	$E_T(\text{kJ mol}^{-1})$
<b>2,4(EtOH)</b>	430	292
<b>2,4(PBS)</b>	440	272
<b>M1(EtOH)</b>	410	292
<b>M1(PBS)</b>	435	275
<b>M2(EtOH)</b>	410	292
<b>M2(PBS)</b>	430	278

**Tabla 1.**  $\lambda_{0,0}$  y  $E_T$  de 2,4, M1 y M2 en PBS y EtOH.

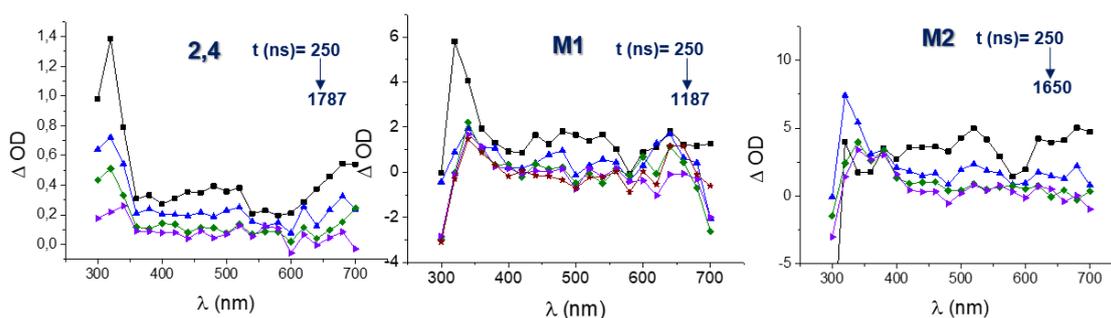
#### 4.5 Fotólisis de destello láser

La técnica de fotólisis de destello láser (LFP, por sus siglas en inglés Laser Flash Photolysis) permite generar especies transitorias mediante un pulso láser de corta duración (ns) y se registran tanto las cinéticas de desactivación como el espectro de absorción resuelto en el tiempo de estas especies utilizando una lámpara pulsada de Xe. La escala temporal se extiende de 100 ns hasta centenares de microsegundos. Entre los láseres más comunes se encuentran los de tipo Nd:YAG que tienen una emisión a 1064 nm y permiten alcanzar excitaciones a 532, 355 y 266 nm. En el laboratorio, se acopla a un OPO (Optical Parametric Oscillator, por sus siglas en inglés) que permite modular la longitud de onda de excitación.

#### 4.5.1 Determinación de las especies transitorias generadas para M1, M2 y 2,4

Se han preparado disoluciones en AcN y atmósfera de N<sub>2</sub> de los tres compuestos para obtener una absorbancia a 0.35 a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc} = 290$  nm).

Se han medido en primer lugar los espectros de absorción transitoria.



**Figura 19.** Espectros de absorción transitoria a  $\lambda_{exc}$  290 nm para 2,4, M1 y M2 en AcN bajo N<sub>2</sub>.

Los máximos de absorción transitoria de los metabolitos se encuentran a  $\lambda$  340, 440, 500 y 650 nm. En el caso del producto comercial 2,4 a  $\lambda$  320, 480 y 680 nm. Se han medido los  $\tau$  para cada uno de estos máximos, para determinar si pertenecen a una misma especie (cinéticas iguales) o a especies distintas (distintos  $\tau$ ). Los decaimientos se han ajustado con una función de tipo monoexponencial:  $I(t) = A \exp(-t/\tau)$ , donde  $I$  es la intensidad de la señal en función del tiempo,  $A$  la componente preexponencial, y  $\tau$  el tiempo de vida de la especie. El  $\tau$  fue el mismo para cada máximo de absorción tanto para la 2,4, M1 y M2 (ver **Tabla 2**), lo que indica la presencia de una única especie.

M1	$\lambda \text{ max (nm)}$	$\tau(\mu\text{s})$
	340	0.6
	440	0.5
	500	0.5
	650	0.5
M2	$\lambda \text{ max(nm)}$	$\tau(\mu\text{s})$
	340	0.6
	440	0.3
	500	0.3
	650	0.3
2,4	$\lambda \text{ max (nm)}$	$\tau(\mu\text{s})$
	320	1.1
	480	1.0
	680	1.0

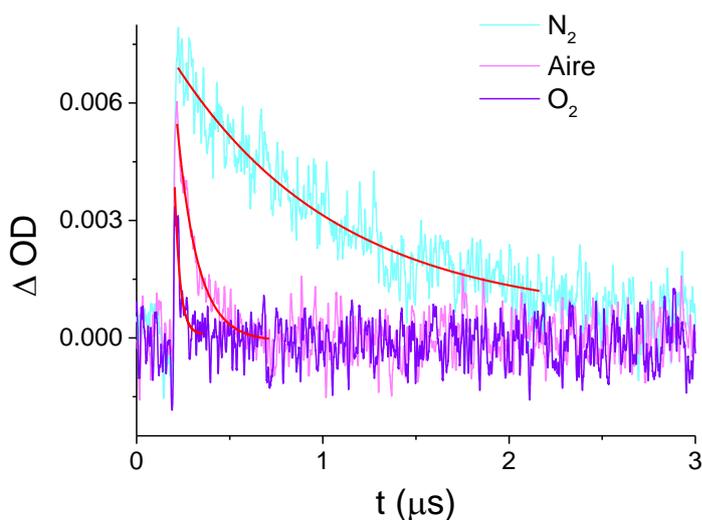
**Tabla 2.** Tabla resumen de los tiempos de vida de 2,4, M1 y M2 para cada uno de los máximos de absorción transitoria en  $\text{N}_2$   $\lambda_{\text{exc}}$  290 nm.

Se han realizado experimentos complementarios en distintas atmósferas (aire/ $\text{O}_2$ ) para asignar la naturaleza de las bandas. Se ha observado un acortamiento del  $\tau$  de todos los máximos en presencia de  $\text{O}_2$  lo que indica que corresponden a tripletes (ver **Figura 20**). Los espectros de absorción transitoria correspondientes no han mostrado la formación de nuevas especies.

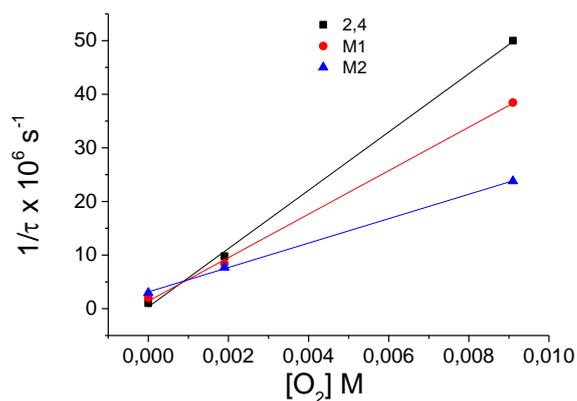
Los decaimientos obtenidos en las diferentes condiciones se han ajustado a una función exponencial. Se ha determinado la constante de desactivación por oxígeno, “ $k_{\text{O}_2}$ ”, mediante la representación de Stern Volmer (**Figura 21**):

$$1/(\tau) = 1/(\tau_0) + k_{\text{O}_2} \cdot [\text{Q}]$$

Siendo  $\tau$  el tiempo de vida del estado triplete a una concentración de Q, en este caso es concentración de  $\text{O}_2$  en  $\text{N}_2$  (0 M), aire (0,0019 M) y  $\text{O}_2$  (0,0091 M) en AcN <sup>[35]</sup> respectivamente,  $\tau_0$  el tiempo de vida en ausencia de Q,  $k_{\text{O}_2}$  la constante del proceso de desactivación y [Q] la concentración de desactivador.



**Figura 20.** Decaimiento a 680 nm de 2,4 a la misma concentración en AcN en N<sub>2</sub>, aire y O<sub>2</sub>.



**Figura 21.** Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de O<sub>2</sub> para 2,4, M1 y M2.

Así, el ajuste lineal de la representación de la inversa de  $\tau$  frente a  $[O_2]$  permite obtener  $k_{O_2}$  a partir de la pendiente obtenida.

