

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
INSTITUTO UNIVERSITARIO MIXTO DE TECNOLOGÍA  
QUÍMICA (UPV-CSIC)



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



TESIS DOCTORAL

Formación de dímeros pirimidínicos en el  
estado excitado triplete:  
Ciclobutanos frente a fotoproductos (6,4)

Presentada por

**Victoria Vendrell Criado**

Dirigida por

**Prof. Miguel A. Miranda Alonso**  
**Dra. M. Consuelo Cuquerella Alabort**

Valencia, Noviembre 2015



## **CERTIFICACIÓN**

Miguel Ángel Miranda Alonso catedrático de química de la Universitat Politècnica de València y M. Consuelo Cuquerella Alabort contratada postdoctoral del CSIC

Certifican que la presente tesis doctoral titulada “ Formación de dímeros pirimidínicos en el estado excitado triplete: “Ciclobutanos frente a fotoproductos (6,4)” ha sido desarrollada por VICTORIA VENDRELL CRIADO bajo su dirección conjunta en el Instituto universitario mixto de tecnología química (UPV-CSIC)

Prof. Miguel A. Miranda  
Alonso

Dra. M. Consuelo  
Cuquerella Alabort



A Toni i Amaia



## **Abreviaturas y símbolos**





Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
BP	Benzofenona
BR	Birradical
BTU	5- <i>tert</i> -butil-2-tiouracilo
CES	Cruce entre sistemas
CI	Conversión interna
DCB	Dímero ciclobutano
FS	Fotosensibilizador
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
PBS	Disolución acuosa tamponada de fosfato
Pir	Pirimidina
6,4 PP	Fotoproducto (6,4)
Pyo	1- $\beta$ -D (2' desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TE	Transferencia de energía
TETT	Transferencia de energía triplete-triplete

Tmd	Timidina
TMF	Monofosfato de timidina
TT	2-tiotimina
TU	2-tiouracilo
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra resolución (Ultra Performance Liquid Chromatography)
$\tau$	Tiempo de vida
$\phi$	Rendimiento cuántico
Xan	Xantona





# Índice



<b>Capítulo 1: Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fotoquímica de compuestos carbonílicos.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Fotocicloaddición [2+2] enona-alqueno. Formación de ciclobutanos.....	3
1.1.2 Reacción de Paternò-Büchi.....	4
1.1.3 Reacción de Norrish tipo II: reacción de Norrish-Yang.....	5
<b>1.2 Daño fotoquímico al ADN.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 La luz solar como arma de doble filo para la salud: beneficiosa y dañina.	6
1.2.2 Radiación ultravioleta y cáncer de piel.....	7
1.2.3 Modificaciones en el ADN originadas por radiación ultravioleta.....	8
<b>1.2.4 Formación fotosensibilizada de los dímeros ciclobutánicos .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.4.1 Propiedades del fotosensibilizador.....</b>	<b>10</b>
1.2.4.2 Eficiencia de la dimerización fotosensibilizada de pirimidinas .....	11
1.2.4.3 Fotoproductos pirimidínicos en el ADN.....	12
1.2.4.4 Fotosensibilización de timina y timidina.....	12
1.2.4.4.1 Subproductos de la fotorreacción de fotosensibilizadores con timina.....	13
1.2.4.5 Fotosensibilización de oligonucleótidos.....	14
1.2.4.6 Fotosensibilización en el ADN.....	14
<b>1.3 Cálculos teóricos .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Fotofísica .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Emisión.....	16
1.4.2 Fotólisis de destello láser .....	18
1.4.2.1 Población intrínseca del estado excitado triplete tras excitación directa de las bases pirimidínicas.....	18
1.4.2.2 Generación fotosensibilizada de los tripletes de las bases pirimidínicas y sus derivados .....	20
<b>1.5 Referencias .....</b>	<b>22</b>

<b>Capítulo 2: Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo 3: Propiedades fotofísicas de 2-tiopirimidinas sustituidas en C5.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Objetivo .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Resultados.....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Propiedades de absorción y emisión de 2-tiopirimidinas.....	38
3.3.2 Fotólisis de destello láser .....	40
3.3.3 Cálculos teóricos.....	43
3.3.3.1 Geometría y propiedades electrónicas.....	43
3.3.3.2 Propiedades de absorción y emisión.....	45
<b>3.4 Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Sección experimental .....</b>	<b>49</b>
3.5.1 Absorción y emisión.....	49
3.5.2 Fotólisis de destello láser .....	49
3.5.3 Detalles computacionales.....	50
3.5.4 Síntesis de los compuestos .....	51
3.5.4.1 General .....	51
3.5.4.2 Síntesis de 5- <i>tert</i> -butil-2-tiouracilo (BTU) .....	51
<b>3.6 Referencias.....</b>	<b>53</b>
<b>3.7 Anexo .....</b>	<b>56</b>



---

<b>Capítulo 4: Efecto del sustituyente en C5 sobre la fotorreactividad de pirimidinas.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2 Objetivo.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3 Resultados.....</b>	<b>64</b>
4.3.1 Irradiación directa de <b>1c</b> e identificación del fotoproducto obtenido.....	64
4.3.2 Irradiación de <b>1c</b> fotosensibilizada por benzofenona.....	64
4.3.3 Irradiación de <b>1c</b> (y <b>2c</b> ) fotosensibilizada por acetona.....	67
4.3.4 Irradiación de <b>1c</b> (y <b>2c</b> ) fotosensibilizada por xantona.....	68
4.3.5 Fotólisis de destello láser .....	69
4.3.5.1 Desactivación de los estados excitados triplete de benzofenona y xantona por <b>1c</b> .....	71
<b>4.4 Conclusiones .....</b>	<b>73</b>
<b>4.5 Sección experimental.....</b>	<b>73</b>
4.5.1 Fotólisis de destello láser .....	73
4.5.2 Síntesis de los compuestos .....	74
4.5.2.1 General.....	74
4.5.2.2 Esquema sintético de <b>1c</b> y <b>2c</b> .....	74
4.5.2.3 Síntesis <b>1a</b> .....	75
4.5.2.4 Síntesis de <b>1b</b> .....	76
4.5.2.5 Síntesis <b>1c</b> o <b>2c</b> .....	78
4.5.3 Procedimiento de las irradiaciones.....	81
4.5.3.1 Irradiación directa de <b>1c</b> .....	81
4.5.3.2 Fotosensibilización de <b>1c</b> o <b>2c</b> en presencia de benzofenona.....	82
4.5.3.2.1 Fotoproductos obtenidos de <b>1c</b> .....	83
4.5.3.2.2 Fotoproductos obtenidos de <b>2c</b> .....	87
4.5.3.3 Fotosensibilización de <b>1c</b> o <b>2c</b> en presencia de acetona .....	91
4.5.3.3.1 Fotoproductos obtenidos de <b>1c</b> .....	91

4.5.3.3.2 Fotoproductos obtenidos de <b>2c</b> .....	99
4.5.3.4 Fotosensibilización de <b>1c</b> o <b>2c</b> por xantona .....	104
4.5.3.4.1 Fotoproductos obtenidos de <b>1c</b> .....	104
4.5.3.4.2 Fotoproductos obtenidos de <b>2c</b> .....	107
<b>4.6 Referencias</b> .....	<b>108</b>
<b>4.7 Anexo</b> .....	<b>110</b>

**Capítulo 5: Química de los estados excitados superiores de timina generados mediante procesos multifotónicos.....113**

<b>5.1 Introducción</b> .....	<b>115</b>
<b>5.2 Objetivo</b> .....	<b>117</b>
<b>5.3 Resultados</b> .....	<b>119</b>
5.3.1 Estudio preliminar de la diada. Propiedades fotofísicas.....	119
5.3.2 Fotosensibilización de la reacción Norrish-Yang/proceso $n\pi^*$ en el compuesto <b>1a</b> .....	120
5.3.2.1 Determinación del rendimiento químico de formación de los fotoproductos.....	122
5.3.2.2 Evidencias de la formación del fotoproducto <b>2</b> mediante un proceso bifotónico.....	123
5.3.2.3 Formación de <b>2</b> mediante un proceso bifotónico .....	124
<b>5.4 Conclusiones</b> .....	<b>125</b>
<b>5.5 Sección experimental</b> .....	<b>126</b>
5.5.1 Análisis UPLC-MS/MS .....	126
5.5.2 Análisis HPLC.....	126
5.5.3 Fotólisis de destello láser .....	126
5.5.4 Fotólisis de destello dos láseres dos colores.....	127
5.5.5 Irradiación de las muestras .....	127
5.5.6 Síntesis de los compuestos .....	128

---

5.5.6.1 General.....	128
5.5.6.2 Esquema sintético .....	128
5.5.6.3 Síntesis de <b>3</b> .....	129
5.5.6.4 Síntesis de <b>1a</b> .....	130
5.5.6.5 Síntesis de ácido uracilacético .....	132
5.5.6.6 Síntesis de <b>1b</b> .....	133
5.5.6.7 Síntesis de ácido (7,7-Dimetil-3-oxo-2,4 diazabicyclo[4.2.0]octa-1,5- dien-4-il) acético <b>4</b> .....	135
5.5.6.8 Síntesis de <b>2</b> .....	136
<b>5.6 Referencias.....</b>	<b>138</b>
<b>Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2- pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Tro- ya.....</b>	<b>141</b>
<b>6.1 Introducción.....</b>	<b>143</b>
<b>6.2 Objetivo.....</b>	<b>145</b>
<b>Parte 1: 1-β-D-(2'deoxiribosil)-5-metil- 2-pirimidona como fotosensibilizador del ADN.....</b>	<b>146</b>
<b>6.3.1 Resultados.....</b>	<b>146</b>
6.3.1.1 Propiedades fotofísicas de Pyo .....	146
6.3.1.1.1 Espectros de absorción UV, emisión de fluorescencia y fosforescencia .....	146
6.3.1.1.2 Fotólisis de destello láser .....	148
6.3.1.2 Formación de dímeros ciclobutánicos.....	149
6.3.1.3 Procesos oxidativos.....	151
6.3.1.3.1 El oxígeno singlete.....	151
6.3.1.3.2 El radical hidroxilo.....	152
6.3.1.4 Pyo como fotosensibilizador de la formación de DCBs de timina en el ADN.....	153

<b>Parte 2: El fotoproducto (6,4) como fotosensibilizador del ADN .....</b>	<b>156</b>
<b>6.3.2 Resultados .....</b>	<b>156</b>
6.3.2.1 Propiedades fotofísicas de 6,4 PP.....	157
6.3.2.2 Fotólisis de destello láser.....	158
6.3.2.3 Formación de dímeros ciclobutánicos.....	158
6.3.2.4 El daño 6,4 PP como fotosensibilizador de DCBs de timina en el ADN.....	159
6.3.2.4.1 Optimización de la ratio ADN: 6,4 PP.....	159
6.3.2.4.2 El 6,4 PP como fotosensibilizador de DCBs en el ADN.....	160
<b>6. 4. Conclusiones.....</b>	<b>161</b>
<b>6.5. Sección experimental .....</b>	<b>162</b>
6.5.1 Medidas espectroscópicas.....	162
6.5.2 Fotólisis de destello láser.....	162
6.5.3 Determinación del rendimiento cuántico de triplete Pyo y 6,4 PP. Método de comparación.....	163
6.5.4 Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia.....	164
6.5.5 Irradiación monocromática.....	164
6.5.6 Análisis UPLC-MS/MS .....	164
6.5.7 Experimentos “spin trap”/ EPR.....	165
6.5.7.1 Detección de oxígeno singlete.....	165
6.5.7.2 Detección del radical hidroxilo.....	165
6.5.8 Monitorización de la formación del aducto ácido tereftálico-OH· .....	165
6.5.9 Estado triplete excitado de Pyo o 6,4 PP como sensibilizadores de la dimerización de timidina en el ADN .....	165
6.5.10 Síntesis de los compuestos.....	166
6.5.10.1 General.....	166
6.5.10.2 Esquema sintético de 1-(β-D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona (Pyo) .....	167
6.5.10.3 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-timidina <b>2</b> .....	167

---

6.5.10.4 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-4-(1,2,4-1H-triazol-1-il)timidina <b>3</b> .....	169
6.5.10.5 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona <b>5</b> .....	171
6.5.10.6 Síntesis de 1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona <b>6</b> .....	173
6.5.10.7 Esquema sintético de 6,4PP .....	175
6.5.10.8 Síntesis de 5'-O-( <i>tert</i> -butildimetilsilil)timidina <b>7</b> .....	175
6.5.10.9 Síntesis de 3'-O-metiltiometil-5'-O-( <i>tert</i> -butildimetilsilil)timidina <b>8</b> .....	177
6.5.10.10 Síntesis de 3'-O-acetil-5'-O-( <i>tert</i> -butildimetilsilil)timidina <b>9</b> .....	179
6.5.10.11 Síntesis of 3'-O-acetil-timidina <b>10</b> .....	181
6.5.10.12 Síntesis del dímero 5'A-O- ( <i>tert</i> -butildimetilsilil)-3'B-acetil-unión formacetal timidina <b>11</b> .....	182
6.5.10.14 Síntesis del compuesto <b>13</b> .....	184
<b>6.6 Referencias</b> .....	<b>186</b>
<b>6.7 Anexo</b> .....	<b>189</b>
<b>Capítulo 7: Instrumentación</b> .....	<b>193</b>
<b>7.1 Medidas espectroscópicas</b> .....	<b>195</b>
7.1.1 Medidas de absorción .....	195
7.1.2 Medidas de emisión .....	195
<b>7.2 Fotólisis de destello láser</b> .....	<b>196</b>
<b>7.3 Experimentos <i>spin trap</i> mediante resonancia paramagnética electrónica</b> .....	<b>196</b>
<b>7.4 Análisis UPLC-MS/MS</b> .....	<b>197</b>
<b>7.5 Análisis HPLC</b> .....	<b>197</b>
<b>Capítulo 8: Conclusiones generales</b> .....	<b>199</b>

*Índice*

---

<b>Resúmenes.....</b>	<b>203</b>
<b>Publicaciones.....</b>	<b>215</b>







# **Capítulo 1: Introducción**



La fotoquímica es una disciplina que estudia las reacciones químicas producidas por la radiación ultravioleta-visible (200-700 nm, UV-vis) e infrarroja (700-2500 nm). Entenderla resulta de vital importancia ya que este tipo de fotorreacciones son clave en muchos procesos biológicos como la fotosíntesis, la quimiluminiscencia o el cáncer de piel.<sup>1,2</sup>

Un proceso fotoquímico se inicia tras la absorción de un fotón de luz por un cromóforo, obteniendo su estado excitado superior ( $S_n$ , (i), Fig. 1.1). Éste, que representa una situación inestable con respecto a su estado fundamental ( $S_0$ ), suele relajarse por conversión interna (CI, (ii)) con rapidez a su estado excitado singlete de menor energía  $S_1$  (Fig. 1.1). Este estado a su vez puede desactivarse mediante procesos radiativos (fluorescencia, (iii)) o procesos no radiativos como la relajación vibracional ((iv), Fig. 1.1). También puede producirse un cruce entre sistemas (CES, (v)) a un estado triplete superior, del cual se relaja mediante una CI poblando el estado  $T_1$ . Este último podría emitir fosforescencia, (vi), o transmitir energía (TE, (vii)) al  $T_1$  de otra molécula. Además, en principio cualquier estado excitado puede dar lugar a una reacción química.<sup>3</sup> El diagrama de Jablonski proporciona una descripción esquemática de estos procesos (Fig. 1.1).<sup>4</sup>

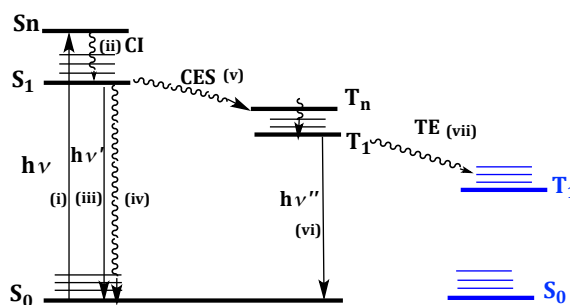


Fig. 1.1: Diagrama de Jablonski.

