

Resumen

Los efectos fotosensibilizantes de los xenobióticos son de creciente interés para la salud pública ya que el estilo de vida moderna a menudo asocia la exposición solar con la presencia de sustancias químicas en la piel. Un número importante de productos químicos como perfumes, protectores solares, o agentes terapéuticos han sido reconocidos como fotosensibilizadores. En este contexto, se ha realizado un considerable esfuerzo para diseñar un sistema modelo para evaluar la seguridad frente a la luz. De hecho, el control de la fototoxicidad es necesario en las primeras fases del proceso de desarrollo de fármacos, incluso antes de la introducción de medicamentos y productos químicos en la terapia clínica, para prevenir fotorreacciones no deseadas en humanos. En el caso de nuevos productos farmacéuticos, su potencial fototóxico tiene que ser probado cuando éstos absorben en las regiones correspondientes del espectro solar, es decir, para longitudes de onda >290 nm. Por lo tanto, existe la evidente necesidad de una estrategia de control basada en experimentos *in vitro*. El objetivo de la presente tesis fue el estudio fotoquímico de diferentes fármacos fotoactivos para investigar los mecanismos moleculares clave responsables de sus efectos secundarios de fotosensibilidad.

En una primera etapa, en el capítulo 3, la rosuvastatina fue elegida como compuesto representativo de la familia de las estatinas. Este fármaco reductor de lípidos, también conocido como "superestatina", contiene un grupo 2-vinilbifenilo y, como se ha descrito previamente se descompone bajo irradiación solar, dando análogos de dihidrofenantreno estables. Durante la caracterización fotofísica de la rosuvastatina, se observó sólo una especie transitoria de larga duración a aproximadamente 550 nm y fue asignada al intermedio primario de la fotociclación. Por lo tanto, la ausencia de una absorción triplete-triplete y el bajo rendimiento de fluorescencia descartan el papel del fármaco original como sensibilizador eficiente. En este contexto, se centró la atención en el fotoproducto principal de la rosuvastatina (**ppRSV**). De hecho, las propiedades de este compuesto dihidrofenantreno presentaron los rasgos esenciales necesarios para ser un fotosensibilizador eficiente, es decir, (i) un alto rendimiento cuántico de cruce intersistemas ($\Phi_{ISC} = 0.8$), (ii) una energía de estado excitado triplete de aproximadamente 67 kcal mol⁻¹, y (iii) un rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de 0.3. Además, los estudios de fotólisis de destello láser revelaron una transferencia de energía triplete-triplete desde el estado excitado triplete de **ppRSV** a la timidina, lo que lleva a la formación de dímeros ciclobutánicos de timidina, un tipo importante de lesión del ADN. Por último, el triptófano se utilizó como sonda para investigar la oxidación de Tipo I o de Tipo II mediada por **ppRSV**. De esta manera, se observó un proceso de transferencia de electrones que da lugar al radical triptofanilo y una oxidación mediada por oxígeno singlete. Sobre la base de los resultados obtenidos, la rosuvastatina, a través de su fotoproducto mayoritario **ppRSV**, debe ser considerada como un potencial sensibilizador.

Posteriormente, el itraconazol (**ITZ**), un agente antifúngico de amplio espectro, fue elegido como protagonista principal del capítulo 4. Sus propiedades foto-

químicas fueron investigadas en relación con los efectos adversos como la fotosensibilidad. Se realizaron estudios de fotólisis en estado estacionario, experimentos de fluorescencia y fosforescencia para comprender la fotorreactividad del **ITZ** en medios biológicos. El fármaco es inestable bajo irradiación UVB, dando lugar a una deshalogenación en la parte de 2,4-diclorofenilo principalmente en la posición *orto*. En disolventes como el acetonitrilo, el principal fotoproducto surge del ataque intramolecular del radical arilo, generado inicialmente, al anillo de triazol. Además, los compuestos resultantes de la ruptura homolítica del enlace C-Cl en posiciones *orto* o *para* y posterior abstracción de hidrógeno desde el medio se obtienen en menor cantidad. En disolventes capaces de ceder H más fácilmente, tales como el etanol, los principales fotoproductos se forman por deshalogenación reductiva. Además, la irradiación de una diada modelo, que contiene una unidad de triptófano y el radical reactivo, 2,4-diclorofenilo del itraconazol, se obtiene la formación de un nuevo enlace covalente entre estas dos subestructuras. Esto revela que la homólisis del enlace C-Cl del **ITZ** puede resultar en la alquilación de residuos de aminoácidos reactivos de las proteínas, que posteriormente conducirá a la formación de fotoaductos covalentes. Por lo tanto, se ha establecido que el proceso clave en la fotosensibilización del itraconazol es la ruptura del enlace carbono-halógeno, que produce radicales arilo y átomos de cloro. Estas especies altamente reactivas pueden ser responsables de importantes daños biológicos mediados por radicales libres, incluyendo la peroxidación lipídica o fotounión a las proteínas.