	$k_{O_2} M^{-1} s^{-1}$
<b>2,4</b>	$5.4 \cdot 10^9$
<b>M1</b>	$4.1 \cdot 10^9$
<b>M2</b>	$2.3 \cdot 10^9$

**Tabla 3.** Tabla resumen de las  $k_{O_2}$  para la 2,4, M1 y M2.

Se han obtenido constantes de desactivación entre  $2\text{-}5\cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , cerca de la constante de difusión en AcN,  $k_{\text{dif}} = 2\cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , lo que significa que se trata de un proceso eficiente.

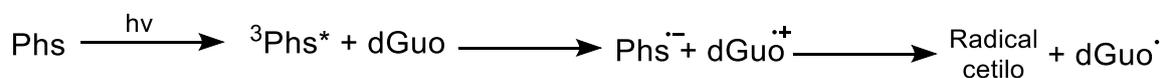
En base a esta desactivación y a datos bibliográficos, se han asignado las especies detectadas para M1, M2 y 2,4 a sus estados excitados triplete.

## 4.5.2 Reacciones de fotosensibilización

Las reacciones de fotosensibilización desde el estado triplete pueden dar lugar a gran variedad de fotoproductos. A continuación, se estudia la reactividad del triplete considerando los 3 tipos de reacción (I, II, III) descritas en la Introducción. Las bases del ADN son altamente sensibles a este tipo de procesos dando lugar a lo que se conoce como daños al ADN.

### 4.5.2.1 Reacciones de Tipo I

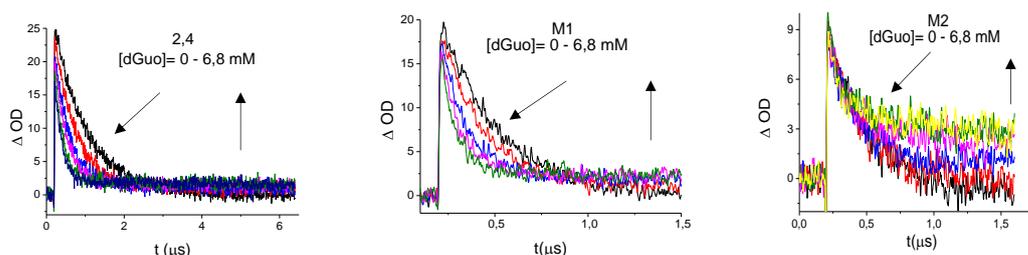
Este tipo de reacciones involucran la transferencia de electrones entre dador y aceptor para dar lugar a radicales (iónicos/neutros), y se han estudiado ampliamente en la degradación del ADN. Son reacciones de oxidación-reducción, donde normalmente el fotosensibilizador actúa como oxidante generando un radical catión de una base del ADN (ver **Figura 22**). Dado que la Guanina es la base que tiene el potencial de oxidación más bajo, es la que más fácilmente va a dar reacciones de Tipo I en presencia de un Phs excitado ( $^3\text{Phs}^*$ ).



**Figura 22.** Reacción de fotosensibilización Tipo I con la base dGuo (2'-desoxiguanosina).

El radical  $\text{dGuo}^{\cdot+}$  es muy inestable y puede ser hidratado con facilidad para generar el radical 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanil ( $\text{dGuo}^{\cdot}$ ). Éste puede convertirse en productos como la 8-oxodGuo y la 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina por competición de dos procesos, uno de oxidación y otro de reducción, respectivamente [36].

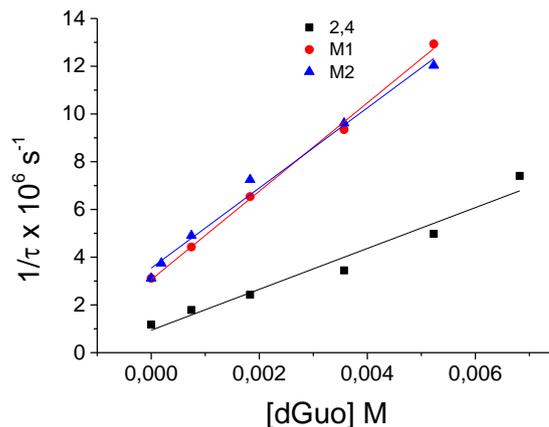
Para el siguiente experimento se ha usado la dGuo como desactivador y nuestros compuestos (2,4, M1 y M2) como fotooxidantes. En este caso, la  $\lambda_{exc}$  fue de 320 nm con el fin de evitar la absorción (y por tanto su excitación) de la dGuo. Se trata de una reacción redox, pero el oxidante no está en su estado fundamental sino en su estado excitado, y por lo tanto tiene otro potencial redox que toma en cuenta la energía de este estado y que utiliza la dGuo para reducirse, observándose así una disminución de su  $\tau$  (ver **Figura 23**).



**Figura 23.** Decaimiento en el máximo de absorción a  $\lambda_{exc}$  320 nm de 2,4 (680 nm), M1 y M2 (650 nm) a distintas concentraciones de dGuo.

Se han utilizado concentraciones crecientes de dGuo (0.2-6.8 mM) y se han registrado las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete de M1, M2, y 2,4 en uno de sus máximos de absorción. Se observa en las gráficas la disminución de los  $\tau$  a medida que aumenta la concentración de desactivador. Sin embargo, a concentraciones mayores de dGuo se observa que existe una absorción residual con un  $\tau$  "infinito" en nuestra escala de medida (paralelo al eje x). La explicación de dicho suceso puede ser la formación de una nueva especie debido a la alta reactividad del radical catiónico  $dGuo^{*\cdot+}$ , que desprotona para generar el radical neutro  $dGuo^{\cdot}$ , que tiene con un espectro de absorción transitoria con máximos a 315, 380 y una banda ancha centrada a 540 nm. [37] Tras la transferencia de protón de  $dGuo^{*\cdot+}$  a  $Phs^{\cdot-}$ , se forma el radical cetilo ( $Phs^{\cdot}$ ) por protonación cuyo espectro puede ocultar las bandas de  $dGuo^{\cdot}$ .

Finalmente, para conocer la eficiencia de la dGuo como desactivador se han representado las gráficas de Stern-Volmer y a través de ellas se han obtenido los valores de  $k_{dGuo}$ .



**Figura 24.** Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de dGuo para 2,4, M1 y M2.

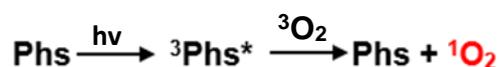
	$k_{dGuo} M^{-1} s^{-1}$
<b>2,4</b>	$8.6 \cdot 10^8$
<b>M1</b>	$1.9 \cdot 10^9$
<b>M2</b>	$1.7 \cdot 10^9$

**Tabla 4.** Tabla resumen de las  $k_{dGuo}$  para la 2,4, M1 y M2.

#### 4.5.2.2 Reacciones de Tipo II: medidas de $^1O_2$

El estado fundamental del  $O_2$  es el estado triplete, por lo que gran variedad de moléculas excitadas pueden ceder su energía al  $O_2$  desactivándose y disminuyendo por tanto su  $\tau$ . El  $O_2$  captará esta energía transformándose en  $^1O_2$  y que dará lugar a las reacciones de Tipo II, comentadas en la Introducción.

El  $O_2$  es una molécula paramagnética cuyo estado fundamental es el estado triplete,  $^3O_2$ . Es precisamente por este motivo que el oxígeno molecular es uno de los desactivadores más comunes ya que su  $E_T$  es 0 kJ. La energía transferida por el fotosensibilizador al  $^3O_2$  da lugar al  $^1O_2$  ( $94.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). [29] El estado singlete del  $O_2$  es altamente reactivo siendo capaz de oxidar a la dGuo.