En este contexto es necesario conocer tanto las propiedades físicas de los diferentes cromóforos como las fotorreacciones a las que pueden dar lugar. El interés de la presente tesis doctoral se centra en el daño fotoquímico inducido a las bases pirimidínicas del ADN. Por ello se requiere un buen conocimiento de la fotoquímica del grupo carbonilo y en especial de las reacciones inducidas por la luz UV en este cromóforo. Más específicamente, han sido de especial interés las fotocicloaddiciones [2+2], la reacción de Paternò-Büchi y la abstracción de hidrógeno, en concreto la implicada en la fotocicloaddición de Norrish-Yang.

### 1.1 Fotoquímica de compuestos carbonílicos

En general cuando el grupo carbonilo R absorbe un fotón, alcanza su estado excitado  $R^*$  que da lugar a especies intermedias que pueden ser un par de radicales, un birradical (BR) o un par de iones radicales. A continuación se presentan las propiedades de este estado excitado  $R^*$ :<sup>5</sup>

- La configuración electrónica de  $R^*$  puede ser  $n\pi^*$  o  $\pi\pi^*$ , siendo el  $T_1(n\pi)^*$  el más reactivo y comúnmente observado.
- El estado excitado  $n\pi^*$  puede tener un cierto carácter  $\pi\pi^*$ , dependiendo de la proximidad energética de los estados excitados con la misma multiplicidad.
- $R^*$  ( $n\pi$ ) puede estar localizado en el grupo C=O, o dependiendo del sustituyente, puede estar deslocalizado sobre sistemas conjugados.

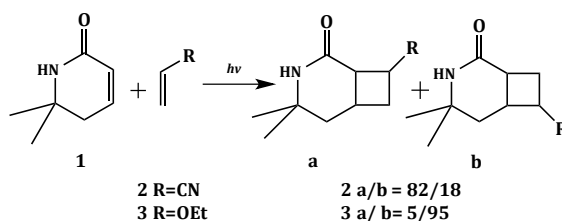
Es importante recordar que cuando se estudia la fotoquímica del grupo C=O hay que tener presentes a las enonas. Éstas están formadas por dos grupos funcionales, un carbonilo y un alqueno conjugados, y pueden originar todas las reacciones conocidas de ambos grupos: las reacciones de naturaleza  $n\pi^*$  del grupo carbonilo y las correspondientes a las transiciones  $\pi\pi^*$  del grupo C=C.<sup>5</sup>

### 1.1.1 Fotocicloaddición [2+2] enona-alqueno. Formación de ciclobutanos

La fotocicloaddición [2+2] entre alquenos es una de las reacciones más estudiadas en fotoquímica y se puede producir tanto desde un estado excitado singlete,  $S_1$  ( $\pi\pi^*$ ), como triplete,  $T_1$  ( $\pi\pi^*$ ). No obstante, hay que tener presente que el tiempo de vida del  $S_1$  es muy corto y el CES es ineficiente, así, las fotocicloaddiciones desde este estado excitado se espera que sean estereoespecíficas. En el caso de que la reacción se dé desde el estado excitado triplete, (mucho más reactivo y con un tiempo de vida más largo que el  $S_1$ ) se espera que la fotocicloaddición sea no estereoespecífica ya que puede estar involucrado un intermedio BR.<sup>5</sup>

En enonas la formación del dímero ciclobutano se da desde el  $T_1$ , bien a través de un rápido CES vía la formación de BR 1,4, bien a partir de un proceso de transferencia de energía entre tripletes (TETT).

En relación a la regioselectividad, dependiendo de la orientación de los sustituyentes en el alqueno y en el grupo carbonilo de la enona, la reacción dará lugar al isómero cabeza-cabeza o al cabeza-cola. La formación del primer regioisómero se favorece cuando el alqueno posee algún sustituyente electrón-atrayente (Fig. 1.2).<sup>6</sup>



**Fig. 1.2:** Ejemplo de obtención de regioisómeros según las propiedades electrónicas de los sustituyentes del alqueno involucrado en la fotocicloaddición [2+2].

La regioselectividad de la fotocicloaddición también depende de factores estéricos y de la evolución del birradical.<sup>5,7</sup>

### 1.1.2 Reacción de Paternò-Büchi

El grupo carbonilo puede reaccionar con alquenos para dar lugar a oxetanos a través de la reacción de Paternò-Büchi. El mecanismo a través del cual se produce es el siguiente: tras la absorción de luz por el grupo carbonilo, se alcanza su  $S_1$ , que mediante un CES puede poblar su estado  $T_1$  ( $n\pi^*$ ). La molécula excitada puede reaccionar desde ambos estados con un alqueno, dando lugar a un BR como especie intermedia que finalmente origina el oxetano (Fig. 1.3).<sup>6,8</sup>

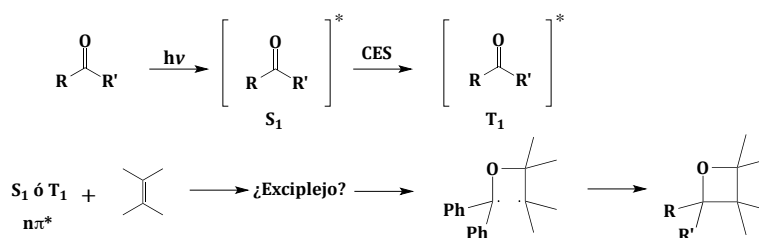
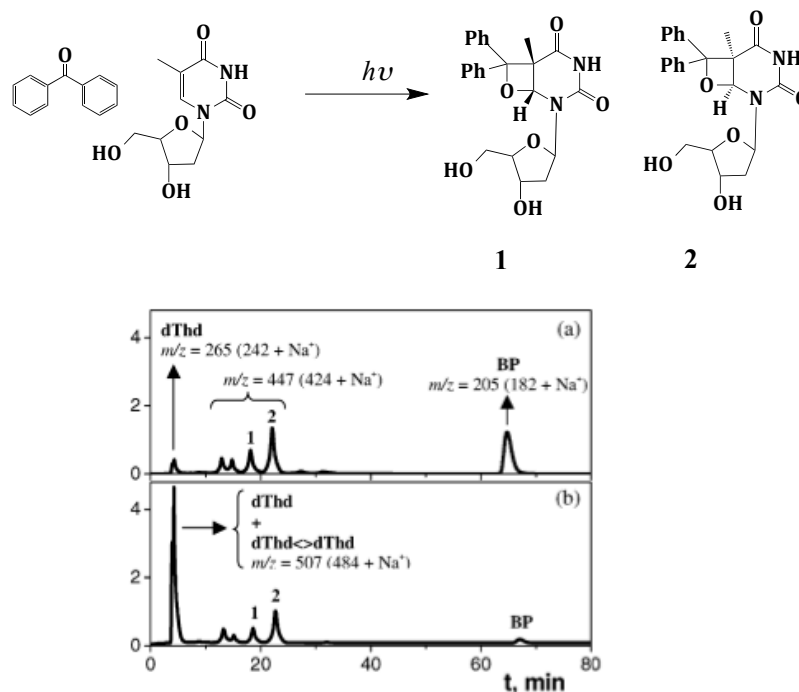


Fig. 1.3: Mecanismo involucrado en la reacción Paternò-Büchi.

Cuando la reacción se origina desde el estado  $S_1^*$  se espera que sea estereoespecífica, ya que se ha mostrado que la configuración relativa del alqueno se conserva durante la fotocicloaddición.<sup>5,9</sup> Sin embargo, en el caso de que el estado  $T_1^*$  esté involucrado, la regio- y estereoselectividad vienen influenciadas por el BR 1,4 formado.<sup>5-6</sup> Finalmente, la estereoselectividad de la reacción también aumenta con la concentración del alqueno.<sup>5</sup>

Asimismo, puede existir una competición entre la reacción de Paternò-Büchi y el proceso de TE que da lugar a dímeros ciclobutánicos. Por ejemplo, tras irradiar benzofenona (BP) en presencia de timidina (Tmd) en proporción molar 2:1, BP:Tmd, se obtiene una mezcla de los oxetanos **1** y **2** (Fig. 1.4 superior). Sin embargo, cuando la irradiación se lleva a cabo en proporción molar 1:3 (BP:Tmd) además se forman dímeros ciclobutánicos, según se observa en el espectro de HPLC- MS registrado en la Fig 1.4.<sup>5,10</sup>



**Fig. 1.4:** Superior: Esquema de obtención de los oxetanos **1** y **2** tras irradiación de BP y timidina. Inferior: Cromatograma registrado a 210 nm tras el análisis por HPLC-MS de las mezclas de reacción obtenidas al irradiar BP en presencia de timidina en proporción molar (a) 2:1 y (b) 1:3.

### 1.1.3 Reacción de Norrish tipo II: reacción de Norrish-Yang

La reacción Norrish tipo II es un buen ejemplo de abstracción de hidrógeno intramolecular en la que está involucrada la formación de un BR. En particular, esta reacción consiste en la abstracción de hidrógenos en posición gamma con respecto al carbonilo excitado, originando un BR 1,4. Éste, a su vez puede experimentar procesos secundarios (Fig. 1.5). Cuando el BR 1,4 se cicla para formar un ciclobutanol la reacción es conocida como de Norrish-Yang.<sup>5,11</sup> La eficiencia de la ciclación depende de la estructura del birradical; por eso, ésta puede competir con otras reacciones como la eliminación Norrish II<sup>12-13</sup> o un proceso de desalquilación.<sup>14</sup>

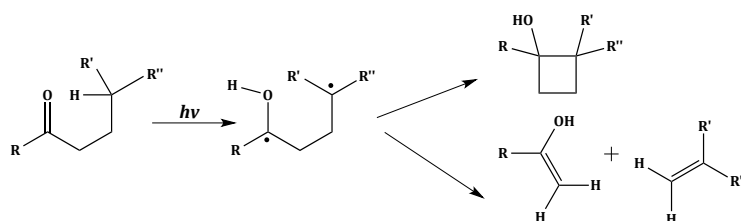


Fig. 1.5: Representación esquemática de la reacción Norrish tipo II.

## 1.2 Daño fotoquímico al ADN

### 1.2.1 La luz solar como arma de doble filo para la salud: beneficiosa y dañina

La luz solar es un factor esencial para la vida en la tierra y juega un papel importante en la salud. El espectro solar comprende tres regiones: ultravioleta (UV, 200-400 nm), visible (Vis, 400-700 nm) e infrarroja (IR, 700-2500 nm). Entre ellas, la radiación solar UV es la componente más energética y a su vez se divide en tres subregiones: UVA (400-320 nm), UVB (320-290 nm) y UVC (290-200 nm), siendo esta última completamente filtrada por la atmósfera. Por otra parte, y aunque solo un 10% de la radiación UVB llega a la superficie terrestre, las biomoléculas la absorben. Por el contrario, la radiación UVA, que es la de menor energía, representa el 95% de la radiación UV total que llega a la superficie terrestre.<sup>15</sup> Ésta no es absorbida directamente por las biomacromoléculas pero puede formar parte en reacciones de interés biológico a través de reacciones de fotosensibilización.<sup>16</sup>

Dos ejemplos del beneficio de la luz solar en humanos son la producción de vitamina D, y su uso en terapia fotodinámica. En el primer ejemplo, la radiación UVB es imprescindible para la producción de vitamina D por el cuerpo. Ésta tiene numerosos efectos positivos para nuestro sistema inmunológico ya que ayuda a mantener los niveles de calcio y fósforo adecuados y estimula la aparición de péptidos antimicrobianos en la piel.<sup>17</sup> Una deficiencia en vitamina D puede causar retraso en el crecimiento y raquitismo en niños, además de osteoporosis en personas adultas.<sup>17-18</sup> La terapia fotodinámica es una técnica

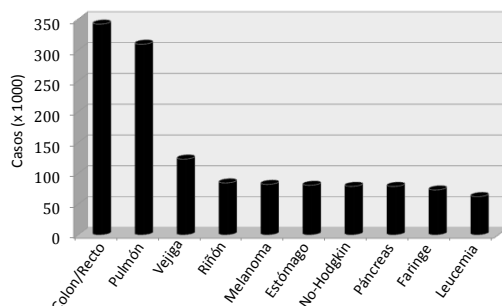


que usa luz visible. Consiste en el uso de una molécula (fotosensibilizador) que absorbe a una longitud de onda particular con el objetivo de destruir tumores en el cuerpo mediante la producción de oxígeno singlete.<sup>19</sup> Algunos de los fotosensibilizadores usados son los derivados de ácido aminolevulínico y porfirinas.<sup>19-21</sup> Por último, la contribución al bienestar, el aporte de calor y los efectos psicológicos son otros de los efectos saludables de la luz solar.

Sin embargo, la luz solar también puede ser dañina para nuestra salud. La genotoxicidad, la fototoxicidad, la fotoalergia y el envejecimiento de la piel son reacciones patológicas, en las que, en concreto la región UV, está implicada. En términos generales, la *fotogenotoxicidad* se define como la propiedad que poseen las moléculas para producir daño en la información genética de la célula tras absorber luz UV.<sup>22-23</sup> En este contexto, cabe destacar que la radiación UVB se considera genotóxica porque es capaz de inducir la formación de lesiones en el ADN.<sup>24-25</sup> Por otra parte, la *fototoxicidad* es el resultado del daño causado por un mecanismo inflamatorio no inmunológico iniciado por un agente (exógeno o endógeno) tras su irradiación.<sup>26</sup> En cambio, la *fotoalergia* se define como la respuesta a la hipersensibilidad causada por la fotoactividad de un agente exógeno tras absorber luz.<sup>26</sup> Por último, y en relación al *envejecimiento de la piel*, las consecuencias suelen ser visibles: un incremento de arrugas, flacidez y laxitud.<sup>18</sup>

### **1.2.2 Radiación ultravioleta y cáncer de piel**

La relación entre la luz UV y el cáncer de piel está bien establecida <sup>15,18</sup> y su incidencia continua aumentando año tras año. Por ejemplo desde 1975 en Europa ha habido un gran aumento del número de casos de melanoma, uno de los tipos de cáncer más agresivos, siendo el quinto más comúnmente diagnosticado (Fig. 1.6). En 2012 más de 82 000 nuevos casos fueron identificados de los cuales un 20 % fueron mortales.<sup>27</sup>



**Fig. 1.6:** Número de casos registrados en 2012 según el tipo de cáncer.

A este problema también contribuye el uso de las cabinas solares como fuentes de exposición UV, especialmente entre mujeres jóvenes en países desarrollados del primer mundo. Estas cabinas emiten en la región del UVA, pero también lo hacen marginalmente en la UVB. En 2009 la IARC (Agency for Research of Cancer) las declaró como carcinógenas para los humanos, ya que se ha demostrado que aumentan en un 75% el riesgo de sufrir cáncer de piel cuando son usadas por personas menores de 30 años.<sup>28-30</sup>

### **1.2.3 Modificaciones en el ADN originadas por radiación ultravioleta**

La luz UV puede modificar la estructura química del ADN provocando lesiones en las bases que lo conforman. El daño producido tras absorción directa de luz conduce principalmente a dímeros pirimidínicos. Estos incluyen *dímeros ciclobutánicos* (DCBs), resultantes de una fotocicloaddición [2+2] entre una pirimidina (Pir) en estado excitado y otra adyacente a ella en estado fundamental y *fotoproductos (6,4)* (6,4 PPs), que resultan de una reacción Paternò-Büchi entre el grupo carbonilo (o imino) en C4 de una Pir y el doble enlace de otra, tras la apertura del oxetano intermedio formado. Estas lesiones (Fig. 1.7) constituyen el 70-80% y el 20-30%, respectivamente del total de productos obtenidos por radiación directa del ADN.<sup>16</sup> Los 6,4 PPs a su vez, absorben luz UVB pudiendo ser convertidos en sus isómeros Dewar por electrociclación del anillo de pirimidona (Fig. 1.7).<sup>31</sup>

Aunque la luz UVA no es absorbida por el ADN, ésta puede causar también lesiones en la biomacromolécula tras excitar cromóforos presentes en el medio. Una vez excitados, pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) o bien fotosensibilizar la formación de tripletes de las nucleobases, generalmente la timina por ser la de menor  $E_T$ , para acabar generando DCBs. (Fig. 1.7).<sup>30-32</sup>

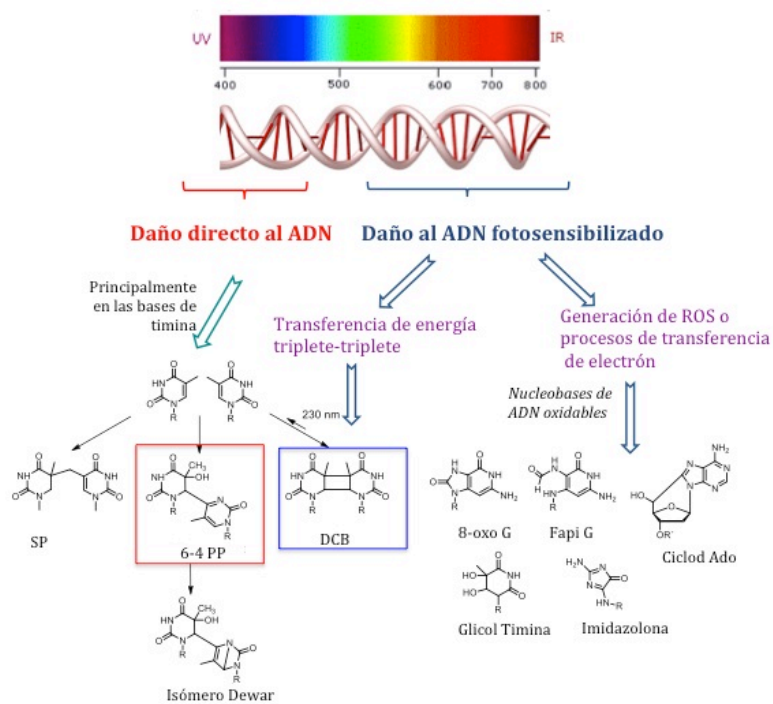


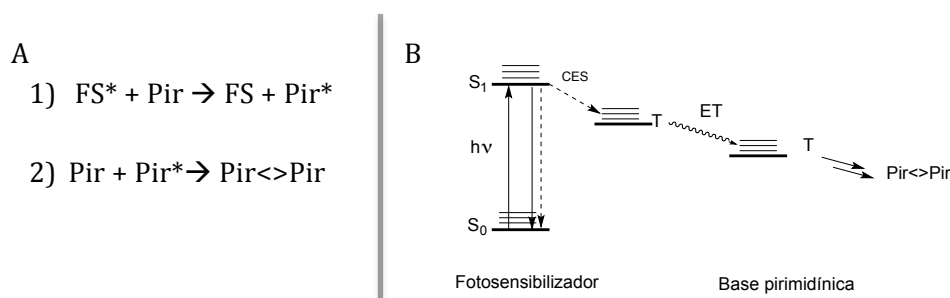
Fig. 1.7: Fotoproductos en el ADN según el tipo de radiación ultravioleta.

