

Resum

Els efectes fotosensibilitzants dels xenobiòtics són de creixent interès per a la salut pública ja que l'estil de vida moderna sovint s'associa l'exposició solar amb la presència de substàncies químiques sobre la pell. Un nombre important de productes químics com perfums, protectors solars, o agents terapèutics han sigut reconeguts com fotosensibilitzadors. En aquest context, s'han fet una sèrie d'esforços per a dissenyar un sistema model per a avaluar la seguretat front la llum. De fet, el control de la fototoxicitat és necessari en les primeres fases del procés de desenvolupament de fàrmacs, fins i tot abans de la introducció de medicaments i productes químics en la teràpia clínica, per a prevenir fotoreaccions no desitjades en humans. En el cas de nous productes farmacèutics, el seu potencial fototòxic ha de ser provat quan aquests absorbeixen en les regions corresponents de l'espectre solar, és a dir, per a longituds d'ona > 290 nm. Per tant, existeix l'evident necessitat d'una estratègia de control basada en experiments *in vitro*. L'objectiu de la present tesi va ser l'estudi fotoquímic de diferents fàrmacs fotoactius per a investigar els mecanismes moleculars clau responsables dels seus efectes secundaris de fotosensibilitat.

En una primera etapa, en el capítol 3, la rosuvastatina va ser triada com a compost representatiu de la família de les estatines. Aquest fàrmac reductor de lípids, també conegut com "superestatina", conté una resta 2-vinilbifenilo i, com s'ha descrit prèviament es descompon sota irradiació solar, donant anàlegs de dihidrofenantrè estables. Durant la caracterització fotofísica de la rosuvastatina, es va observar només una espècie transitòria de llarga durada a aproximadament 550 nm i es va assignar a l'intermedi primari de la fotociclació. Per tant, l'absència d'una absorció triplet-triplet i el baix rendiment de fluorescència descarten el paper del fàrmac original com sensibilizator eficient. En aquest context, es va enfocar l'atenció en el fotoproducte principal de la rosuvastatina (**ppRSV**). De fet, les propietats d'aquest compost dihidrofenantrè van presentar els components essencials necessaris per a ser un fotosensibilizator eficient, és a dir, (i) un alt rendiment quàntic de creuament intersistemes ($\Phi_{ISC} = 0.8$), (ii) una energia d'estat excitat triplet d'aprox 67 mol⁻¹ kcal, i (iii) un rendiment quàntic de formació d'oxigen molecular de singlet (Φ_{Δ}) de 0.3. A més, els estudis de fotòlisi de flaix làser van revelar una transferència d'energia triplet-triplet des de l'estat excitat triplet de **ppRSV** al de la timidina, la qual cosa porta a la formació de dímers ciclobutànics de timidina, un tipus important de lesió de l'ADN. Finalment, el triptòfan es va utilitzar com sonda per a investigar l'oxidació de tipus I o de tipus II intervinguda per **ppRSV**. D'aquesta manera, es va observar un procés de transferència d'electrons que dóna lloc al radical triptofanil i una oxidació intervinguda per oxigen singlet. Sobre la base dels resultats obtinguts, la rosuvastatina, a través del seu major fotoproducte **ppRSV**, ha de ser considerada com un potencial sensibilizator.

Posteriorment, l'itraconazol (**ITZ**), un agent antifúngic d'ampli espectre, va ser triat com a protagonista principal del capítol 4. Les seues propietats fotoquímiques van ser investigades a causa de les molèsties relacionades amb la fotosensibilitat.

Fotòlisi en estat estacionari, experiments de fluorescència i fosforescència es van realitzar per a comprendre la fotoreactivitat del **ITZ** en mitjans biològics. El fàrmac és inestable sota irradiació UVB, donant lloc a una deshalogenació primària en la fracció 2,4-diclorofenil principalment en la posició *orto*. En acetonitril, el principal fotoproducte sorgeix de l'atac intramolecular del radical arilo, generat inicialment, a l'anell de triazol. A més, els compostos resultants de la ruptura homolítica de l'enllaç C-Cl en posicions *orto* o *para* i posterior abstracció d'hidrogen des del mitjà s'obtenen en menor quantitat. En dissolvents que cedeixen fàcilment H, tals com l'etanol, els principals fotoproducte es formen per deshalogenació reductiva. A més, la irradiació d'una diada model, que conté una unitat de triptòfan i el radical 2,4-diclorofenil reactiu del itraconazol, es conclou amb la formació d'un nou enllaç covalent entre aquestes dues subestructures. Açò revela que l'homòlisi de l'enllaç C-Cl de **ITZ** pot acabar amb l'alquilació de residus d'aminoàcids reactius de les proteïnes, que posteriorment condueixen a la formació de fotoaductes covalents. Per tant, s'ha establert que el procés clau en la fotosensibilització de l'itraconazol és la ruptura de l'enllaç carboni-halogen, que produeix radicals arilo i àtoms de clor. Aquestes espècies altament reactives poden ser responsables d'importants danys biològics intervinguts per radicals lliures, incloent la peroxidació lipídica o fotounió a les proteïnes.