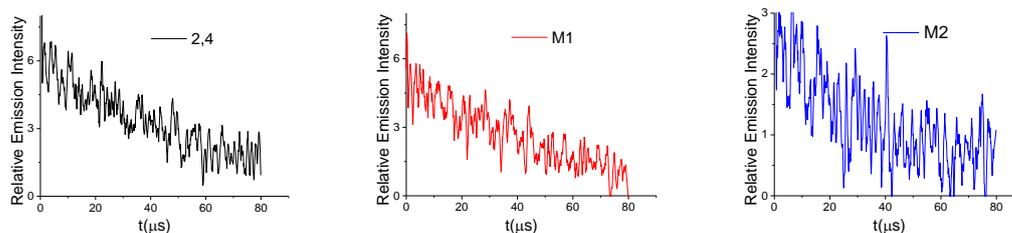


**Figura 25.** Esquema de formación de  $^1O_2$ .

Se ha determinado la generación de  $^1\text{O}_2$  mediante su emisión a 1270 nm. Para ello se han excitado las muestras (M1, M2 y 2,4) con el láser a 266 nm y se ha registrado la emisión con un detector para el infrarrojo cercano, NIR. Las muestras se han preparado en AcN y en condiciones aeróbicas con una misma absorbancia de 0.35 a 266 nm. Con el fin de evaluar el rendimiento cuántico de formación  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) de los compuestos de interés, se ha utilizado como patrón una solución isoabsortiva de perinaftenona (PN), cuyo valor de  $\Phi_\Delta$  según la literatura es de 0.98 [29].

Se midió el decaimiento de  $^1\text{O}_2$  con el fin de conocer la intensidad de emisión a tiempo cero después del pulso (I) y así poder conocer el  $\Phi_\Delta$  (ver **Figura 26**) de los compuestos de interés, aplicando la fórmula:

$$\Phi_\Delta (\text{compuesto}) = \Phi_\Delta (\text{PN}) \times I (\text{compuesto}) / I (\text{PN})$$



**Figura 26.** Decaimiento de 2,4, M1, M2 ( $\lambda_{\text{ex}}$  266 nm, aire).

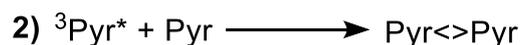
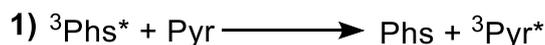
	I	$\Phi_\Delta$
<b>PN</b>	25	0.98
<b>2,4</b>	6.7	0.26
<b>M1</b>	5.7	0.22
<b>M2</b>	2.9	0.13

**Tabla 5.** Tabla resumen de los valores de intensidad y  $\Phi_\Delta$  para 2,4, M1 y M2.

Se ha detectado generación de  $^1\text{O}_2$  para los tres compuestos con valores  $\Phi_\Delta$  entre 0.26 y 0.13.

### 4.5.2.3 Reacciones de Tipo III/TETT

Este tipo de reacciones solo tienen lugar con bases pirimidínicas (Pyr). Durante este proceso la  $E_T$  del fotosensibilizador es cedida a la Pyr generando el triplete excitado de dicha base el cual sufrirá un proceso de dimerización al reaccionar con otra pirimidina en su estado fundamental.

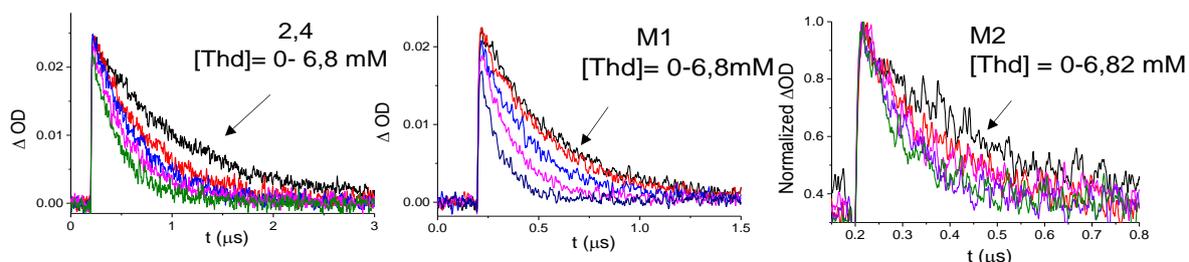


**Figura 27.** Proceso de fotosensibilización de la pirimidina (Pyr) para dar dímeros de tipo ciclobutánico.

La desactivación del estado triplete de nuestro compuesto a través del proceso de fotosensibilización está ampliamente influenciado por el tipo de pirimidina que se usa como desactivador. La energía de la Pyr en su estado excitado es un factor crítico en la TETT, por ello se seleccionó la Timidina (Thd) como la mejor candidata puesto que dentro de las Pyr su  $E_T$  es más baja ( $67 \text{ kJmol}^{-1}$ ) que la de la citidina.

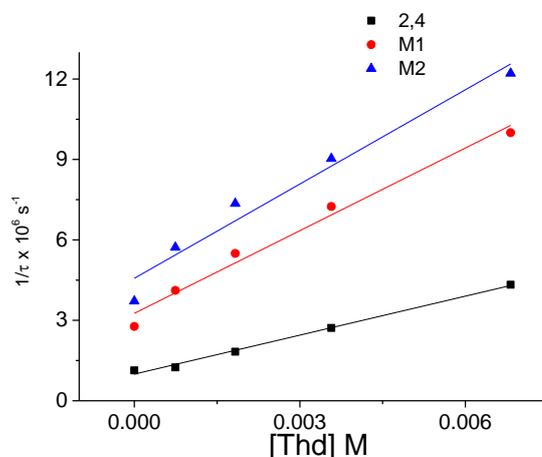
Se ha evaluado la desactivación del estado triplete de la 2,4, M1 y M2 en presencia de cantidades crecientes de Thd (0-6.8 mM). Para ello se ha utilizado la técnica de fotólisis de destello láser excitando la muestra a 320 nm (donde la Thd no absorbe) con el fin de obtener el estado excitado de nuestro fotosensibilizador sin excitar la Thd (ver **Figura 27**).

Como se observa en la **Figura 28**, se produce un notable acortamiento del  $\tau$  del triplete de 2,4, M1 y M2, lo que significa que esta base del ADN desactiva el triplete de los compuestos de interés.



**Figura 28.** Decaimiento registrado a  $\lambda_{\text{exc}}$  320 nm de 2,4, M1 y M2 (normalizado) a distintas concentraciones de Thd.

La constante de desactivación ( $k_{Thd}$ ) se ha determinado a través del valor de la pendiente correspondiente a las gráficas de Stern-Volmer.



**Figura 29.** Gráfica de Stern-Volmer a distintas concentraciones de Thd para 2,4, M1 y M2.

	$k_{Thd} M^{-1} s^{-1}$
<b>2,4</b>	$4.8 \cdot 10^8$
<b>M1</b>	$1.0 \cdot 10^9$
<b>M2</b>	$1.2 \cdot 10^9$

**Tabla 6.** Tabla resumen de las  $k_{Thd}$  para la 2,4 y M1.

#### 4.5.2.4 Conclusiones extraídas de las reacciones de fotosensibilización

A lo largo de los apartados anteriores se ha demostrado que los metabolitos M1 y M2 y la 2,4, usada como modelo, tienen todas las características de un buen Phs. Absorben en el UVB/UVA y generan un triplete que se decae en la escala de microsegundos. El triplete se desactiva en presencia de  $O_2$ , generando  $^1O_2$  con rendimientos  $\phi_{\Delta}$  entre 0.13-0.26 lo que demuestra que son capaces de actuar mediante procesos de Tipo II. Se ha observado la desactivación por dGuo con una constante  $k_{dGuo}$  alta, y la posible generación tanto del radical  $dGuo^{\bullet}$  y del radical cetilo correspondiente a una formación previa del radical anión de los derivados de BP, por lo tanto, también se desactivan a través de reacciones de Tipo I. Por último, se ha demostrado que se desactivan en presencia de Thd

mediante TETT tal y como se observa en la disminución de sus  $\tau$ , y pueden generar la formación de dímeros de timidina de tipo ciclobutano.