## 1.2.4 Formación fotosensibilizada de los dímeros ciclobutánicos

### 1.2.4.1 Propiedades del fotosensibilizador

Para que tenga lugar una transferencia de energía entre un fotosensibilizador en estado triplete y una base pirimidínica, se deben cumplir una serie de requisitos (Fig. 1.8):<sup>30</sup>

- Debe absorber luz a una longitud de onda más larga que las Pir, permitiendo así una excitación selectiva.
- Tiene que presentar una energía triplete por encima de la Pir, para que el proceso sea termodinámicamente favorable.
- Tiene que ser químicamente inerte en las condiciones de reacción para evitar la formación de subproductos y el consumo del FS.
- Tiene que tener un buen rendimiento de cruce entre sistemas ( $\phi_{CES}$ ) y un tiempo de vida largo para aumentar la probabilidad de la TETT al aceptor.
- Debe situarse lo suficientemente cerca de la Pir para facilitar la colisión.



**Fig. 1.8:** A) Procesos involucrados en la dimerización fotosensibilizada de Pir. B) Interconversión entre los estados excitados durante el proceso de fotodimerización de Pir.

Entre los fotosensibilizadores conocidos capaces de fotoinducir los DCBs en las nucleobases o nucleótidos se incluyen los antiinflamatorios no esteroideos,

los piridopsoralenos y las fluoroquinolonas, las cetonas o los agentes cosméticos como el ácido para-aminobenzoico (Fig. 1.9).<sup>30</sup>

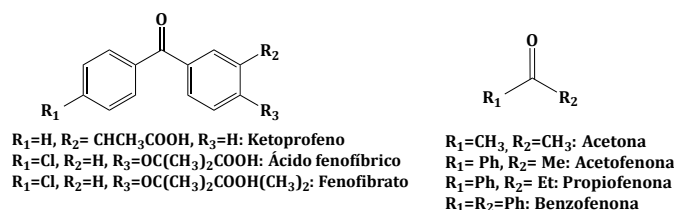


Fig. 1.9: Ejemplos de fotosensibilizadores para la dimerización de bases pirimidínicas

#### 1.2.4.2 Eficiencia de la dimerización fotosensibilizada de pirimidinas

En el proceso de TETT, la constante de velocidad de TE ( $k_{TE}$ ) entre el fotosensibilizador (dador) y la Pir (aceptor) depende del incremento de energía ( $\Delta E$ ) entre sus estados excitados, como muestra la ecuación de Sandros:

$$k_{ET} = k_D \frac{1}{(e^{-\frac{\Delta E}{RT}} + 1)} \quad (1.1)$$

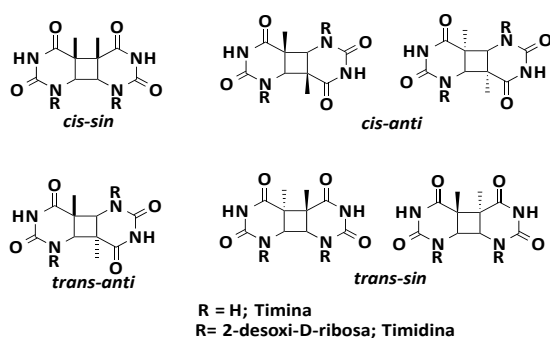
Donde  $k_D$  es la constante de difusión en disolución.<sup>33</sup>

En este contexto, un valor de  $\Delta E$  favorable está directamente relacionado con la formación de DCBs y por lo tanto con la capacidad fototumorigénica del agente exógeno o endógeno que ejerce como fotosensibilizador. Por ello, es importante conocer las energías de los estados excitados triplete de dador y aceptor, de manera que se pueda anticipar el potencial de un FS para actuar como agente fototumorigénico.

Además del  $\Delta E$  y la temperatura,<sup>34</sup> la formación de los fotoproductos y su distribución vienen influenciadas por parámetros como la naturaleza del estado triplete más bajo del FS,<sup>10</sup> el disolvente,<sup>35</sup> o la concentración de Pir presente, etc.<sup>30</sup>

### 1.2.4.3 Fotoproductos pirimidínicos en el ADN

En principio, los dímeros de timina y citosina (T<>T, C<>T y C<>C) pueden ser formados por fotosensibilización de oligonucleótidos conteniendo los monómeros apropiados. En la Fig. 1.10 se presentan los diferentes regio- y diastereoisómeros que pueden ser obtenidos en disolución para el caso de la timina o timidina.<sup>36</sup> Cabe remarcar que los isómeros *cis-anti* y *trans-anti* existen como pares enantioméricos en la timina y como pares diastereoméricos en la timidina. Por ello, en el caso del nucleósido pueden ser obtenidos un total de 6 homodímeros diastereómeros, en comparación con 4 en el caso de las bases libres.<sup>36-37</sup>



**Fig. 1.10:** Estructura de todos los posibles homodímeros formados tras fotosensibilización UVA de timina y timidina.

### 1.2.4.4 Fotosensibilización de timina y timidina

La irradiación de una disolución acuosa de timina (o timidina) en presencia de acetona, propiofenona, acetofenona da lugar a una mezcla de isómeros, entre los cuales prevalecen los *trans-anti*.<sup>38-41</sup> No obstante, la distribución de los productos puede verse influenciada por la polaridad del disolvente. Por ejemplo, la fotosensibilización de 1,3-dimetiltimina por BP da lugar a la formación del isómero *cis-sin* como fotoproducto mayoritario en disolventes polares, mientras que en no polares predomina el *cis-anti*.<sup>35,42</sup>

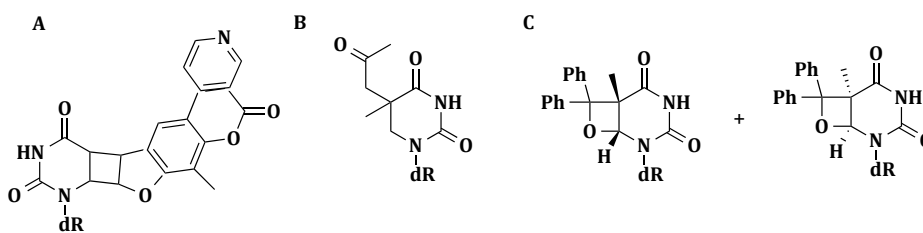
#### 1.2.4.4.1 Subproductos de la fotorreacción de fotosensibilizadores con timina

Como se ha expuesto, un fotosensibilizador debería ser químicamente inerte. No obstante, pueden ocurrir reacciones secundarias que dan lugar a resultados engañosos, como la formación de subproductos no deseados, en el caso de las cetonas o ciertos piridopsoralenos.

Por ejemplo, los piridopsoralenos presentan un doble enlace en el anillo furánico capaz de reaccionar a través de una fotocicloaddición cruzada [2+2] con el doble enlace en C5-C6 de Pir (Fig. 1.11A). Así, al fotosensibilizar Pir en presencia de piridopsoralenos se observa este tipo de fotocicloaddición además de formación de DCBs.<sup>30</sup>

Análogamente, tras irradiar acetona en presencia de timidina, junto a los DCBs esperados también se aísla un derivado acetónico con rendimiento bajo (Fig. 1.11B).<sup>36</sup>

Por otro lado, algunos compuestos carbonílicos pueden reaccionar con alquenos para formar oxetanos a través de una fotorreacción de Paternò-Büchi. En el caso de la BP (Fig. 1.11C), esta reacción se ve muy favorecida frente a la de fotoaddición [2+2].<sup>10</sup> De hecho, los DCBs de timidina se obtienen solo cuando la base está presente a elevadas concentraciones.<sup>10,43</sup> Además, la BP puede fotosensibilizar la oxidación de timidina.<sup>41,43</sup>



**Fig. 1.11:** Estructuras de subproductos obtenidos tras la fotosensibilización de timidina usando A) piridopsoralenos, B) acetona o C) benzofenona.

#### 1.2.4.5 Fotosensibilización de oligonucleótidos

La formación fotosensibilizada de DCBs ha sido observada en oligonucleótidos y en ADN de cadena simple (ss-ADN). Los dímeros *cis-sin* son favorecidos debido a las restricciones en orientación impuestas por el enlace glicosídico-fosfodiéster,<sup>37,41,44-49</sup> aunque los *trans-sin* también se pueden formar debido a la flexibilidad en la estructura de oligonucleótidos y ss-ADN.<sup>44,50</sup>

Asimismo, la conformación tiene un efecto pronunciado en la formación de DCBs a través del apilamiento entre las bases. De hecho la eficiencia de la dimerización es menor tras la desnaturalización.<sup>51-53</sup>

Por otra parte, la secuencia de las nucleobases también influye en la dimerización.<sup>54</sup> La frecuencia de DCBs aumenta en secuencias que contienen tres unidades Pir consecutivas.<sup>44,55-58</sup> Así, los estudios realizados combinando <sup>32</sup>P radiomarcado y electroforesis con enzimas reparadoras específicas de ADN han determinado que la formación de DCBs de timina en el oligonucleótido 5'-TGA GCG TTA GTT TAA GTC GGT TATC-3' ocurre más frecuentemente en los fragmentos TTT.<sup>30</sup>

#### 1.2.4.6 Fotosensibilización en el ADN

Mientras que la fotosensibilización del ADN origina exclusivamente DCBs, la radiación directa UVB produce además 6,4PPs.<sup>59</sup> Esto sugiere que existen dos mecanismos distintos involucrados en la formación de estas lesiones.

Al igual que en oligonucleótidos, la fotosensibilización de ADN conduce a la formación de DCBs, con gran predominio de los que contienen dos timinas. En cualquier caso se obtiene exclusivamente el isómero *cis-sin* debido a restricciones geométricas impuestas por la doble hélice.<sup>30</sup>

En la tabla 1.1 se presentan los rendimientos relativos de estas lesiones en el ADN. Como se observa, los de timina son siempre mayoritarios cuando se emplean acetona, BP y acetofenona como fotosensibilizadores.<sup>44,60-62</sup>



**Tabla 1.1:** Rendimientos relativos de formación de los DCBs tras irradiación de distintos tipos de ADN en presencia de cetonas.

	BP <sup>a</sup>		Acetofenona <sup>a,b,c,d,e</sup>				Acetona <sup>e,f</sup>	
	a	a	b	c	d	e	e	f
T<>T	0.2	1	1	1	1	0.65	1	1
T<>C	0.046	0.24	0.05	0.19	0.03	n.d <sup>g</sup>	0.12	0.20
C<>T	0.05	0.23						0.36
C<>C	n.d <sup>g</sup>	n.d <sup>g</sup>	n.d <sup>g</sup>	n.d <sup>g</sup>	<0.003	n.d <sup>g</sup>	0.05	0.08

<sup>a</sup> ADN de salmón;<sup>60</sup> <sup>b</sup> ADN nativo;<sup>52</sup> <sup>c</sup> ADN desnaturalizado;<sup>52</sup> <sup>d</sup> ADN E.coli;<sup>63</sup> <sup>e</sup> Phage T7;<sup>64</sup> <sup>f</sup> Colipage M13 mp2;<sup>44</sup> <sup>g</sup> n.d: no determinado. Para cada tipo de ADN la cantidad máxima de T<>T se ha establecido como 1 para comparar.

Al igual que en oligonucleótidos, la formación de DCBs de timina en el ADN depende de la secuencia de las bases.<sup>44-45,57</sup> Por ejemplo, la cantidad de dímeros entre dos citosinas varía sustancialmente en experimentos de fotosensibilización con acetona llevados a cabo con distintos tipos de ADN. Así, con ADN bacteriológico *micrococcus luteus*, más rico en citosinas que el ADN de timo de ternero, aumentan los rendimientos de formación de dímeros de C<>C y C<>T. No obstante el estudio apunta a que la abundancia de citosina no sería el único parámetro influyente en este resultado.<sup>65</sup>

Las técnicas de marcado y electroforesis (comet assay) también se han usado para revelar el daño al ADN celular.<sup>66-67</sup> Ambos métodos pueden ser combinados con enzimas reparadoras específicas para revelar el tipo de daño producido.<sup>30</sup>

### 1.3 Cálculos teóricos

A pesar de la importancia de las lesiones fotoinducidas en el ADN, solo recientemente se han analizado los estados excitados Pir mediante estudios teóricos.<sup>68-82</sup> Está bien establecido que la naturaleza del estado excitado triplete más bajo de las Pir es  $\pi\pi^*$ , en cambio su energía estimada depende del tipo

de método utilizado para realizar el cálculo y la optimización geométrica. El valor obtenido en concordancia con los datos experimentales ha sido el basado en el método CASPT2. Sin embargo, debido a las dificultades para aplicar esta metodología en moléculas grandes, se han realizado cálculos mediante la teoría del funcional de densidad (DFT) o mediante aproximaciones del método de agregados acoplados (CC). La nucleobase con menor energía de triplete es la timina, mientras que la de mayor energía de triplete es la citosina.<sup>75</sup>

En este contexto, la energía de excitación vertical de timina en la geometría del estado fundamental está situada entre 336.7 y 382.1 kJ/mol (3.49 eV y 3.96 eV), mientras que los valores de la energía de excitación adiabática se encuentran entre 272.1 y 304.9 kJ/mol (desde 2.82 a 3.16 eV).<sup>30</sup>

En general, los estudios computacionales se realizan a vacío, es decir sin tener en cuenta las interacciones entre las moléculas y el disolvente. Sin embargo, está bien establecido que dichas interacciones pueden tener una gran influencia en la energía del estado excitado. El efecto combinado de la hidratación y la polaridad del disolvente solo ha revelado una ligera desestabilización del estado triplete  $\pi\pi^*$  en uracilo y timina.<sup>74,83</sup>

## 1.4 Fotofísica

### 1.4.1 Emisión

La timina y sus derivados exhiben una emisión de fosforescencia que depende del pH. A 77 K y en condiciones neutras, no se observa señal alguna en disoluciones acuosas diluidas.<sup>84-86</sup> En cambio, a pH mayor que su  $pK_a$  (c.a 9.6),<sup>87</sup> la nucleobase en su forma aniónica emite a 445 nm con un tiempo de vida de 0.4-0.5 s.<sup>84,88-89</sup> A pH neutro y a elevadas concentraciones (p.ej.  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  M), la formación de agregados da lugar a una emisión de fosforescencia a 470 nm con un tiempo de vida de 0.2 s (Tabla 1.2).<sup>87,90</sup>

**Tabla 1.2:** Propiedades de emisión de fosforescencia de pirimidinas, oligonucleótidos y ADN a 77 K. Si no se especifica los valores corresponden a etilenglicol/ H<sub>2</sub>O a pH neutro.