En el capítulo 5, se aborda el comportamiento fotoquímico del imatinib (**IMT**). Este es un inhibidor de la tirosina quinasa utilizado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer humano. Este fármaco constituye un claro ejemplo de diseño racional basado en la optimización de la estructura química para alcanzar una mejor actividad farmacológica. Las reacciones cutáneas, como el aumento de fotosensibilidad o pseudoporfiria, son algunos de los efectos secundarios no hematológicos más comunes del **IMT**; sin embargo, las bases moleculares de estas indicaciones clínicas no se conocen todavía. Por lo tanto, para comprender mejor las propiedades fotosensibilizantes del **IMT**, se estudió su comportamiento fotoquímico junto con el de sus fragmentos potencialmente fotoactivos: anilino-pirimidina y piridilo-pirimidina. En este contexto, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia en estado estacionario y en tiempo resuelto, así como de fotólisis de destello láser, y se investigó el potencial de fotosensibilización hacia el ADN por medio de la detección de roturas de cadena utilizando la electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos revelaron que el fármaco en sí y su fragmento anilino-pirimidina no son fotosensibilizadores de ADN. Por el contrario, la subestructura piridilo-pirimidina exhibe un marcado potencial fotogenotóxico, que se asoció con la presencia de un estado excitado triplete de larga duración. Curiosamente, esta especie reactiva se desactiva de manera eficiente por benzanilida, otro fragmento molecular del **IMT**. Claramente, la integración de la fracción fotoactiva piridilo-pirimidina en una estructura más compleja modifica fuertemente su comportamiento fotoquímico, que en este caso resulta afortunado, lo que conduce a un perfil toxicológico mejorado. Por lo tanto, sobre la base de los resultados experimentales, una fotosensibilización directa *in*

vivo por el **IMT** parece poco probable. En cambio, los trastornos de fotosensibilidad reportados podrían estar relacionados con los procesos indirectos, tales como la reducción de la melanogénesis, sugerida anteriormente, o la acumulación de porfirinas endógenas.

Por último, se analizó la restricción del método TEMPO / EPR para la detección del oxígeno de singlete. Para muchos estudios biológicos y biomédicos, es esencial detectar la producción de $^1\text{O}_2$ y cuantificar su rendimiento cuántico. Entre los métodos disponibles, la detección de la fosforescencia característica del oxígeno singlete a 1270 nm por emisión resuelta en el tiempo en el rango del infrarrojo cercano (TRNIR), constituye el enfoque más directo y sin ambigüedades. Un método indirecto alternativo es la resonancia paramagnética electrónica (EPR) en combinación con una sonda. Esto se basa en la detección del radical libre TEMPO formado después de la oxidación del TEMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina) por el oxígeno singlete. Aunque el método TEMPO / EPR se ha utilizado frecuentemente, puede dar lugar a artefactos. Esto fue demostrado en el presente estudio, donde se compararon los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete obtenidos por emisión TRNIR y por el método TEMPO/EPR para un conjunto de fotosensibilizadores. Los resultados revelaron que el método TEMPO/EPR conduce a una sobrestimación significativa del rendimiento de oxígeno singlete cuando el estado excitado singlete o triplete de los fotosensibilizadores es desactivado de manera eficiente por TEMP, que actúa como donador de electrones. En tal caso, la generación de catión radical $\text{TEMP}^{+\bullet}$, seguida por desprotonación y reacción con oxígeno molecular, da lugar a una señal detectable por EPR que no está asociada con la producción de oxígeno singlete. Este conocimiento es esencial para una aplicación adecuada y sin errores del método EPR/TEMPO en química, biológica y medicina.