#### **4.6 Ensayo in vitro de fototoxicidad por captación de rojo neutro en células 3T3- Realizados en la Unidad Mixta de “Investigación en Mecanismos Moleculares (Químicos y Biológicos) de las Reacciones Adversas de Fármacos” del Instituto de Investigación Sanitaria de La Fe (IIS LaFe) con la ayuda de Meryem El Ouardi y de la Dra. Inmaculada Andreu.**

Los estudios antes descritos han demostrado que los 3 compuestos son capaces de fotosensibilizar reacciones de Tipo I y II. Ambas reacciones pueden dar lugar a reacciones de fototoxicidad. Así que se decidió estudiar esta posibilidad mediante ensayos celulares, en este caso ensayos *in vitro* de tipo NRU. Este ensayo se ha llevado a cabo siguiendo la Directriz 432 de la OCDE (OCDE 2004), y ha permitido evaluar la fototoxicidad de la OB, 2,4 y de los metabolitos M1 y M2.

Como control fototóxico positivo y control negativo no fototóxico, se ha usado Clorpromacina (CPZ) y dodecilsulfato sódico (SDS) respectivamente. Cada ensayo ha tenido una duración de tres días, primero se han sembrado dos placas (una para la irradiación UVA, otra como el control en oscuridad, DARK) de 96 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/pocillo para cada compuesto.

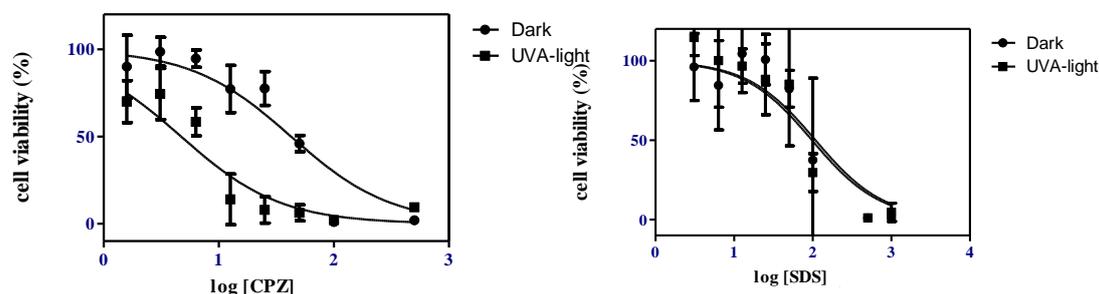
A las 24 h, las células de ratón 3T3 se han incubado con los compuestos de ensayo (2,4, OB, M1 y M2) a ocho concentraciones entre 1000  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  durante 1 h en condiciones de oscuridad. Después, una de las placas se ha irradiado (UVA) en hielo durante 18 min con una dosis no citotóxica de UVA equivalente a  $5 \text{ J/cm}^2$  mientras que la otra se ha mantenido en una caja oscura. Posteriormente, las soluciones de compuestos se han sustituido por medio DMEM fresco y las placas se han incubado durante toda la noche.

Transcurrido ese tiempo, se ha añadido rojo neutro (50  $\mu\text{g/mL}$ ) en todos los pocillos y se han incubado durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación, las células se han lavado una vez con PBS y se ha extraído el rojo neutro de los lisosomas en 100

$\mu\text{L}$  de tampón de extracción [agua destilada: etanol: ácido acético 50:49.5:0.5 (v/v)]. Por último, se ha medido la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Synergy H1.

Para cada compuesto se han establecido curvas dosis-respuesta para determinar la concentración que reduce en un 50% la captación de rojo neutro ( $\text{IC}_{50}$ ) en condiciones de oscuridad y luz UVA. Con estos datos, se han calculado los valores del factor de fotoirritación (PIF).

La gráfica del control positivo muestra una disminución de la viabilidad celular en presencia de luz, donde CPZ irradiado (+Irr):  $\text{IC}_{50} = 4.7 \mu\text{M}$  y CPZ no-irradiado (-Irr):  $\text{IC}_{50} = 42.5 \mu\text{M}$ , dando lugar a un valor de PIF que demuestra fototoxicidad (ver **Tabla 5**). En el caso del control negativo ambas curvas, en presencia y ausencia de luz, siguen la misma tendencia de viabilidad celular con valores SDS irradiado (+Irr):  $\text{IC}_{50} = 97.8 \mu\text{M}$  y SDS no-irradiado (-Irr):  $\text{IC}_{50} = 108.4 \mu\text{M}$ .



**Figura 30.** Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz del control CPZ (izquierda) y SDS (derecha).

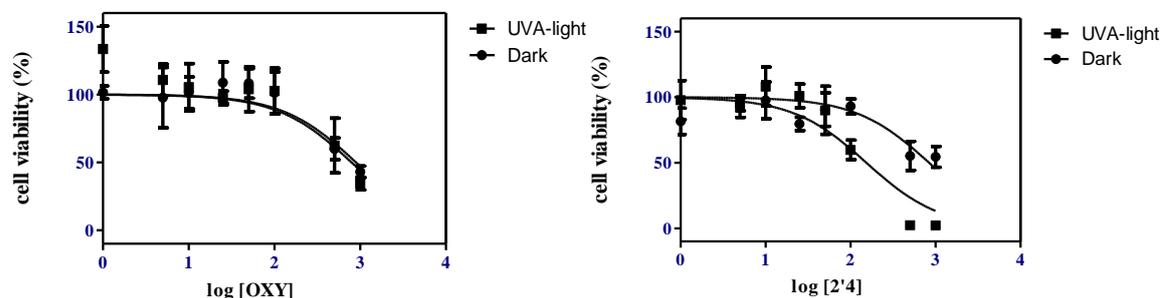
	CPZ	SDS
<b>PIF (<math>\text{IC}_{50-}/\text{IC}_{50+}</math>)</b>	<b>9.03</b>	<b>1.12</b>

**Tabla 7.** Valores de PIF para CPZ y SDS.

Para la OB y 2,4 se han hecho tres ensayos durante tres semanas consecutivas con el fin de obtener una estadística de los valores de PIF correspondientes.

La **Figura 31** muestra las gráficas de la viabilidad celular a diferentes concentraciones de compuesto en presencia y ausencia de luz. Las curvas nos dan información de los  $\text{IC}_{50}$ : OB irradiado (+Irr):  $\text{IC}_{50} = 444.8 \mu\text{M}$  y OB no-irradiado

(-Irr):  $IC_{50} = 502.6 \mu M$ ; 2,4 irradiado (+Irr):  $IC_{50} = 70.4 \mu M$  y 2,4 no-irradiado (-Irr):  $IC_{50} = 385.9 \mu M$ , necesarios para el cálculo de PIF.



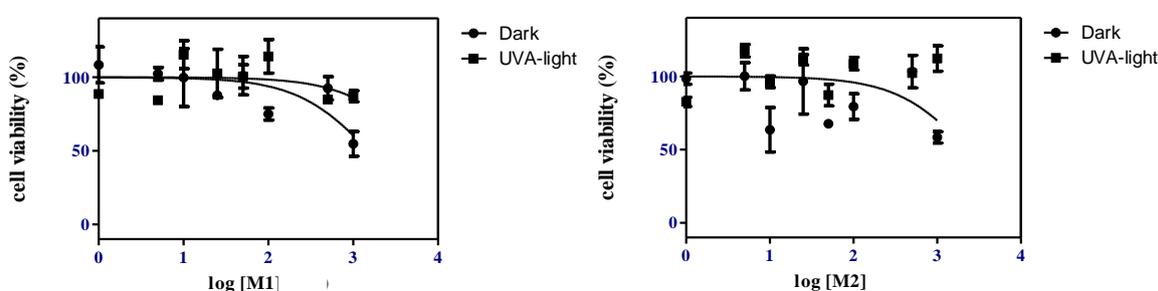
**Figura 31.** Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz de la OB y 2,4.