	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\tau$ (s)	$\phi_{em}$
Timina	470 <sup>88,92</sup>	0.5 <sup>94</sup>	<0.008 <sup>95</sup>
	460 <sup>a,93</sup>	0.075 <sup>a,96</sup>	0.006 <sup>94</sup> 0.018-0.015 <sup>a,96</sup>
Timidina	470 <sup>b,92</sup>	0.21 <sup>b,92</sup>	<0.015 <sup>95</sup>
	460 <sup>a,93</sup>	$\leq 0.5$ <sup>c,95</sup>	0.006 <sup>94</sup>
	450 <sup>d,97</sup>	0.6 <sup>d,7</sup>	0.038-0.042 <sup>a,96</sup>
TMF	440 <sup>90-91</sup>	0.3 <sup>90,91</sup>	0.008 <sup>94</sup>
		$\leq 0.4$ <sup>95</sup>	$\leq 0.01$ <sup>95</sup>
citosina	430 <sup>e,97</sup>	0.8 <sup>95</sup>	0.006 <sup>95</sup>
citidina	435 <sup>b,92</sup>	0.6 <sup>b,98</sup>	0.009 <sup>95</sup>
Citosina mono-fosfato		0.34 <sup>91</sup>	0.01 <sup>91</sup>
ADN	448 <sup>89</sup>	0.3 <sup>8,89</sup>	0.002 <sup>85,89</sup>
	450 <sup>d,97</sup>	0.5 <sup>d,97</sup>	$\leq 0.02$ <sup>95</sup>

<sup>a</sup> 2-Metilfurano. <sup>b</sup> en H<sub>2</sub>O pH 7. <sup>c</sup> en etanol. <sup>d</sup> 0.25% glucosa en 0.1M acetato de sodio-H<sub>2</sub>O. <sup>e</sup> iso-propanol/isopentano. <sup>f</sup> H<sub>2</sub>O/propilenglicol 1/1. <sup>g</sup> H<sub>2</sub>O. <sup>h</sup> metanol/H<sub>2</sub>O 1/9 pH 7.

Además, a partir de los espectros de fosforescencia se han determinado las energías del estado triplete de las bases del ADN. Tal y como se muestra en la Fig. 1.12, la timina y la citosina son las nucleobases con la energía más baja y más alta, respectivamente.

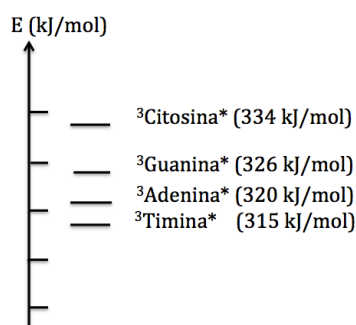


Fig. 1.12: Energías de las bases del ADN determinadas a 77 K en etilenglicol/H<sub>2</sub>O.

## 1.4.2 Fotólisis de destello láser

### 1.4.2.1 Población intrínseca del estado excitado triplete tras excitación directa de las bases pirimidínicas

Se han usado técnicas de tiempo resuelto para estudiar las propiedades fotofísicas de los estados excitados singlete y triplete de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos.<sup>97,99-109</sup> En este contexto, está generalmente aceptado que el mecanismo involucrado en la generación de DCBs por excitación directa de timina se inicia poblando el estado singlete  $\pi\pi^*$ ;<sup>105-106,108</sup> sin embargo, se sigue discutiendo sobre la naturaleza de los pasos siguientes. Estudios recientes realizados con Tmd y (T)<sub>20</sub> mediante fluorescencia ultrarrápida y espectroscopía de absorción transitoria, sugieren que el estado  $^3\pi\pi^*$  es clave en el proceso de dimerización.<sup>30</sup> Los espectros de absorción transitoria registrados en escala de femto-pico segundos son similares en ambos casos, presentando dos máximos entre 350-400 nm, asignados a las transiciones triplete-triplete.<sup>103,108-109</sup> También se ha estimado un  $\phi_{CES}$  en disolución acuosa en el rango entre 0.01-0.03, mayor para (T)<sub>20</sub> que para Tmd. La principal diferencia observada entre ambas moléculas ha sido su tiempo de vida de triplete ( $\tau_T$ ). Para (T)<sub>20</sub> el valor de  $\tau_T$  determinado es de subnanosegundos, mientras

que  $^3\text{Tmd}^*$  sobrevive en la escala de ns- $\mu\text{s}$ , con un tiempo de vida que depende de su concentración.<sup>30</sup>

En la tabla 1.3 se presenta una selección de parámetros fotofísicos establecidos para el estado excitado triplete de timina y algunos de sus derivados. Entre ellos se incluye el coeficiente de absorción molar de triplete ( $\epsilon_T$ ). Los datos indican que la formación del estado excitado triplete ocurre en todos los casos tras irradiación directa con UV. A pesar de la relevancia biológica, la eficiencia de este proceso es baja, particularmente en medio acuoso.<sup>30</sup>

Como se ha mencionado anteriormente, la desactivación del triplete por estados fundamentales está asociada a la dimerización de pirimidinas. Su constante de velocidad, presentada en la tabla, ha sido calculada según la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = k_0 + k_s[S_0] \quad (1.2)$$

En la que  $k_0$  y  $k_s$  corresponden a las constantes de desaparición y autodesactivación del sustrato, respectivamente.

**Tabla 1.3:** Propiedades fotofísicas del estado excitado triplete de la timina y sus derivados en distintos disolventes.

	Disolvente	$\epsilon_T$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) a 370 nm <sup>108,110</sup>	$\phi_{CES}/10^{-2}$ <sub>108,110</sub>	$k_0$ ( $\text{s}^{-1}$ )/ $10^5$ <sub>103,110</sub>	$k_s$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )/ $10^8$ <sub>103,110</sub>
Timina	Acetonitrilo	2700	6.0	0.7-2.2	5.3-7.0
	Agua	3500	0.6	0.2	7.9
Timidina	Acetonitrilo	3600	6.9		
	Agua	3600	1.4	0.4	1.0-1.9
TMF	Etanol	4000	5.5		2.0
	Agua	3500	0.8-1.5	0.4	0.2
(T) <sub>20</sub>	Agua	2700	2.8		100 <sup>a</sup>

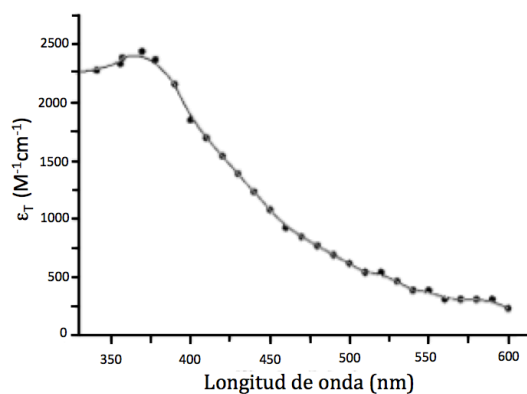
<sup>a</sup> constante de velocidad en  $\text{s}^{-1}$

A diferencia de los derivados de timina, los estados excitados de citosina no se han observado tras irradiación directa. Esto se puede atribuir a sus bajos  $\phi_{CES}$  y coeficiente de absorción molar.<sup>100</sup>

#### 1.4.2.2 Generación fotosensibilizada de los tripletes de las bases pirimidínicas y sus derivados

Se han realizado un gran número de estudios de reacciones fotosensibilizadas de bases pirimidínicas, usando técnicas de tiempo resuelto. En ellos se ha demostrado que la dimerización de timinas y citosinas transcurre vía el estado excitado triplete, usando como fotosensibilizadores la acetona, acetofenona o propiofenona.<sup>99-103,111</sup> En particular, la acetona es ventajosa sobre otros FS en estudios cinéticos debido a que i) presenta una  $E_T$  elevada (330 kJ/mol) y puede por tanto sensibilizar tanto a la base de timina como la de citosina. ii) Su  $\phi_{CES}$  es cercano a la unidad, dos órdenes de magnitud superior a los descritos para los derivados de Pir, y iii) su banda de absorción triplete-triplete no interfiere en la señal del estado excitado triplete de las Pir a 400 nm (Fig. 1.13).<sup>100,103</sup>

La diferencia de energía relativa entre el FS y la Pir es un dato clave para predecir si la TE puede ocurrir. Para una TE irreversible, la energía de triplete del dador debe ser al menos de 12 kJ/mol superior a la del aceptor.<sup>102</sup> En este contexto, la interacción entre una variedad de tripletes de cetonas y mononucleótidos se ha estudiado en función de las energías relativas del par FS-nucleótido. Mientras que cetonas con  $E_T$  superior a 305 kJ/mol sensibilizan la generación de la absorción transitoria correspondiente al estado excitado triplete de la timidina monofosfato ( ${}^3\text{TMF}^*$ ), aquellas con  $E_T < 305$  kJ/mol no exhiben ninguna capacidad de fotosensibilización, a pesar de las desactivaciones observadas experimentalmente ( $k_q > 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>101</sup>



**Fig. 1.13:** Espectro de absorción transitoria del triplete excitado de TMF obtenido por transferencia de energía con acetona en disolución acuosa.<sup>102</sup>

Por otra parte, BP y sus derivados, con  $E_T = 290$  kJ/mol, menor a la de  ${}^3\text{TMF}^*$ , solo fotosensibilizan la formación de DCBs a elevadas concentraciones de nucleósidos, compitiendo con la reacción más favorable, la fotocicloadición de Paternò-Büchi.<sup>10</sup>

En ADN, la energía de triplete requerida para la formación de DCBs de Pir ha sido reevaluada desde 300 kJ/mol (metoxiacetofenonas)<sup>101</sup> a 290 kJ/mol (derivados BP)<sup>10,41,46,56</sup> y más recientemente hasta 267 kJ/mol (fluoroquinolonas).<sup>111-112</sup>

Por último, los estados excitados triplete de citosina son difíciles de detectar cuando están presentes otros tipos de bases pirimidínicas debido a que su energía de triplete es más alta que la de timina. Aún así, el espectro de absorción transitoria se ha obtenido usando acetona como FS.<sup>100</sup>

## 1.5 Referencias

1. *Química Orgánica*; Ed. Reverte S.A; Allinger, N.; Jhonson, C.; Label, N.; España, **1986**.
2. Young, C.; *Occupational. Medicine.*; **2009**, 59, 82.
3. *Essentials of molecular Photochemistry*; Blackwell Scientific publications Baggott; Gilbert, A.; Baggott, J., **1991**.
4. Jablonski, A. Z.; *Phys.*; **1935**, 94, 38.
5. *Modern Molecular Photochemistry of organic molecules*; University Science Books: Herndon VA; Turro N. J.; Ramamurthy V.; Scaiano J. C; **2010**.
6. Bach, T.; *Synthesis.*; **1998**, 3, 683.
7. Schuster, D. I.; Lem, G.; Kaprinidis, N. A.; *Chem. Rev.*; **1993**, 93, 3.
8. *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice*; Ed. Willey; Klán, P.; Wirz, J., **2009**.
9. Turro, N. J.; Wriede, P. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1970**, 92, 320.
10. Encinas, S.; Belmadoui, N.; Climent, M. J.; Gil, S.; Miranda, M. A.; *Chem. Res. Toxicol.*; **2004**, 17, 857.
11. Hoffmann N.; *Chem. Rev.*; **2008**, 108, 152.
12. Jarugu, N. M.; Subhas, S.; Apruba, L. K.; Satyajit, S.; Werner, M. N.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2008**, 130, 13608.
13. Jarugu, N. M.; Apruba, L. K. S.; Nidhi, S.; Werner, M. N.; Eixhard, G. W.; *Chem. Eur. J.*; **2006**, 12, 8744.
14. Shugar, E. K. D.; *Science*; **1971**, 173, 3995.



15. Garibyan, L.; Fisher E. D.; *Curr Oncol Rep.*; **2010**, *12*, 319.
16. *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; Ed. CRC 2nd edition, Horspool; Chapter 140. Mitchell, D. L., **2004**.
17. Byrne, S.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2014**, *13*, 840.
18. Kammeyer, A.; Luiten, R. M.; *Ageing Res. Rev.*; **2015**, *21*, 16
19. Gilaberte, Y.; Serra.-Guillen, C.; de las Heras, M. E.; Ruiz-Rodríguez, R.; Fernández-Lorente, M.; Benvenuto-Andrade, C.; González-Rodríguez, S.; Guillén-Barona, C.; *Actas Dermosifiliogr.*; **2006**, *97*, 83.
20. Gederaas, O. A.; Lagerberg, J. W. M.; Brekke, O.-L.; Berg, K.; Bubbelman, T. M. A. R.; *Cancer Lett.*; **2000**, *159*, 23.
21. Berg, K.; Selvo, P. K.; Weyergang, A.; Dietze, A.; Prsmickaite, L.; Bonsted, A.; Engesaeter, B. Ø.; Angekk-Petersen, E.; Warloe, T.; Frandsen, N.; Høgset, A.; *J. Microsc.*; **2005**, *218*, 133.
22. Ibuki, Y.; *Genes Environ.*; **2014**, *36*, 111.
23. Arimoto-Kobayashi, S.; *Genes Environ.*; **2014**, *36*, 103.
24. Cadet, J.; Courdavault, S.; Ravanat, J. L.; Douki, T.; *Pure Appl. Chem.*; **2005**, *77*, 947.
25. Douki, T.; *Expert Rev. Dermatol.*; **2010**, *5*, 649.
26. *Mechanism of Phototoxic and Photoallergic Reactions. Contact Dermatitis*; Ed. Springer; Chapter 6; Mang, R.; Helger, S.; Krutmann, J; Berlin, **2011**.
27. Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J. W. W.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F.; *Eur. J. Cancer*; **2013**, *49*, 1374.
28. *Lancet. Oncol.*; **2009**, *10*, 835.
29. T. Who, *Fact Sheet n° 287*, **2010**.

30. Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *Chem. Sci.*; **2011**, *2*, 1219.
31. Ravanat, J. L.; Douki, T.; Cadet, J.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **2001**, *63*, 88.
32. Cadet, J.; Mouret, S.; Ravanat, J.-L.; Douki, T.; *Photochem. Photobiol.*; **2012**, *88*, 1048.
33. Sandros, K.; *Acta Chem. Scand.*; **1964**, *18*, 2355.
34. Costalat, R.; Blais, J.; Ballini, J. P.; Moysan, A.; Cadet, J.; Chalvet, O.; Vigny, P.; *Photochem. Photobiol.*; **1990**, *51*, 255.
35. Morrison, H.; Kleopfer, R.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1968**, *90*, 5037.
36. Cadet, J.; Voituriez, L.; Hruska, F. E.; Kan, L.-S.; de Leeuw, F. A. A.; Altona, C.; *Can. J. Chem.*; **1985**, *63*, 2861.
37. Varghese, A.; *J. Photochem. Photobiol.*; **1972**, *15*, 113.
38. Von Wilucki, J.; Matthäus, H.; Krauch, C. H.; *Photochem. Photobiol.*; **1967**, *6*, 497.
39. Jennings, B. H.; Pastra, S.-C.; Wellington, J. L.; *Photochem. Photobiol.*; **1970**, *11*, 215-226.
40. Ben-Hur, E.; Elad, D.; Ben-Ishai, R.; *Biochim. Biophys. Acta.*; **1967**, *149*, 355.
41. Delatour, T.; Douki, T.; D'Ham, C.; Cadet, J.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **1998**, *44*, 191.
42. Kleopfer, R.; Morrison, H.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1972**, *94*, 255.
43. Belmadoui, N.; Encinas, S.; Climent, M. J.; Gil, S.; Miranda, M. A.; *Chem. Eur. J.*; **2006**, *12*, 553.