En el capítol 5, es parla del comportament fotoquímic de l'imatinib (**IMT**). Este és un inhibidor de la tirosina quinasa utilitzat en el tractament d'alguns tipus de càncer humà. Aquest fàrmac constitueix un clar exemple de disseny racional de fàrmacs basat en l'optimització de l'estructura química per a aconseguir una millor activitat farmacològica. Les reaccions cutànies, com l'augment de fotosensibilitat o pseudoporfíria, són alguns dels efectes secundaris no hematològics més comuns de l'**IMT**; no obstant açò, les bases moleculars d'aquestes indicacions clíniques no es coneixen encara. Per tant, per a comprendre millor les propietats fotosensibilitzants de l'**IMT**, es va estudiar el seu comportament fotoquímic juntament amb els de els seus fragments potencialment fotoactius: anilino-pirimidina i piridilo-pirimidina. En aquest context, es van dur a terme experiments de fluorescència en estat estacionari i en temps resolt, així com de fotòlisi de flaix làser, i es va investigar el potencial de fotosensibilització cap a l'ADN per mitjà de la detecció de trencaments de cadena utilitzant l'electroforesi en gel de agarosa. Els resultats obtinguts van revelar que el fàrmac en sí i el seu fragment anilino-pirimidina no són fotosensibilitzadors d'ADN. En cas contrari, la subestructura piridilo-pirimidina presenta un marcat potencial fotogenotòxic, que es va associar amb la presència d'un estat excitat triplet de llarga durada. Curiosament, aquesta espècie reactiva es desactiva de manera eficient per benzanilida, un altre fragment molecular de l'**IMT**. Clarament, la integració de la fracció fotoactiva piridilo-pirimidina en una estructura més complexa modifica fortament el seu comportament fotoquímic, que en aquest cas resulta afortunada, ja que condueix a un perfil toxicològic millorat. Per tant, sobre la base dels resultats experimentals, per l'**IMT** sembla poc probable una fotosensibilització directa *in vivo*. En canvi, els trastorns de fotosensibilitat reportats podrien estar relacionats amb els processos indirectes, tals com la reducció

de la melanogènesi, suggerida anteriorment, o l'acumulació de porfirines endògenes.

Finalment, es va analitzar una errada present en el mètode TEMPO / EPR per a la detecció d'oxigen de singlet. Per a molts estudis biològics i biomèdics, és essencial detectar la producció de $^1\text{O}_2$ i quantificar el seu rendiment quàntic. Entre els mètodes disponibles, la detecció de la fosforescència característica d'oxigen singlet a 1270 nm, emissió resolta en el temps en l'infraroig proper (TRNIR), constitueix l'enfocament més directe i sense ambigüitats. Un mètode indirecte alternatiu és la ressonància paramagnètica electrònica (EPR) en combinació amb "trapping". Açò es basa en la detecció del radical lliure TEMPO format després de l'oxidació del TEMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina) per l'oxigen singlet. Encara que el mètode TEMPO / EPR s'ha utilitzat freqüentment, pot produir resultats ambigus. Açò va ser demostrat pel present estudi, on es van comparar els rendiments quàntics de formació d'oxigen singlet obtinguts per emissió TRNIR i pel mètode TEMPO/EPR per a un conjunt de fotosensibilizadors acreditats. Els resultats van revelar que el mètode TEMPO/EPR condueix a una sobrestimació significativa del rendiment d'oxigen singlet quan l'estat excitat singlet o triplet dels fotosensibilizadors és desactivat de manera eficient per TEMP, que actua com a donador d'electrons. En tal cas, la generació de catió radical $\text{TEMP}^{+\bullet}$, seguit per desprotonació i reacció amb oxigen molecular, dóna lloc a una senyal detectable per EPR que no està associada amb la producció d'oxigen singlet. Aquest coneixement és essencial per a una aplicació adequada i sense errors en el mètode EPR/TEMPO en química, biologia i en estudis mèdics.