	OB	2,4
<b>PIF (<math>IC_{50-}/IC_{50+}</math>)</b>	<b>1.13</b>	<b>5.48</b>

**Tabla 8.** Valores de PIF para OB y 2,4.

El SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) ha evaluado el carácter fototóxico de la OB y tras varios ensayos NRU ha demostrado que dicho filtro solar no presenta fototoxicidad ( $PIF < 5$ ). El valor de 1.13 obtenido después de los tres ensayos concuerda con la literatura. Sin embargo, la 2,4 no solo ha demostrado ser fototóxica, sino también citotóxica, es decir que provoca muerte celular en ausencia de luz.

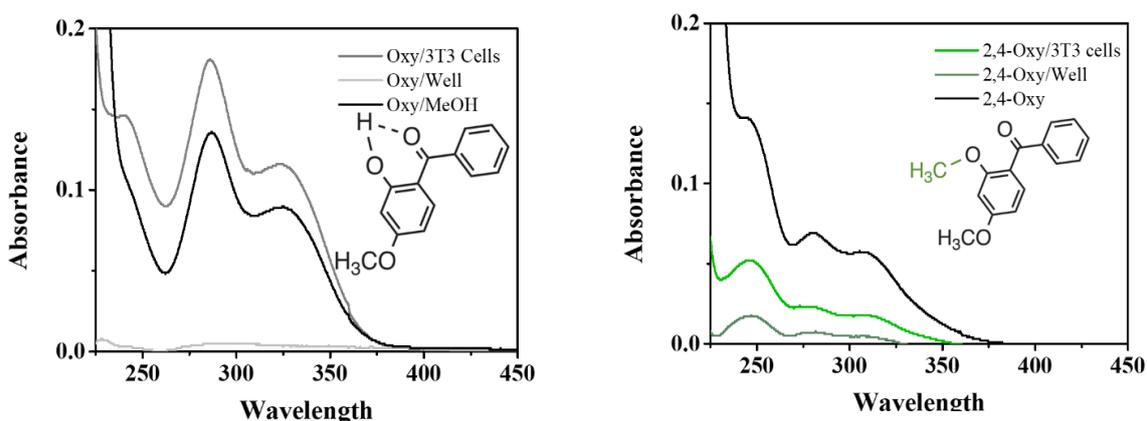
En cuanto a los metabolitos M1 y M2 se han repetido los ensayos dos veces consecutivas, en ambas ocasiones la viabilidad celular se ha mantenido entorno al 100% en ausencia y presencia de luz para ambos metabolitos (ver **Figura 32**).



**Figura 32.** Curvas dosis-respuesta para condiciones en presencia y ausencia de luz de M1 y M2.

Con los datos obtenidos no ha sido posible calcular los valores de los IC<sub>50</sub> y por tanto el cálculo del PIF. Estos resultados llevan al desarrollo de una hipótesis que sugiere que la mayor hidrofília tanto del glucósido como del glucurónido que la OB o la 2,4 evita su penetración en la célula y favorece su posible eliminación en la etapa de lavado anterior a la irradiación, resultando en un IC<sub>50</sub>(+Irr) similar al IC<sub>50</sub>(-Irr). Con el fin de conocer la fiabilidad del test, se ha llevado a cabo un protocolo de lisis celular para investigar si los metabolitos no internalizan en las células o si realmente no son fototóxicos.

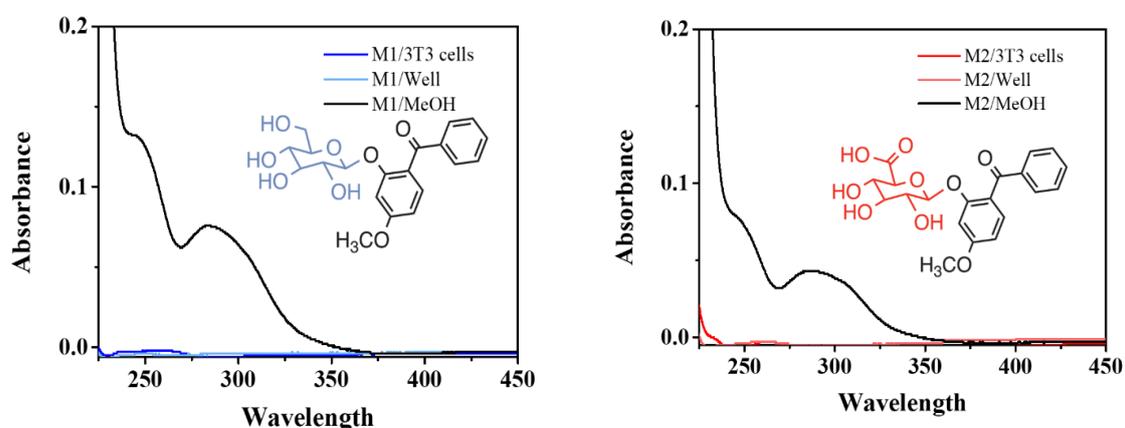
La lisis ha consistido en el cultivo de las células en placa de 6 pocillos y su incubación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se han tratado durante 1 h con el fármaco (OB y 2,4) y los metabolitos a la misma concentración seleccionándola en base a la IC<sub>50</sub> más baja (IC<sub>50</sub>(OB)= 500 µM) para evitar citotoxicidad. Después se han levantado las células, se ha centrifugado y se ha lavado el pellet. Se ha añadido MeOH, se han realizado tres ciclos de congelación y descongelación con N<sub>2</sub> líquido (método "Freeze-Thawing") y se ha filtrado cinco veces, utilizando un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro. Finalizada la lisis celular se han medido los espectros de absorción en fibroblastos (células 3T3) en placa (well) sin célula (para descartar que haya interacción con la placa) y en disolución de MeOH. El experimento sin células sirve de control para descartar una interacción con la placa, en este caso los compuestos de interés se quedarían retenidos en el pocillo y no en la célula.



**Figura 33.** Espectros de absorción de OB (Oxy) y 2,4. Los espectros de absorción de 2,4/MeOH y OB /MeOH no corresponden a la concentración inicial de estos compuestos, sino a concentración "aleatorias" para comparar el espectro con el obtenido tras la lisis celular.

Los espectros de absorción obtenidos para OB y 2,4 (ver **Figura 33**) muestran una absorción únicamente para los pocillos conteniendo fibroblastos (cell), y por tanto se demuestra que ambos compuestos internalizan y además que muy poca cantidad de compuesto queda retenida en la placa (well).

La **Figura 34** demuestra que los metabolitos no han internalizado en las células, ya que no se observa ninguna absorción tras la lisis celular. Estos resultados demuestran que el test NRU no es el apropiado para determinar su fototoxicidad, ya que, al no internalizar, el Phs se elimina en la etapa de lavado previa a la irradiación.



**Figura 34.** Espectros de absorción de M1 y M2. Los espectros de absorción de M1/MeOH y M2/MeOH no corresponden a la concentración inicial de estos compuestos, sino a concentración “aleatorias” para comparar el espectro con el obtenido tras la lisis celular.

## 5. CONCLUSIONES

Durante el presente Trabajo Fin de Máster titulado “El papel de los metabolitos en la fototoxicidad de los filtros solares”, se ha llevado a cabo la síntesis de dos metabolitos de Fase II de la oxibenzona, y se ha comparado su comportamiento fotoquímico y fotobiológico con el de la 2,4-dimetoxibenzofenona, usada como modelo. Se ha evidenciado la formación del estado triplete mediante estudios de emisión de fosforescencia a baja temperatura y de fotólisis de destello láser a temperatura ambiente. Dichos estados excitados de triplete se han desactivado en presencia de oxígeno. Los compuestos también han generado oxígeno singlete, pudiendo, por lo tanto, oxidar componentes biológicos mediante procesos de Tipo II. Además, estudios en presencia de dGuo y Thd, han establecido que los 3 compuestos de interés pueden interaccionar con bases del ADN mediante reacciones de Tipo I y III, y generar los daños correspondientes. El potencial fototóxico señalado por los estudios espectroscópicos se ha investigado mediante estudios *in vitro*, donde se ha evidenciado la actividad del 2,4. Sin embargo, estos ensayos no son adaptados para estudiar la potencial fotoactividad de M1 y M2 tras su formación *in situ*, puesto que la alta hidrofilia de los metabolitos de fase II no favorece su absorción por la célula. Actualmente se está estudiando la generación *in situ* de M1 y M2 en células de piel (queratinocitos) y así poder estudiar *a posteriori* una fotosensibilidad exagerada de las células con actividad metabólica incubadas en presencia de OB.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