44. Umlas, M. E.; Frankling, W. A.; Chan, G. L.; Haseltine, W. A.; *Photochem. Photobiol.*; **1985**, *42*, 265.
45. Moysan, A.; Viari, A.; Vigny, P.; Voituriez, L.; Cadet, J.; Moustacchi, E.; Sage, E.; *Biochemistry.*; **1991**, *30*, 7080.
46. Liaubet-Vallet, V.; Encinas, S.; Miranda, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2005**, *127*, 12774.
47. Liu, F.-T.; Yang, N.C.; *Biochemistry.*; **1978**, *17*, 4885.
48. Mu, W.; Han, Q.; Luo, Z.; Wang, T.; *Anal. Biochem.*; **2006**, *353*, 117.
49. Kaneko, M.; Matsuyama, A.; Nagata, C.; *Nucleic Acids Res.*; **1979**, *6*, 177.
50. Longue, M. W.; Leonard, N.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1972**, *94*, 2842.
51. Lamola, A.; *Photochem. Photobiol.*; **1968**, *7*, 619.
52. Rahn, R. O.; Landry, L. C.; *Biochim. Biophys. Acta*; **1971**, *247*, 197.
53. Hosszu, J. L.; Rahn, R. O.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1967**, *29*, 327.
54. Setlow, R. B.; Carrier, W. L.; *J. Mol. Biol.*; **1966**, *17*, 237.
55. Lhiaubet, V.; Paillous, N.; Chouini-Lalanne, N.; *Photochem. Photobiol.*; **2001**, *74*, 670.
56. Lhiaubet-Vallet, V.; Trzcionka, J.; Encinas, S.; Miranda, M. A.; Chouini-Lalanne, N.; *J. Phys. Chem. B.*; **2004**, *108*, 14148.
57. Bourre, F.; Renault, G.; Seawell, P. C.; Sarasin, A.; *Biochimie.*; **1985**, *67*, 293.
58. Trzcionka, J.; Liaubet-Vallet, V.; Chouini-Lalanne, N.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2004**, *3*, 226.
59. Perdiz, D.; Gróf, P.; Mezrima, M.; Nikaido, O.; Moustacchi, E.; Sage, E.; *J. Biol. Chem.*; **2000**, *275*, 26732.

60. Douki, T.; Reyaud-Angelin, A.; Cadet, J.; Sage E.; *Biochemistry*, **2003**, *42*, 9221.
61. Lamola, A.; *Pure Appl. Chem.*; **1970**, *24*, 599.
62. Lamola, A.; Yamane, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1967**, *58*, 443.
63. Meistrish, M. L.; Lamola, A. A.; *J. Mol. Biol.*; **1972**, *66*, 83.
64. Guillo, L. A.; Blais, J.; Vigny, P.; Spassky, A.; *Photochem. Photobiol.*; **1995**, *61*, 331.
65. Douki, T.; Bérard, I.; Wack, A.; Andrä, S.; *Chem. Eur. J.*; **2014**, *20*, 5787.
66. Marrot, L.; Belaidi, J. P.; Jones, C.; Perez, P.; Riou, L.; A., S.; Meunier, J. R.; *J. Invest. Dermatol.*; **2003**, *121*, 596.
67. Traynor, N. J.; Gibbs, N. K.; *Photochem. Photobiol.*; **1999**, *70*, 957.
68. González-Ramírez, I.; Climent, T.; Serrano-Pérez, J. J.; Gonzalez-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *Pure Appl. Chem.*; **2009**, *81*, 1695.
69. Gobbo, J. P.; Saurí, V.; Roca-San Juan, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C.; *J. Phys. Chem. B.*; **2012**, *116*, 4089.
70. Climent, T.; González-Ramírez, I.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *J. Phys. Chem. Lett.*; **2010**, *1*, 2072.
71. Nguyen, M. T.; Zhang, R.; Nam, P.-C.; Ceulemans, A. J.; *J. Phys. Chem. A.*; **2004**, *108*, 6554.
72. Etinski, M.; Fleig, T.; Marian, C. M.; *J. Phys. Chem. A.*; **2009**, *113*, 11809.
73. Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *J. Phys. Chem. B.*; **2007**, *111*, 11880.
74. Etinski, M.; Marian, C. M.; *Phys. Chem. Chem. Phys.*; **2010**, *12*, 4915.
75. Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2005**, *127*, 1820.

76. Zhang, R. B.; Eriksson, L. A.; *J. Phys. Chem. B.*; **2006**, *110*, 7556.
77. Roca-Sanjuán, D.; Olaso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2008**, *130*, 10768.
78. Abouaf, R.; Pommier, J.; Dunet, H.; Quan, P.; Nam, P. C.; Nguyen, M. T.; *J. Chem. Phys.*; **2004**, *121*, 11668.
79. González-Luque, R.; Climent, T.; González-Ramírez, I.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *J. Chem. Theory Comput.*; **2010**, *6*, 2103.
80. Fleig, T.; Knecht, S.; Hättig, C.; *J. Phys. Chem. A.*; **2007**, *111*, 5482.
81. Climent, T.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *Chem. Phys. Lett.*; **2007**, *441*, 327.
82. Rasmussen, A. M.; Lind, M. C.; Kim, S.; Schaefer, H. F.; *J. Chem. Theor. Comput.*; **2010**, *6*, 930.
83. Rahn, R. O.; Shulman, R. G.; Longworth, J. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1965**, *53*, 893.
84. Bersohn, R.; Isenberg, I.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1963**, *13*, 205.
85. Bersohn, R.; Isenberg, I.; *J. Chem. Phys.*; **1964**, *40*, 3175.
86. Hélène, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1966**, *22*, 237.
87. Rahn, R. O.; Shulman, R. G.; Longworth, J. W.; *J. Chem. Phys.*; **1966**, *45*, 2955.
88. Eisinger, J.; Shulman, R. G.; *Science.*; **1968**, *161*, 1311.
89. Lamola, A. A.; Gueron, M.; Yamane, T.; Eisinger, J.; Shulman, R. G.; *J. Chem. Phys.*; **1967**, *47*, 2210.
90. Hélène, C.; Montenay-Garestier, T.; *Chem. Phys. Lett.*; **1968**, *2*, 25.

91. Becker, R. S.; Shulman R. G.; *J. Mol. Biol.*; **1967**, *28*, 445.
92. Hønnas, P. I.; Steen, H. B.; *Photochem. Photobiol.*; **1970**, *11*, 67.
93. Görner, H.; *Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **1990**, *5*, 359.
94. Becker, R. S.; Kogan, G.; *Photochem. Photobiol.*; **1980**, *31*, 5.
95. Kleinwächter, V.; Drobnik, J.; Augenstein, L.; *Photochem. Photobiol.*; **1968**, *7*, 485.
96. Salet, C.; Bensasson, R.; Becker, R. S.; *Photochem. Photobiol.*; **1979**, *30*, 325.
97. Salet, C.; Bensasson, R.; *Photochem. Photobiol.*; **1975**, *22*, 231.
98. Hélène, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1966**, *22*, 237.
99. Zuo, Z.-hua.; Yao, S.-de; Luo, J.; Wang, W.-f.; Zhang, J.-S.; Lin, N.-Y.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **1992**, *15*, 215.
100. Gut, I. G.; Wood, P. D.; Redmond, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**, *118*, 2366.
101. Wood, P. D.; Redmond, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**, *118*, 4256.
102. Song, Q. H.; Lin, W. Z.; Yao, S. D.; Lin, N. Y.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*; **1998**, *114*, 181.
103. Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B.; *Chem. Rev.*; **2004**, *104*, 1977.
104. Samoylova, E.; Lippert, H.; Ullrich, S.; Hertel, I. V.; Radloff, W.; Schultz, T.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2005**, *127*, 1782.
105. Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Koller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B.; *Science.*; **2007**, *315*, 625.

106. Hare, P. M.; Middleton, C. T.; Mertel, K. I.; Herbert, J. M.; Kohler, B.; *Chem. Phys.*; **2008**, *347*, 383.
107. Kwok, W. M.; Ma, C.; Phillips, D. L.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2008**, *130*, 5131.
108. Marguet, S.; Markovitsi, D.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2005**, *127*, 5780.
109. *Laser Photolysis and Pulse Radiolysis*; Pergamon Series; 1st eddition.; Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Truscott, T. G., Oxford, **1983**.
110. Greenstock, C. L.; Johns, H. E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1968**, *30*, 21.
111. Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2006**, *128*, 6318.
112. Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *J. Phys. Chem. B.*; **2007**, *111*, 7409.





## **Capítulo 2: Objetivos**



En los últimos años la investigación de los mecanismos fotoquímicos involucrados en el daño al ADN ha atraído un considerable interés debido a la aplicación de avances en técnicas espectrofotométricas ultrarrápidas, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas para la caracterización de fotoproductos y la aparición de metodología más potente para la realización de cálculos teóricos. Como resultado de ello, se ha establecido la participación del estado excitado triplete de la timina en la formación de dímeros ciclobutánicos alcanzado tanto intrínsecamente, por un cruce entre sistemas, como a través de un proceso de fotosensibilización.

Así, el objetivo general de esta tesis doctoral es esclarecer los mecanismos de fotorreacción de la biomacromolécula, con especial atención a la formación de dímeros pirimidínicos en el estado excitado triplete: Ciclobutanos frente a fotoproductos (6,4).

En particular se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la influencia de la sustitución en el C5 sobre las propiedades fotofísicas de 2-tiopirimidinas. Con este propósito, 2-tiouracilo (TU), 5-*tert*-butil-2-tiouracilo (BTU) y 2-tiotimina (TT) han sido seleccionados para realizar estudios experimentales y teóricos.
- 2) Esclarecer la fotorreactividad de derivados de uracilo, sustituidos en C5 con un grupo voluminoso (*tert*-butilo), que provoque impedimento estérico en procesos fotosensibilizados.
- 3) Elucidar la fotoquímica que tiene lugar desde el estado triplete superior de la timina usando como herramienta la fotociclación de Norrish-Yang, una reacción típica de estados excitados  $n\pi^*$  al igual que la de Paternò-Büchi que conduce a la formación de los 6,4 PPs.
- 4) Demostrar que los fotoproductos (6,4) pueden actuar como fotosensibilizadores de ADN usando una molécula modelo como 1- $\beta$ -D-(2'-desoxiribosil)-5-metil 2-pirimidona (Pyo), así como la propia lesión 6,4 PP.



## **Capítulo 3: Propiedades fotofísicas de 2-tiopirimidinas sustituidas en C5**



### 3.1 Introducción

Las tionucleobases (TNB) difieren de sus nucleobases análogas en la sustitución de un átomo de oxígeno carbonílico por uno de azufre. La importancia de estos derivados está relacionada con su elevada reactividad fotoquímica en sistemas biológicos y con sus actividades biológicas. Por ejemplo, el 2-tiouracilo (TU) es un componente minoritario encontrado en la posición de balanceo (wobble position) en el anticodon.<sup>1</sup>

Por otra parte, las TNB han sido usadas en biología, biotecnología y medicina como agentes fotorreactivos en experimentos de fotoencruzamientos, diseñados para obtener información estructural valiosa.<sup>2-3</sup> La 6-tioguanosina y la 4-tiouridina pueden ser incorporadas fácilmente sin provocar cambios significativos ya que son menos voluminosas que los agentes enlazantes cruzados como por ejemplo los nucleósidos sustituidos de azidofenacilo.<sup>4</sup> Algunos de sus derivados muestran una actividad antitumoral, antitiroidal y antiartrítica.<sup>5,6,7</sup>

Desde el punto de vista fotofísico, la introducción de un grupo tiocarbonilo en las nucleobases modifica sus propiedades fotofísicas como el desplazamiento hacia el rojo del espectro de absorción UV de la timina y uracilo, o el dramático incremento de su  $\phi_{CES} \approx 1$ .<sup>8-9</sup> Esto conduce a estados excitados triplete muy reactivos capaces de interactuar con las nucleobases canónicas. Así es posible la fotoactivación selectiva de las TNB, haciéndolas atractivas para estudios mecanísticos. Sus estados excitados pueden actuar como iniciadores de transformaciones fotoquímicas en sistemas biológicos, aumentando el daño al ADN.<sup>10-11</sup> En particular, las TNB pueden sensibilizar la formación de oxígeno singlete, pudiendo ser utilizadas en tratamientos de terapia fotodinámica (TFD).<sup>7</sup>

Mientras que desde un punto de vista fotoquímico las 4-tiopirimidinas han sido investigadas en profundidad,<sup>9,12-13</sup> los 2-tioanálogos han atraído menor atención. En este contexto, se han realizado estudios de emisión de fosforescencia y de espectroscopía de absorción transitoria de 2-tiotimina. Como resultado, se ha observado una eficiente formación de su estado excitado triplete con una banda de absorción en la región de 500-700 nm y un tiempo de vida

de 2.7  $\mu\text{s}$  en acetonitrilo; su energía de triplete es 282 kJ/mol. Los resultados experimentales se han contrastado con cálculos teóricos a nivel B3LYP/6-31+G(d,p)/PCM.<sup>8-9</sup>

### 3.2 Objetivo

El objetivo de este capítulo de tesis reside en determinar la influencia de la sustitución en el C5 sobre las propiedades fotofísicas de 2-tiopirimidinas. Con este propósito, 2-tiouracilo (TU), 5-*tert*-butil-2-tiouracilo (BTU) y 2-tiotimina (TT) (Fig. 3.1) se han seleccionado para realizar estudios experimentales y teóricos.

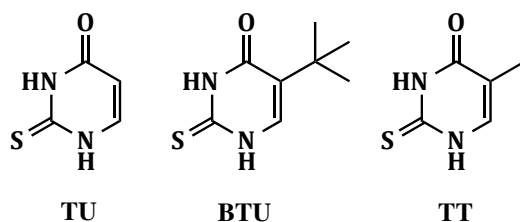


Fig. 3.1: Estructura de los compuestos tiopirimidínicos seleccionados.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Propiedades de absorción y emisión de 2-tiopirimidinas

En la Fig. 3.2 se presentan los espectros ultravioleta de TU, BTU y TT registrados en etanol. Como se puede apreciar, éstos son similares entre sí, presentando un máximo sobre 275 nm y un hombro sobre 290 nm, aunque el espectro de TU se desplaza 4 nm hacia el azul.



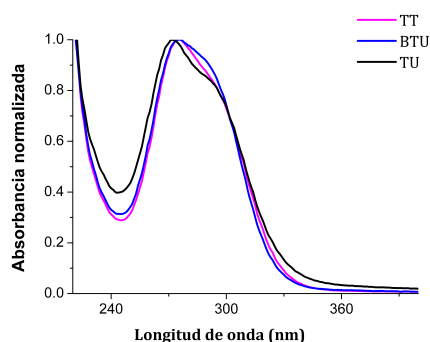


Fig. 3.2: Espectros de absorción de TU, BTU y TT en etanol.

No se observó emisión de fluorescencia incluso cuando el experimento se realizó a baja temperatura (77 K). Sin embargo, los compuestos disueltos en etanol exhibieron emisión de fosforescencia a 77 K (Fig. 3.3A). Aunque estructuralmente los compuestos son similares, se observaron diferencias significativas en la posición de las bandas (Fig. 3.3A). Así, para TU, los máximos encontrados fueron a 405, 427 y 455 nm, mientras que para BTU se encontraron a 409, 432 y 463 nm. En el caso de TT el espectro presentó un desplazamiento de 20 nm hacia el rojo, con máximos a 425, 451 y 483 nm. A partir de estos espectros se determinaron los valores de las  $E_T$ , que fueron de 307, 304 y 294 kJ/mol para TU, BTU y TT, respectivamente. Además, el rendimiento cuántico de fosforescencia, calculado usando xantona como referencia,<sup>14</sup> fue similar y con un valor de 0.7, para las tres moléculas.

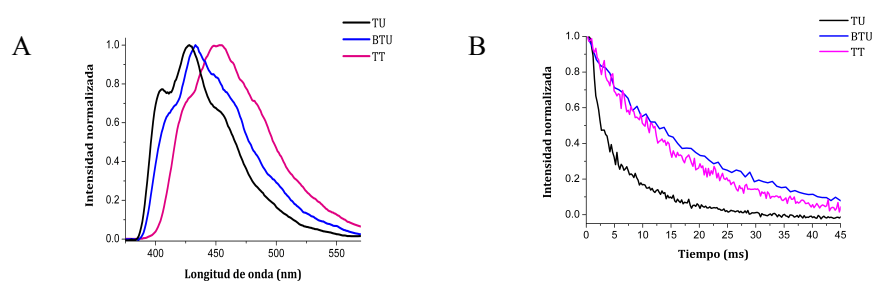


Fig. 3.3: Espectros de fosforescencia (A) y tiempos de vida (B) de TU, BTU y TT registrados en etanol a 77 K.

Por último, se encontraron los valores de 7, 20 y 18 ms para los tiempos de vida de emisión de fosforescencia TU, BTU y TT (Fig. 3.3B).

### 3.3.2 Fotólisis de destello láser

Los compuestos disueltos en ACN y purgados con N<sub>2</sub> se excitaron con el láser pulsado de Xe/HCl ( $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$ ) y se registraron los espectros de absorción transitoria. Éstos presentaron una banda desde 500 nm a 700 nm, la cual fue en principio asignada a la absorción triplete-triplete (Fig. 3.4).<sup>8</sup> Para descartar que en la formación de esta banda contribuya en parte el electrón solvatado, los espectros se registraron en atmósfera de N<sub>2</sub>O. En los tres compuestos analizados, la desaparición de la señal fue uniforme en todo el espectro, indicando la presencia de una única especie transitoria.

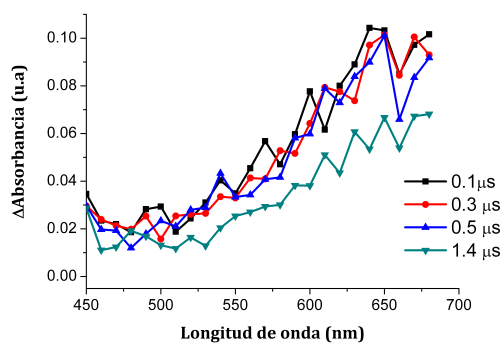
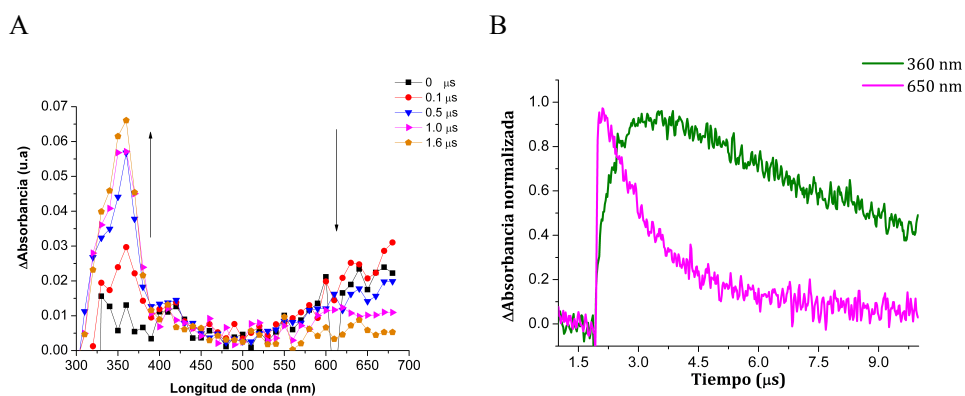


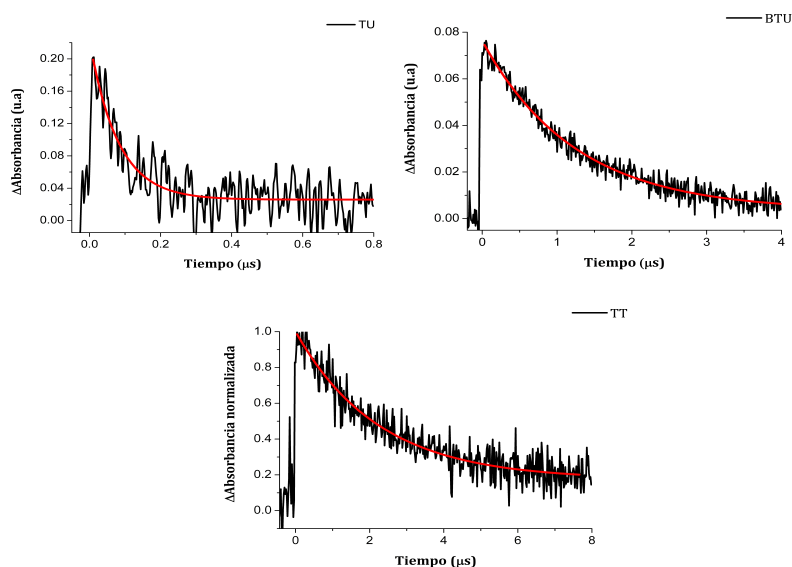
Fig. 3.4: Espectro de absorción transitoria de TT en ACN.

Para confirmar que esta banda de absorción obtenida corresponde al estado excitado triplete, se realizó un experimento de desactivación triplete-triplete usando bifenilo como aceptor ( $E_T = 274 \text{ kJ/mol}$ ).<sup>15</sup> Como se muestra en la Fig. 3.5A, en el caso de TT, apareció una nueva banda centrada a 360 nm, característica del estado excitado de bifenilo, con la desaparición simultánea de la señal a 650 nm. Las trazas cinéticas a 360 y 650 nm se presentan en la Fig. 3.5B para TT. Resultados similares fueron obtenidos para BTU y TU (Fig. 3.13 anexo).



**Fig. 3.5:** A) Espectro de absorción transitoria de TT en ACN en presencia de bifenilo ( $1.7 \times 10^{-4}$  M). B) Trazas registradas a 650 nm y 360 nm.

Además, se determinó el tiempo de vida del estado triplete ( $\tau_T$ ) de los tres compuestos. Las trazas registradas se ajustaron a una función monoexponencial, obteniéndose los valores de  $\tau_T$  de 70 ns, 1.1  $\mu$ s y 2.3  $\mu$ s para TU, BTU y TT, respectivamente (Fig. 3.6).



**Fig. 3.6:** Trazas de TU, BTU y TT registradas a 650 nm con el láser pulsado de Xe/HCl ( $\lambda_{exc} = 308$  nm).

Por último, se determinó la configuración electrónica de los estados excitados triplete de los compuestos. Para ello, se registró el espectro de absorción transitoria y las trazas cinéticas de TU, BTU y TT en presencia de  $\text{Ph}_2\text{CHOH}$  como dador de hidrógeno (Fig. 3.7). En ninguna de las muestras se observó una desactivación del triplete tras la adición de más de 0.4 M de  $\text{Ph}_2\text{CHOH}$ , ni la formación de del radical cetilo ( $\lambda_{max}=550$  nm). Este resultado respalda la naturaleza  $\pi\pi^*$  del estado excitado triplete, a diferencia de los resultados del experimento control, usando la mezcla BP/  $\text{Ph}_2\text{CHOH}$  en las mismas condiciones (Fig. 3.14 anexo).

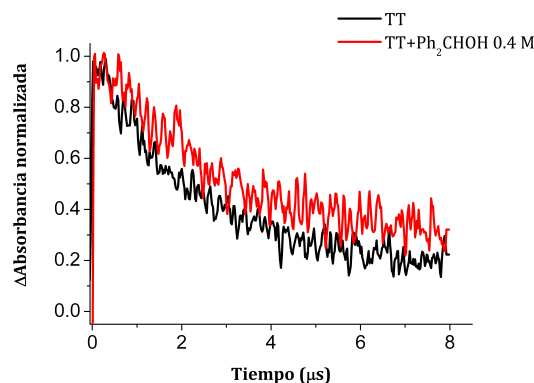


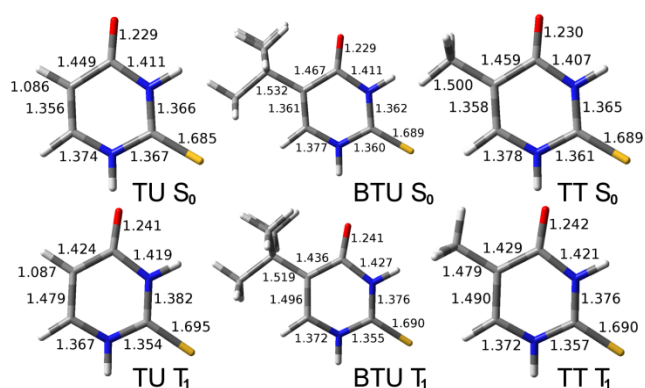
Fig. 3.7: Trazas registradas a 650 nm de TT en ausencia y presencia de 0.4 M de Ph<sub>2</sub>CHOH.

### 3.3.3 Cálculos teóricos

Según los datos experimentales obtenidos, a partir tanto de la fosforescencia como en las medidas de absorción transitoria, la sustitución del C5 de 2TT provoca diferencias en las propiedades de su estado excitado triplete. Con el fin de entender los resultados experimentales se realizaron los cálculos teóricos que se presentan a continuación.

#### 3.3.3.1 Geometría y propiedades electrónicas

La geometría de los estados singlete y triplete más bajos de TU, BTU y TT se presenta en la Fig. 3.8. En particular, las del estado fundamental pertenecen al grupo de simetría  $C_s$  ya que todos los átomos se encuentran en el plano del anillo pirimidínico (a excepción de dos hidrógenos en el plano del grupo metilo de TT y BTU, y dos grupos metilos de BTU). Las distancias y los ángulos de enlace fueron similares para los tres compuestos.

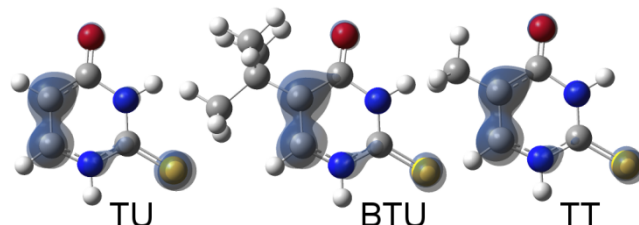


**Fig. 3.8:** Geometría optimizada para los estados singlete y triplete más bajos de TU, BTU y TT a nivel (U)B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM.

Por otra parte, las geometrías del triplete presentan un eje rotacional sobre los átomos N3 y C6 adoptando la conformación Dewar. Las distancias y los ángulos de enlace fueron nuevamente similares para los tres compuestos (Fig. 3.8). Tanto en las geometrías del singlete como del triplete, el anillo pirimidínico parece ser relativamente rígido independientemente de la sustitución en C5.<sup>8</sup> Como se puede observar en la Fig. 3.8, aunque muchas de las distancias interatómicas en las geometrías del S<sub>0</sub> y T<sub>1</sub> son similares, se observó una significativa diferencia en el enlace C5-C6 (0.12-0.14 Å) en el caso del estado triplete.

Asimismo, la optimización del primer y segundo estado excitado singlete fue realizada para las 2-tiopirimidinas mediante cálculos con TD-DFT a nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM. Los resultados mostraron una elongación significativa del enlace C-S<sup>8</sup> pero preservando la simetría C<sub>s</sub> de las moléculas.

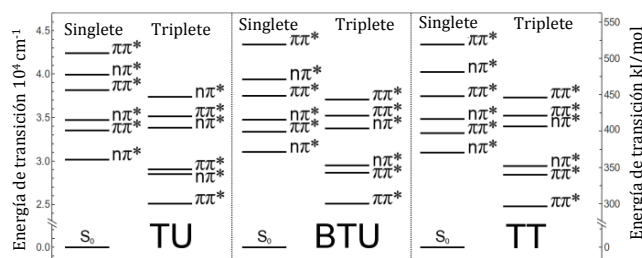
Por último, y con el objetivo de conocer la naturaleza del estado T<sub>1</sub> se calculó la densidad de spin que en las tres bases resultó estar localizada en los átomos C5 y C6 (Fig. 3.9).



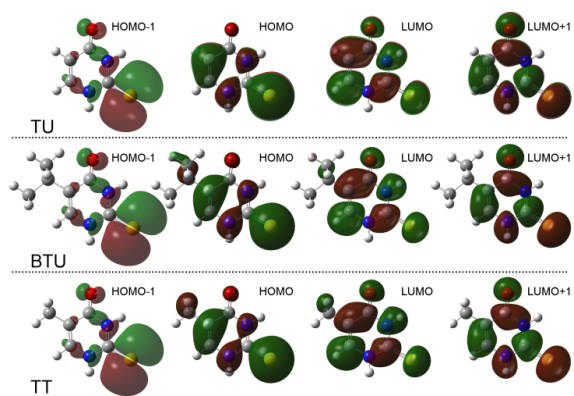
**Fig. 3.9:** Densidad de spin de las geometrías de triplete de TU, BTU y TT a nivel UB3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM.

### 3.3.3.2 Propiedades de absorción y emisión

Según los cálculos TD-DFT realizados, en la región de Frank-Condon las primeras seis excitaciones singlete-singlete desde el  $S_0$  de TU, BTU y TT comparten características idénticas (Fig. 3.10 y tabla 3.1). En este punto,  $S_1$  implica a la transición desde el orbital  $n$  localizado sobretudo en el átomo de azufre (HOMO-1) al orbital  $\pi^*$  con carácter antienlazante extendido sobre los enlaces N1-C2, C2-S y C2-N3 (LUMO). El estado  $S_2$  está asociado con la transición desde el orbital HOMO ( $\pi$ ) localizado en el átomo de azufre, al LUMO (Fig. 3.11).



**Fig. 3.10:** Diagrama de energía de los seis primeros estados singlete y triplete de TU, BTU y TT calculados con el método TD-DFT.



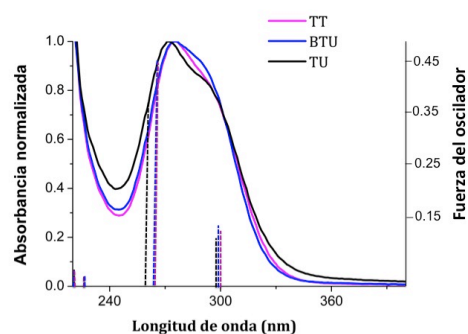
**Fig 3.11:** Orbitales moleculares involucrados en las transiciones de los estados excitados singletes S1-S4.



**Tabla 3.1:** Propiedades espectroscópicas calculadas para los primeros seis estados excitados singletes y tripletes de TU, BTU y TT.

TU					
Estado	Excitación	$\Delta E$ (eV)	$\Delta E$ (kJ/mol)	$\Delta E$ nm	Fuerza del oscilador
S <sub>1</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.74	361.1	331.6	0.0000
S <sub>2</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	4.16	401.4	298.3	0.1095
S <sub>3</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.31	415.9	287.9	0.0003
S <sub>4</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	4.73	456.8	262.1	0.3642
S <sub>5</sub> ( $n\pi^*$ )	H-3→L	4.95	478.1	250.4	0.0002
S <sub>6</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H-2→L	5.26	507.7	235.8	0.0052
T <sub>1</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	3.11	300.1	398.9	-
T <sub>2</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.54	341.7	350.4	-
T <sub>3</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	3.60	348.0	344.0	-
T <sub>4</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.20	405.0	295.6	-
T <sub>5</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H-2→L	4.35	420.2	284.9	-
T <sub>6</sub> ( $n\pi^*$ )	H-3→L	4.63	447.2	267.7	-
BTU					
S <sub>1</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.85	371.9	321.9	0.0000
S <sub>2</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	4.14	399.6	299.6	0.1433
S <sub>3</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.31	416.6	287.4	0.0003
S <sub>4</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	4.65	448.9	266.7	0.4557
S <sub>5</sub> ( $n\pi^*$ )	H-3→L	4.89	471.7	253.8	0.0002
S <sub>6</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+2	5.38	519.6	230.4	0.0325
T <sub>1</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	3.11	300.7	398.1	-
T <sub>2</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	3.55	343.2	348.8	-
T <sub>3</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.66	353.4	338.8	-
T <sub>4</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.19	404.5	296.0	-
T <sub>5</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H-2→L	4.36	421.4	284.1	-
T <sub>6</sub> ( $n\pi^*$ )	H-3→L	4.59	443.3	270.1	-
TT					
S <sub>1</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.84	370.9	322.8	0.0000
S <sub>2</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	4.12	397.8	301.0	0.1245
S <sub>3</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.31	416.4	287.5	0.0003
S <sub>4</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	4.64	448.6	266.9	0.4156
S <sub>5</sub> ( $n\pi^*$ )	H-3→L	4.99	481.8	248.5	0.0002
S <sub>6</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+2	5.38	519.4	230.5	0.0245
T <sub>1</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L	3.08	296.9	403.2	-
T <sub>2</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H→L+1	3.53	340.5	351.6	-
T <sub>3</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L	3.65	352.1	340.0	-
T <sub>4</sub> ( $n\pi^*$ )	H-1→L+1	4.21	406.5	294.5	-
T <sub>5</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H-2→L	4.36	421.3	284.2	-
T <sub>6</sub> ( $\pi\pi^*$ )	H-2→L+1	4.62	446.2	268.3	-

Como se puede observar en la Tabla 3.1, los valores de  $\Delta E$  de los estados singlete de los compuestos obtenidos mediante los cálculos teóricos son similares a los adquiridos experimentalmente. En la Fig. 3.12 se presenta el espectro de absorción UV y la fuerza del oscilador calculada de los compuestos. Las bandas de absorción podrían ser atribuidas a las transiciones permitidas  $S_0 \rightarrow S_2$  ( $\pi\pi^*$ , calculadas a partir de la fuerza del oscilador 0.1095 para TU, 0.1433 para BTU y 0.1245 para TT) y  $S_0 \rightarrow S_4$  ( $\pi\pi^*$ , calculadas a partir de la fuerza del oscilador 0.3642 para TU, 0.4557 para BTU y 0.4133 para TT). Los valores computados para las transiciones  $S_0 \rightarrow S_1$  ( $n\pi^*$ ) de 0.0000 corresponden a cualquier valor por debajo de 0.0001.