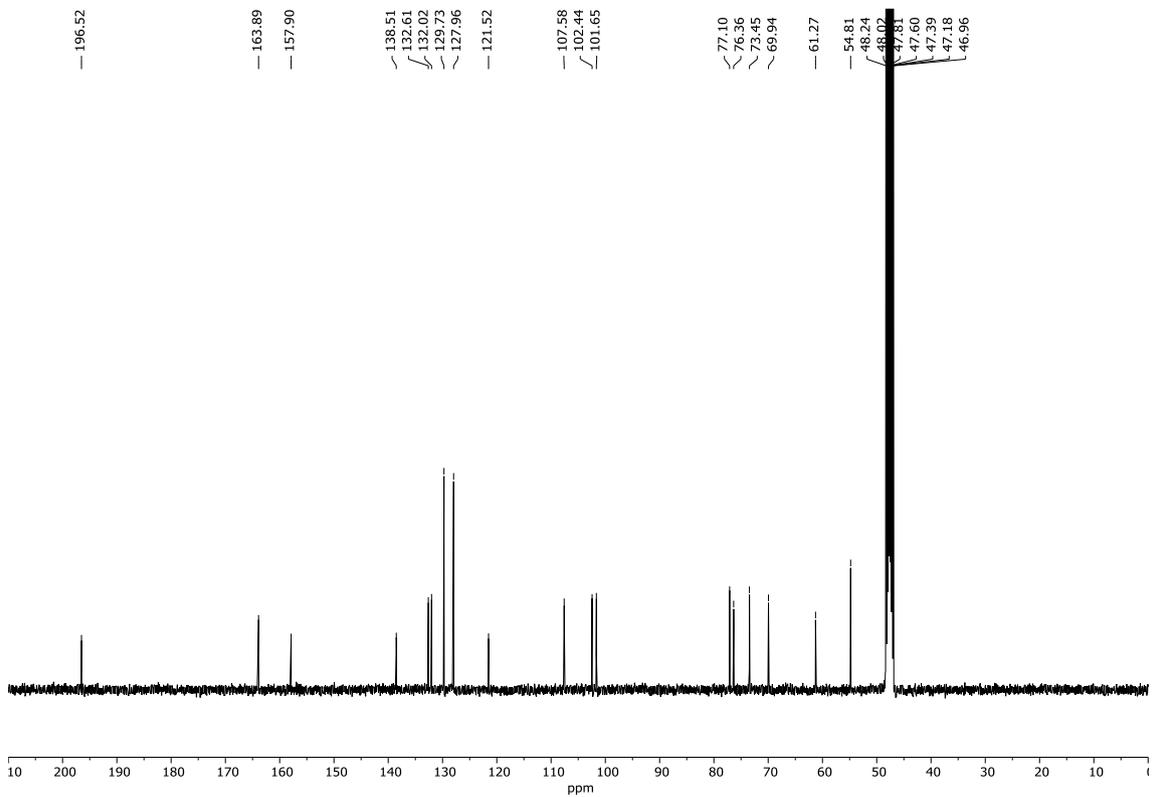
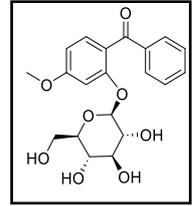
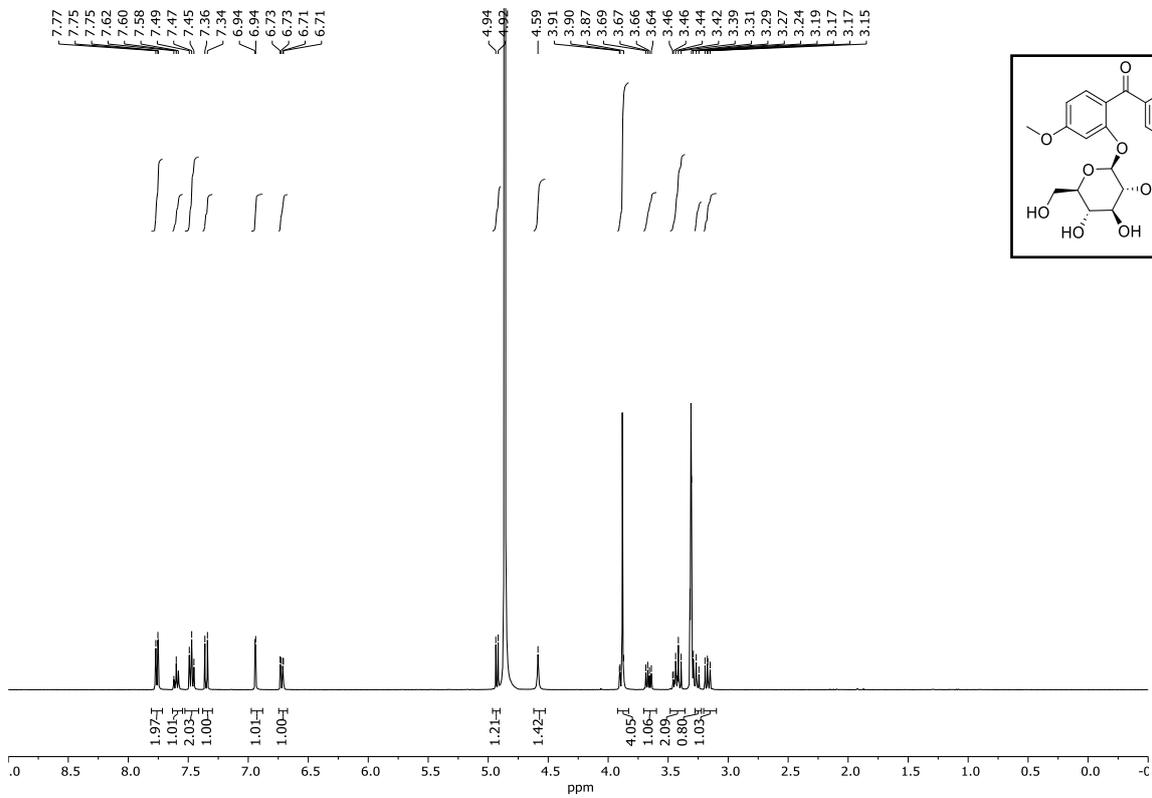
- [1]Sordo, C., & Gutiérrez, C. (2013). Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprana del cáncer de piel y melanoma. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30, 113-117.
- [2]Baron, E., Elmets, C., & Corona, R. (2013). Selection of sunscreen and sun-protective measures. <https://www.uptodate.com/contents/selection-of-sunscreen-and-sun-protective-measures>
- [3]Kim, S., & Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environment International*, 70, 143-157.
- [4]Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M. J., Nicolas, J. C., & Casellas, C. (2005). Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68,239-251.
- [5]Rodríguez, A. S., Sanz, M. R., & Rodríguez, J. B. (2015). Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). An approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*, 131, 85-90.
- [6]Giraldo, A., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Vidal-Liñán, L., & Beiras, R. (2017). Ecotoxicological evaluation of the UV filters ethylhexyl dimethyl p-aminobenzoic acid and octocrylene using marine organisms *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Paracentrotus lividus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 606-611.
- [7]Giokas, D. L., Salvador, A., & Chisvert, A. (2007). UV filters: from sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 360-374.
- [8]Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., ... & Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), 441-447.
- [9]Hogue, C. (2018). Hawaii lawmakers pass ban on sunscreen chemicals oxybenzone and octinoxate. *Chemical & Engineering News (ACS)*. 8-Mayo-2018
- [10]Blüthgen, N., Meili, N., Chew, G., Odermatt, A., & Fent, K. (2014). Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 476, 207-217.
- [11]Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., & Loya, Y. (2016). Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, oxybenzone (benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 265-288.
- [12]Paris, C., Lhiaubet-Vallet, V., Jiménez, O., Trullas, C., & Miranda, M. A. (2009). A blocked diketo form of avobenzone: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 178-184.
- [13]*CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, -Two Volume Set* (2019) Eds Griesbeck, A., Oelgemöller, M., & Ghetti, F. . CRC press.