**Fig. 3.12:** Espectro de absorción UV de TU, BTU y TT en etanol y fuerza del oscilador calculada desde el estado  $S_1$  a  $S_6$  (líneas discontinuas).

Por último, se determinaron los valores de transición vertical  $S_0 \rightarrow T_1$  ( $\pi\pi^*$ ) para los compuestos al nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM; éstos fueron de 300.1, 300.7 y 296 kJ/mol para TU, BTU y TT respectivamente (Tabla 3.1 y Fig. 3.10), en el mismo rango que los obtenidos en los experimentos.

Se realizó el cálculo teórico de las geometrías de los estados excitados triplete en el nivel UB3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM, además del cálculo singlete-triplete mediante cálculos con TD-DFT. Los valores obtenidos de energía de transición vertical fueron ligeramente superiores (316.8 kJ/mol para TU, 314.1 kJ/mol para BTU y 318.1 kJ/mol para TT) pero comparables con los experimentales.

### 3.4 Conclusiones

La sustitución en la posición C5 de 2-tiotimina (TT) modula sus propiedades fotofísicas. El compuesto TT presenta la energía de triplete más baja mientras que 2-tiouracilo (TU) tiene el tiempo de vida de triplete más corto. Los cálculos teóricos al nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM coinciden con los datos experimentales obtenidos de los estados excitados, respaldando la naturaleza  $\pi\pi^*$  de los estados excitados tripletes más bajos.

### 3.5 Sección experimental

#### 3.5.1 Absorción y emisión

Para obtener los espectros de absorción y emisión los compuestos fueron disueltos en etanol. En el caso de las medidas de emisión las muestras se dispusieron en tubos de cuarzo (diámetro de 5 mm) y se enfriaron a 77 K, excitando a 270 nm.

#### 3.5.2 Fotólisis de destello láser

Para registrar los espectros de absorción transitoria y las trazas cinéticas de los compuestos se utilizó un láser pulsado excímero de Xe/HCl (LEXTRA50 Lambda Physik laserTechnik) con una  $\lambda_{exc} = 308$  nm. Las muestras fueron disueltas en ACN y burbujeadas con  $N_2$ . En general su absorbancia fue ajustada a 0.3 a  $\lambda = 308$  nm.

En el caso de los experimentos de desactivación, diferentes volúmenes (del rango de  $\mu\text{L}$ ) de una disolución madre de bifenilo se añadieron hasta obtener la concentración apropiada del desactivador en la cubeta (desde 0 a  $5.2 \times 10^{-4}$  M). Las trazas cinéticas correspondientes a las 2-tiopirimidinas se monitorizaron a 650 nm, mientras que la formación del triplete del bifenilo se registró a 360 nm. Por otra parte, la desactivación usando  $\text{Ph}_2\text{CHOH}$  se realizó añadiendo más de 0.4 M de este compuesto a las 2-tiopirimidinas (abs 0.3 a  $\lambda = 308$  nm).

### 3.5.3 Detalles computacionales

Las geometrías del estado fundamental de TU, BTU y TT se optimizaron sin limitaciones simétricas. Para ello, se utilizaron diferentes funciones: B3LYP,<sup>16,17</sup> CAM-B3LYP,<sup>18</sup>  $\omega$ B97XD,<sup>19</sup> M062X<sup>20</sup> y PBE0.<sup>21</sup>

Para los cálculos de cada DFT funcional se usaron los conjuntos de bases monoeléctricas 6-31+G(d),<sup>22</sup> cc-pVDZ, aug-cc-pVDZ y aug-cc-pVTZ.<sup>23</sup> Para cada geometría optimizada se comprobó que ésta tuviera un mínimo en la superficie de energía potencial a través de cálculos de frecuencia vibracional.

Las transiciones energéticas verticales del singlete y triplete en la región de Frank-Condon se computaron desde la geometría del S<sub>0</sub> usando el método TD-DFT<sup>24-30</sup> utilizando el mismo nivel de teoría que para optimización.

Por otro lado, las emisiones de fosforescencia se calcularon usando tres niveles de aproximación bien establecidos:

- Optimización de la geometría del estado excitado triplete con el correspondiente método DFT no restringido.
- Análisis de la geometría vibracional obtenida para comprobar que se trata de un mínimo.
- Cálculo de las energías de excitación de singlete-triplete con la aproximación TD-DFT desde la geometría del estado excitado.

Los efectos del disolvente fueron modelados mediante el uso del PCM.<sup>31,32</sup> Todos los cálculos DFT se realizaron con el pack Gaussian09.<sup>33</sup> Es importante destacar que las fuerzas del oscilador de las excitaciones singlete-triplete se tomaron como 0 debido a la falta de acoplamiento spin-orbital en el cálculo del triplete mediante TD-DFT en el pack Gaussian09.<sup>33</sup>

Finalmente, cabe decir que solo el cálculo B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM ha sido presentado en los resultados porque es el que aporta la mejor racionalización de las propiedades de absorción y emisión.

### 3.5.4 Síntesis de los compuestos

#### 3.5.4.1 General

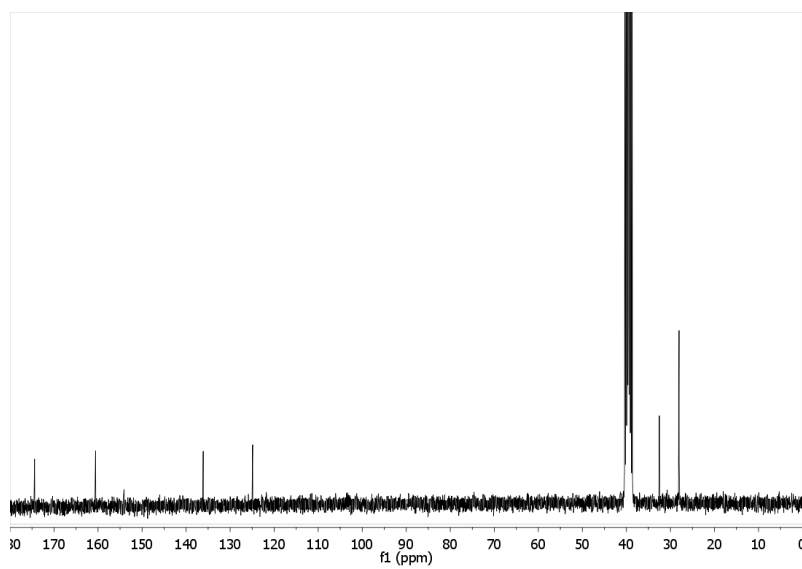
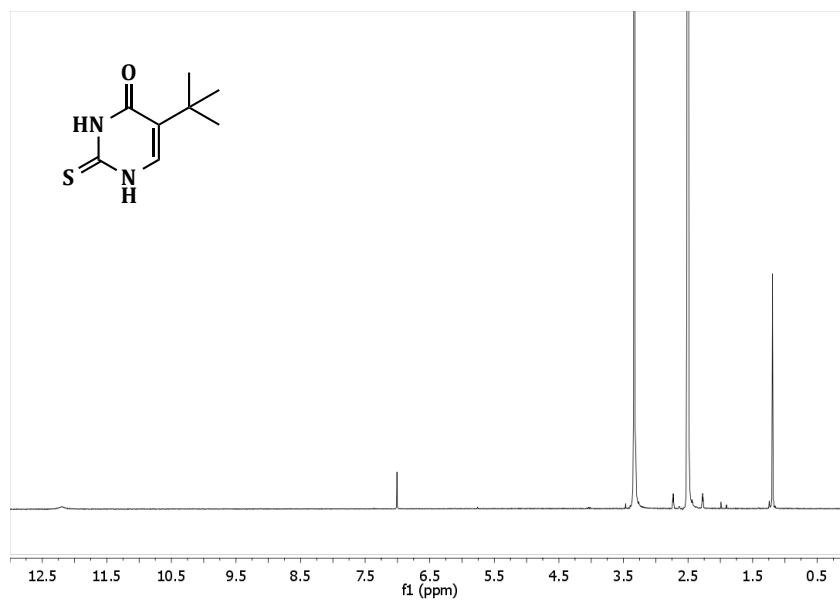
Se usaron los compuestos 2-tiouracilo (TU) (TCI Europe), 2-tiotimina (TT), *tert*-butilacetato de metilo (Alfa Aesar), bifenilo, Ph<sub>2</sub>CHOH (Sigma aldrich) y formiato de etilo (Across organic) fueron usados. Etanol y ACN (grado HPLC) fueron adquiridos de la firma Sharlau. El compuesto 5-*tert*-butil-2-tiouracilo (BTU) se sintetizó según el procedimiento descrito a continuación.<sup>34</sup>

#### 3.5.4.2 Síntesis de 5-*tert*-butil-2-tiouracilo (BTU)

A una disolución de diisopropilamina (11 mL, 78 mmol) en 80 ml de éter anhidro a una T inferior a -60°C se añadieron pequeñas porciones de n-BuLi (12.40 mL, 118 mmol), con agitación vigorosa. Luego, del mismo modo se añadió *tert*-butilacetato de metilo (10 g, 78 mmol) en 70 mL de éter anhidro y formiato de etilo (24.6 mL, 310 mmol) en 120 ml de éter anhidro. En todo momento la temperatura se mantuvo a menos de -60°C. Tras 6 horas de reacción, la temperatura de la reacción se mantuvo a -12°C durante toda la noche. El éter de la reacción se evaporó a vacío (T = 35°C) obteniéndose un residuo amarillento aceitoso. A éste se le añadieron 80 mmol de tiourea y 20 mL de metanol anhidro. Posteriormente la mezcla se calentó a reflujo con exclusión de humedad durante 6 horas, se enfrió con un baño de NaCl y hielo y con vigorosa agitación se acidificó (gota a gota) con HCl al 20% hasta un pH≤3. La mezcla acidificada se enfrió durante 0.5-1 hora más y el BTU se obtuvo mediante filtración.

<sup>1</sup>H RMN (300 Hz, DMSO) δ: 12.23 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 1.22 (s, 9H); <sup>13</sup>C RMN (75 Hz, DMSO) δ: 174.6, 160.7, 136.2, 125.1, 33.7 y 28.3. HRMS (M+H<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 185.0740 encontrada 185.0749.

### Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de BTU



### 3.6 Referencias

1. Kumar, R. K.; Davis, D. R.; *Nucleic Acids Res.*; **1997**, *25*, 1272.
2. Favre, A.; Saintomé, C.; Fourrey, J.-L.; Clivio, P.; Laugâa, P.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **1998**, *42*, 109.
3. Coleman, R. S.; Siedlecki, J. M.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, *114*, 9229.
4. Harris M. E.; Christian, E. L.; *Methods Enzymol.*; **2009**, *468*, 127.
5. Cooper, D. S.; *N. Engl. J. Med.*; **2005**, *352*, 905.
6. Reader, S. C. J.; Carroll, B.; Robertson, W. R.; Lambert, A.; *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 1825.
7. Massey, A.; Xu, Y.-Z.; Karran, P.; *Curr. Biol.*; **2001**, *11*, 1142.
8. Kuramochi, H.; Kobayashi, T.; Suzuki, T.; Ichimura, T.; *J. Phys. Chem. B.*; **2010**, *114*, 8782.
9. Harada, Y.; Okabe, C.; Kobayashi, T.; Suzuki, T.; Ichimura, T.; Nishi, N.; Xu, Y.-Z.; *J. Phys. Chem. Lett.*; **2009**, *1*, 480.
10. Blazek, E. R.; Alderfer, J. L.; Tabaczynski, W. A.; Stamoudis, V. C.; Churchill, M. E.; Peak, J. G.; Peak, M. J.; *Photochem. Photobiol.*; **1993**, *57*, 255.
11. Clivio, P.; Guillaume, D.; Adeline, M.-T.; Hamon, J.; Riche, C.; Fourrey, J.-L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1157.
12. Yosuke Harada, T. S., Teijiro Ichimura and Yao-Zhong Xu.; *J. Phys. Chem. B.*; **2007**, *111*, 5518.
13. Salet, C.; Bensasson, R. V.; Favre, A.; *Photochem. Photobiol.*; **1983**, *38*, 521.
14. *Handbook of photochemistry. Third edition*, Editorial Taylor & Francis, Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; 2006.

15. Murov, S. L.; *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker Inc.: New York, **1973**.
16. Becke, A. D.; *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.*; **1988**, *38*, 3098.
17. Lee, C.; Yang, W.; Parr R. G.; *Phys. Rev. B.*; **1988**, *37*, 785.
18. Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C.; *Chem. Phys. Lett.*; **2004**, *393*, 51.
19. Chai, J.-D.; Head-Gordon, M.; *J. Chem. Phys.*; **2008**, *128*, 084106.
20. Zhao, Y.; Truhlar, D.; *Theor. Chem. Acc.*; **2008**, *120*, 215.
21. Adamo, C.; Barone, V.; *J. Chem. Phys.*; **1999**, *110*, 6158.
22. Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.*; **1971**, *54*, 724.
23. Dunning, J. T. H.; *J. Chem. Phys.*; **1989**, *90*, 1007.
24. Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R.; *Chem. Phys. Lett.*; **1996**, *256*, 454.
25. Casida, M.E.; Jamorski, C.; Kasida K. C.; Salahub, D. R.; *J. Chem. Phys.*; **1998**, *108*, 4439.
26. Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; a. Frisch. M. J.; *J. Chem. Phys.*; **1998**, *109*, 8218.
27. Van Caillie, C.; Amos, R. D.; *Chem. Phys. Lett.*; **1999**, *308*, 249.
28. Van Caillie, C.; Amos, R. D.; *Chem. Phys. Lett.*; **2000**, *317*, 159.
29. Furche, F.; Ahlrichs, R.; *J. Chem. Phys.*; **2002**, *117*, 7433.
30. Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Mennucci, B.; Tomasi, J.; Cammi, R.; Barone, V.; *J. Chem. Phys.*; **2006**, *124*, 094107.
31. Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Barone, V.; *J. Chem. Phys.*; **2002**, *117*, 43.



32. Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J.; *J. Chem. Phys.*; **1997**, *107*, 3210.
33. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery J. A. Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austion, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; *R.A. Gaussian 09, Gaussian, INC., Wallingford CT 2009*.
34. Basnak, I.; Balkan, A.; Coe, P. L.; Walker, R. T., *Nucleosides. Nucleotides* **1994**, *13*, 177.

### 3.7 Anexo

A continuación se presentan las figuras que no han sido incluidas en el capítulo.