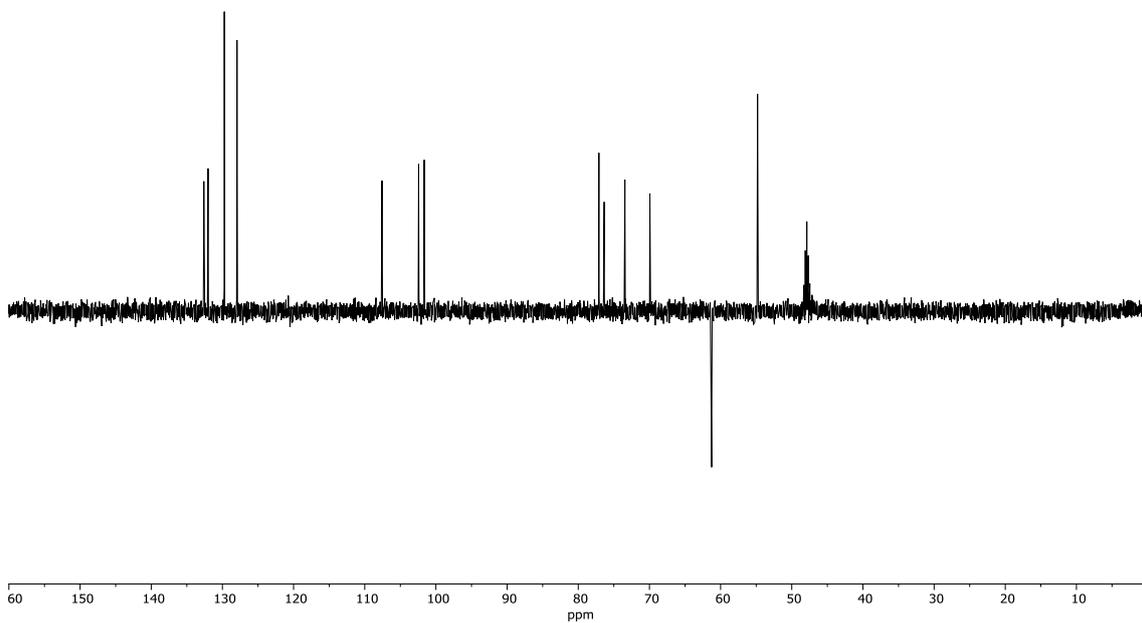
- [14]Hadel, L. M., Platz, M. S., & Scaiano, J. C. (1984). Study of hydrogen atom abstraction reactions of triplet diphenylcarbene in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 106(2), 283-287.
- [15]Muñoz, M. P., Valverde, D. M., & Brenes, I. A. (2022). Fotosensibilidad inducida por fármacos. *Revista Médica Sinergia*, 7(6), 11.
- [16]Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Rodrigues, R. M. (2017). Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*, 19-26.
- [17]Pattanaargson, S., Munhapol, T., Hirunsupachot, P., & Luangthongaram, P. (2004). Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 161(2-3), 269-274.
- [18]Baughman, B. M., Stennett, E., Lipner, R. E., Rudawsky, A. C., & Schmidtke, S. J. (2009). Structural and spectroscopic studies of the photophysical properties of benzophenone derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(28), 8011-8019.
- [19]Cuquerella, M. C., Lhiaubet-Vallet, V., Cadet, J., & Miranda, M. A. (2012). Benzophenone photosensitized DNA damage. *Accounts of Chemical Research*, 45(9), 1558-1570.
- [20]Manevski, N., Swart, P., Balavenkatraman, K. K., Bertschi, B., Camenisch, G., Kretz, O., ... & Litherland, K. (2015). Phase II metabolism in human skin: skin explants show full coverage for glucuronidation, sulfation, N-acetylation, catechol methylation, and glutathione conjugation. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(1), 126-139.
- [21]Vuckovic, D., Tinoco, A. I., Ling, L., Renicke, C., Pringle, J. R., & Mitch, W. A. (2022). Conversion of oxybenzone sunscreen to phototoxic glucoside conjugates by sea anemones and corals. *Science*, 376(6593), 644-648.
- [22]Tsui, M. M., Lam, J. C., Ng, T. Y., Ang, P. O., Murphy, M. B., & Lam, P. K. (2017). Occurrence, distribution, and fate of organic UV filters in coral communities. *Environmental science & technology*, 51(8), 4182-4190.
- [23]Jiang, R., Roberts, M. S., Collins, D. M., & Benson, H. A. E. (1999). Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48(4), 635.
- [24]Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Søbørg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., ... & Drzewiecki, K. T. (2012). Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International Journal of Andrology*, 35(3), 424-436.
- [25]Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M. J., Nicolas, J. C., & Casellas, C. (2005). Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(4), 239-251.
- [26]Schultz, T. W., Seward, J. R., & Sinks, G. D. (2000). Estrogenicity of benzophenones evaluated with a recombinant yeast assay: Comparison of experimental and rules-based predicted activity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(2), 301-304.
- [27]Bernauer, U., Bodin, L., Celleno, L., Chaudhry, Q., Coenraads, P. J., Dusinska, M. & Wijnhoven, S. (2021). Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Opinion on benzophenone-3 (CAS No 131-57-7, EC No 205-031-5).

- [28]Mutlu, E., Pierfelice, J., McIntyre, B. S., Cunny, H. C., Kissling, G. E., Burbach, B., & Waidyanatha, S. (2017). Simultaneous quantitation of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, a sunscreen ingredient, and its metabolites in Harlan Sprague Dawley rat plasma following perinatal dietary exposure. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(9), 744-754.
- [29]Fresnadillo, D. G. (2010). Generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. *Tecnia*, 20(1), 5-11.
- [30] Singh, Y., & Demchenko, A. V. (2019). Koenigs–Knorr glycosylation reaction catalyzed by trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate. *Chemistry–A European Journal*, 25(6), 1461-1465.
- [31]Koenigs, W., & Knorr, E. (1901). Ueber einige derivate des traubenzuckers und der galactose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 34(1), 957-981.
- [32]Michael, A., & Norton, L. (1879). On the action of iodine monochloride upon aromatic amines. *Journal of the American Chemical Society*, 1(11), 484-485.
- [33]Fischer, E., & Fischer, E. (1909). On the glucosides of alcohols. In: Untersuchungen Über Kohlenhydrate und Fermente. *Springer Berlin Heidelberg* (pp. 682-694).
- [34]Singh, Y., Wang, T., Geringer, S. A., Stine, K. J., & Demchenko, A. V. (2018). Regenerative glycosylation. *The Journal of organic chemistry*, 83(1), 374-381.
- [35]Montalti, M., Credi, A., Prodi, L., & Gandolfi, M. T. (2006). *Handbook of photochemistry*. CRC press.
- [36]Cadet, J., Mouret, S., Ravanat, J. L., & Douki, T. (2012). Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochemistry and Photobiology*, 88(5), 1048-1065.
- [37]Lhiaubet-Vallet, V., Belmadoui, N., Climent, M. J., & Miranda, M. A. (2007). The long-lived triplet excited state of an elongated ketoprofen derivative and its interactions with amino acids and nucleosides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(28), 8277-8282.

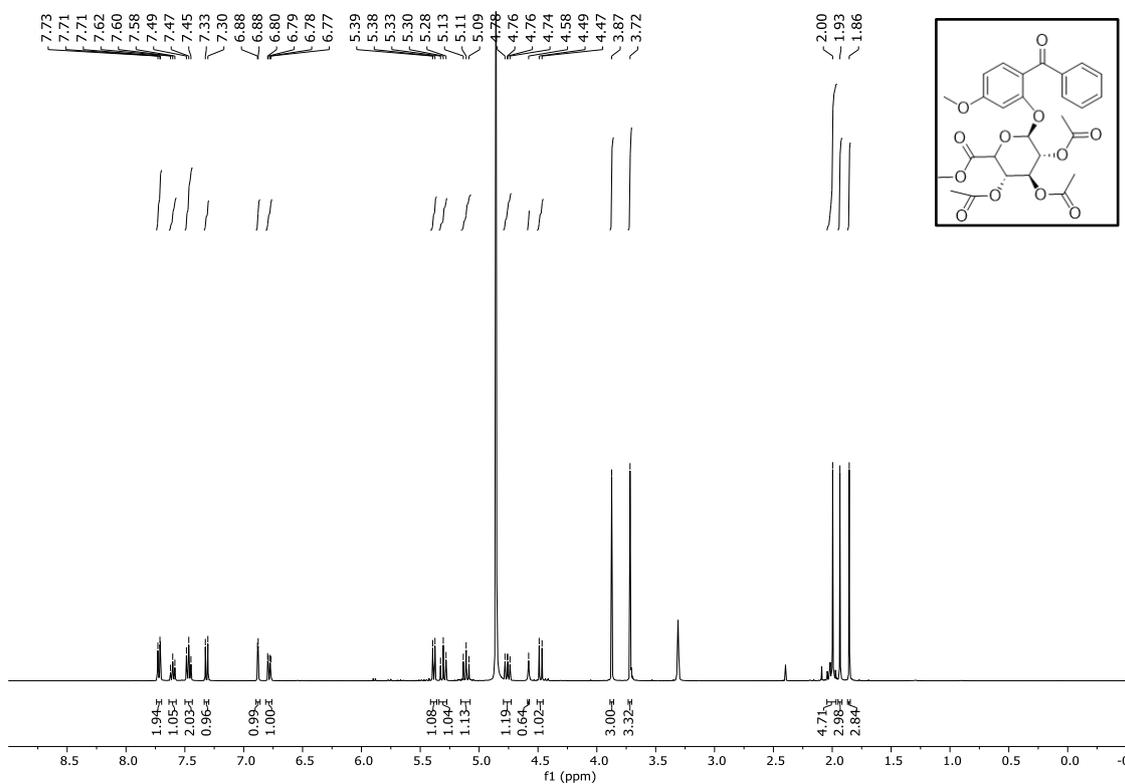
# 7. ANEXO

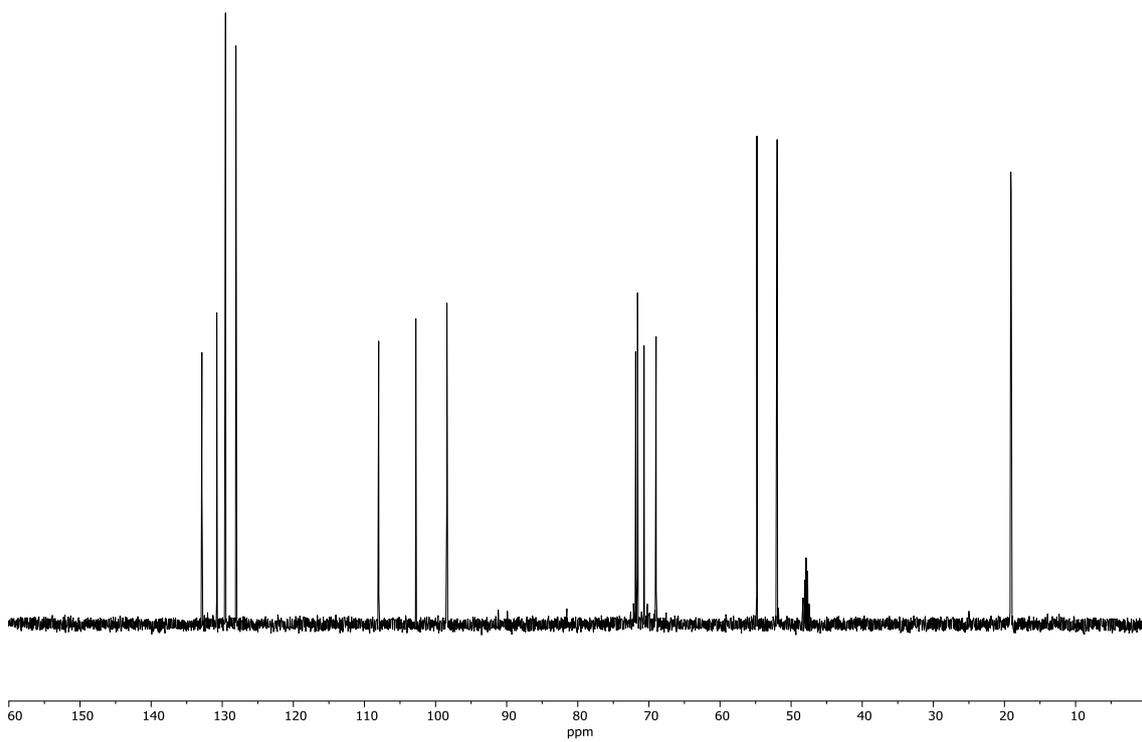
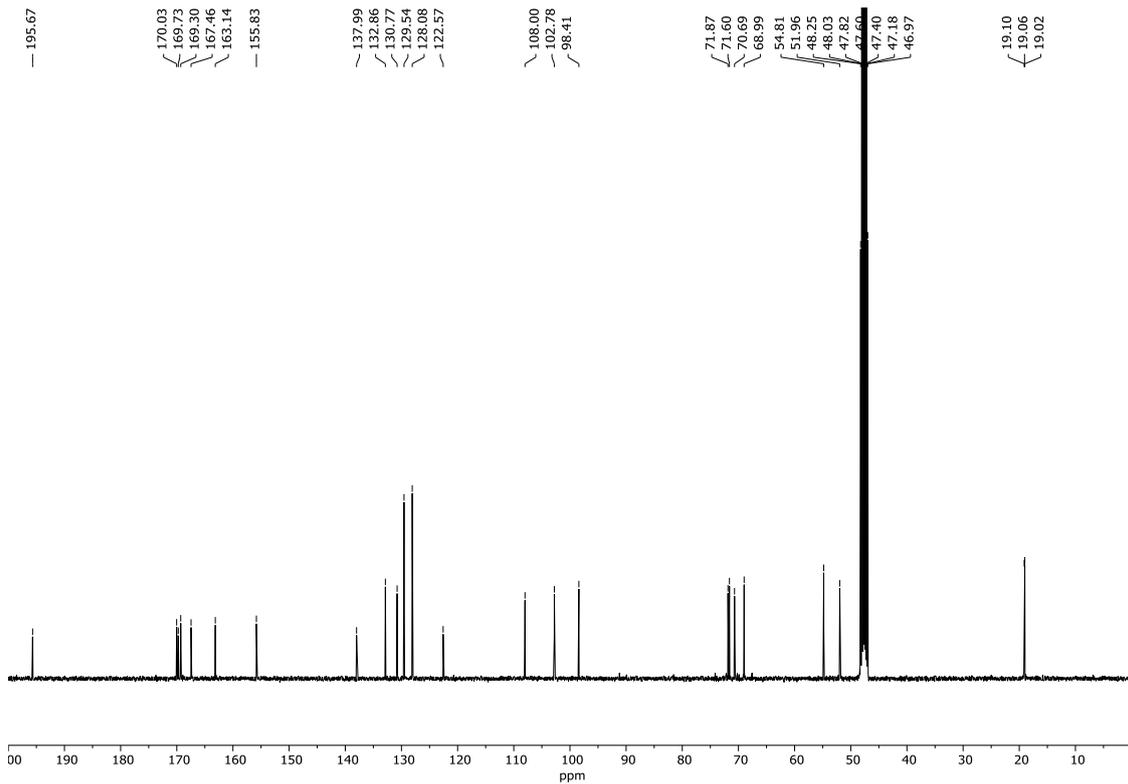
$^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } (101 MHz),  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 NMR of M1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$





$^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } (101 MHz),  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 NMR of M2P in  $\text{CD}_3\text{OD}$





$^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (101 MHz),  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 NMR of M2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