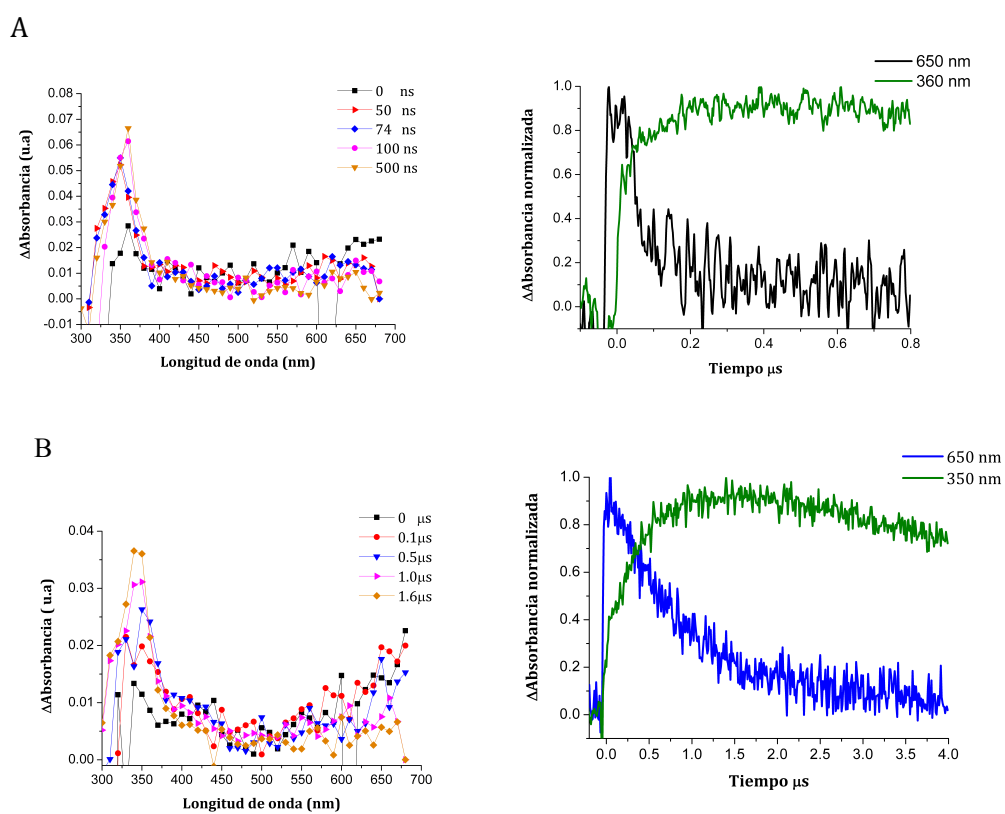
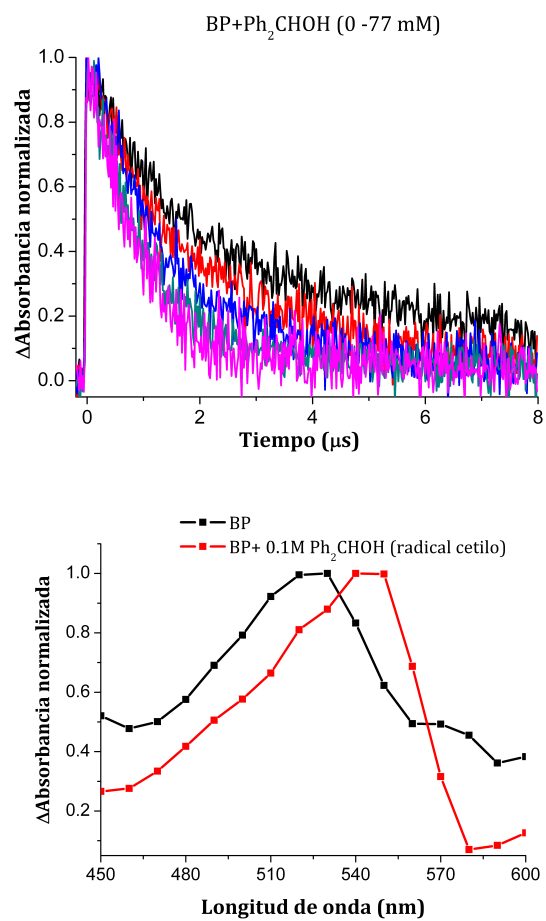


Fig. 3. 13: Espectro de absorción transitoria y trazas registradas a 650 nm y 360 nm de TU (A) y BTU (B) en presencia de bifenilo.



**Fig. 3.14:** Trazas registradas a 600 nm del triplete de BP en presencia de cantidades crecientes de Ph<sub>2</sub>CHOH (arriba) y espectro de absorción transitoria de BP con 0.1 M de Ph<sub>2</sub>CHOH (abajo).



**Capítulo 4: Efecto del sustituyente en C5 sobre la fotorreactividad de pirimidinas**



## 4.1 Introducción

La fotodimerización de las bases pirimidínicas en el ADN es un proceso que conduce a la formación de lesiones que bloquean su replicación y transcripción, dando lugar a efectos citotóxicos y mutagénicos en la biomacromolécula.<sup>1</sup> En particular, al irradiar timina o uracilo en el ADN o ARN, respectivamente, el dímero ciclobutano (DCB) *cis-sin* es el mayoritario, debido a la estereoselectividad que provoca la estructura del ácido nucleico.<sup>2,3</sup>

En la Fig. 4.1 se representa un esquema del proceso de formación de DCBs, cuando las pirimidinas (Pir) se encuentran en disolución. En el caso de uracilo se determinó una mayor eficiencia en este proceso<sup>2</sup> (ver  $\phi_{\text{DIM}}$  en Tabla 4.1) debido a que i) el estado singlete excitado de uracilo da lugar a un CES más eficiente que el estado singlete excitado de timina ( $\phi_{\text{CES}} = 0.40$  vs  $\phi_{\text{CES}} = 0.18$ , respectivamente) y ii) la auto desactivación del estado triplete de uracilo que es más rápida que la de timina (Tabla 4.1).<sup>2</sup> Así, la constante de velocidad de formación de dímeros de uracilo es tres veces mayor en comparación con timina.<sup>2</sup> Las diferencias encontradas en la dimerización de las bases pueden ser debidas a efectos estéricos impuestos por el grupo metilo presente en el C5 de la timina.<sup>2,4</sup>

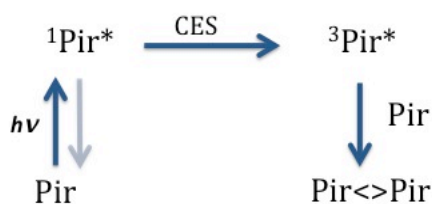


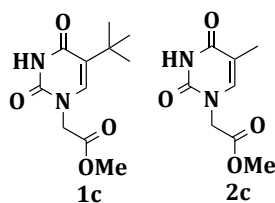
Fig. 4.1: Esquema representativo del proceso de dimerización de pirimidinas en disolución.

**Tabla 4.1:** Datos fotofísicos para la fotodimerización de uracilo y timina.<sup>2</sup>

	uracilo	timina
$\phi_{\text{DIM}}$	0.019	0.0025
$\phi_{\text{CES}}$	0.40	0.18
$k_q (M^{-1} s^{-1})$	$2 \times 10^9$	$6 \times 10^8$

Estos procesos se han estudiado también induciéndolos con luz UVA y fotosensibilizadores de triplete típicos como son la acetona o la benzofenona (BP). En el caso de la fotosensibilización con acetona se observa la formación de DCB;<sup>5-6</sup> sin embargo al usar BP solo se han obtenido oxetanos como resultado de una Paternò-Büchi entre el grupo carbonilo de la cetona y el doble enlace C5-C6 de la base pirimidínica. No se han observado diferencias notables entre uracilo y timina en cuanto al rendimiento de formación y regioselectividad de los mismos.<sup>7-8</sup> Cabe mencionar que se obtienen también DCBs cuando la base está presente a elevadas concentraciones.<sup>9</sup> En experimentos de fotosensibilización por acetona y BP llevados a cabo en el ADN solo se han observado DCBs debido a que la energía de triplete de la timina presente en la biomacromolécula es baja con respecto a la de la timina en disolución (267 kJ/mol frente a 315 kJ/mol).<sup>10-11</sup>

En este contexto, el objetivo del presente trabajo consiste en determinar la influencia del impedimento estérico asociado al sustituyente en C5 sobre el proceso de dimerización fotosensibilizada que conduce a la formación de DCBs. Para ello se eligió un uracilo sustituido con un grupo *tert*-butilo (**1c**), y el derivado análogo de la timina (**2c**) para comparar.



**Fig. 4.2:** Estructuras químicas de los derivados de timina a estudiar.



En este caso, la irradiación directa debería seguir una ruta similar a la de 5-*tert*-butil-2'-desoxiuridina que da lugar al nucleósido 2-dihidrociclobuta[*d*]pirimidin-2-ona.<sup>12</sup> Esto ocurre tras la abstracción de hidrógenos en gamma con respecto al grupo carbonilo excitado originando un birradical 1,4, que finalmente resulta en la formación de un ciclobutano (Norrish-Yang) o, bien desalquila obteniéndose uracilo (Norrish II). Este segundo proceso es minoritario con respecto al primero.<sup>12</sup>

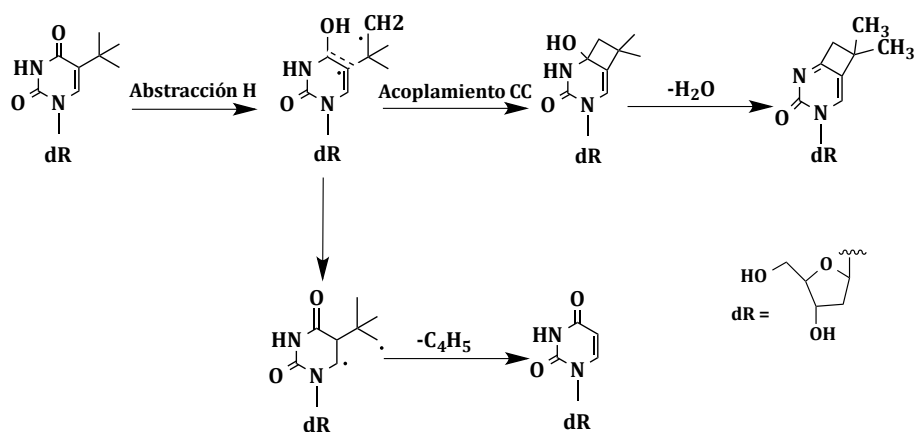


Fig. 4.3: Representación esquemática de la reacción Norrish Tipo II en 5-*tert*-butil-2'-desoxiuridina.

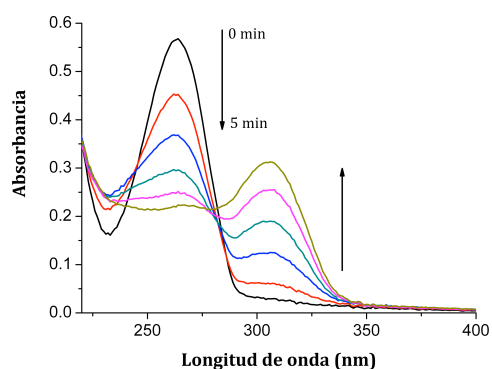
## 4.2 Objetivo

El objetivo del presente capítulo pretende esclarecer la influencia de la presencia de un grupo voluminoso en C5 del uracilo sobre la formación de DCBs (impedimento estérico). Para ello se fotosensibilizará **1c** en disolución con acetona ( $E_T = 332$  kJ/mol), xantona (Xan,  $E_T = 336$  kJ/mol) y BP ( $E_T = 290$  kJ/mol), todos ellos fotosensibilizadores típicos con un estado triplete excitado de carácter  $n\pi^*$ .

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Irradiación directa de **1c** e identificación del fotoproducto obtenido

Se llevó a cabo la irradiación de **1c** en acetonitrilo a 254 nm, bajo N<sub>2</sub>, en cubetas de cuarzo. La evolución de la reacción se siguió mediante espectroscopía de UV, que mostró claramente como la banda centrada a 260 nm que presenta **1c** decrecía progresivamente al mismo tiempo que aparecía una nueva banda centrada a 314 nm (Fig. 4.4). Por analogía con 5-*tert*-butil-2' desoxiuridina se dedujo que tiene lugar una fotorreacción Norrish-Yang que lleva a la formación de la 1,2-dihidrociclobuta[*d*]pirimidin-2-ona correspondiente.<sup>12</sup> Para confirmarlo se aisló el fotoproducto obtenido y se caracterizó por RMN y UPLC-MS/MS.

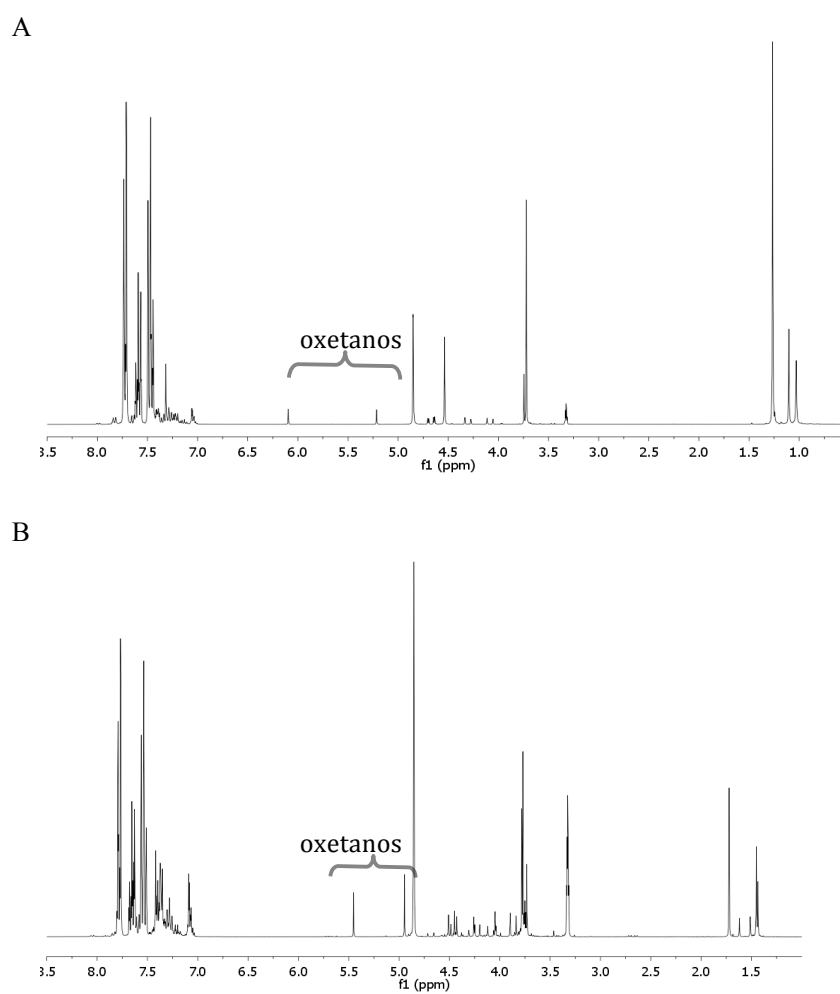


**Fig. 4.4:** Espectros UV de una disolución del compuesto **1c** después de varios tiempos de irradiación.

### 4.3.2 Irradiación de **1c** fotosensibilizada por benzofenona

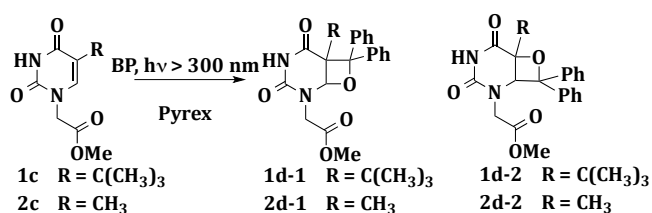
Se preparó una disolución 18 mM de **1c** en presencia de BP en proporción molar 1:2, usando como disolvente una mezcla de acetonitrilo:agua (4:1 v:v) y se irradió con luz en la región 300 nm <  $\lambda$  < 400 nm a través de pyrex durante 17 h. De forma paralela se llevó a cabo el mismo experimento con el

compuesto **2c**, que se irradió 12 h. De los RMNs de los crudos de irradiación claramente se pudo establecer que **1c** reacciona mucho más lentamente que **2c** (Fig. 4.5).



**Fig. 4.5:** Espectros <sup>1</sup>H de RMN (en MeOD) de los crudos de reacción obtenidos tras fotosensibilizar **1c** (A) y **2c** (B) con BP en proporción 1:2.

La aparición de dos señales singlete entre  $\delta = 4.8$  y 6.2 ppm apuntaba a la formación de dos oxetanos regioisómeros en ambos casos, en proporción 50:50 (**1c**) y 65:35 (**2c**), que se aislaron mediante cromatografía de sílice y posteriormente se caracterizaron por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y UPLC MS/MS. Las estructuras de los oxetanos obtenidos se muestran en la Fig. 4.6.



**Fig. 4.6.** Fotoproductos obtenidos tras irradiar benzofenona en presencia de **1c** y **2c** con luz  $300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ .

La regioquímica de los fotoproductos se determinó en base al desplazamiento químico de los carbonos y protones en posición 5 y 6. Así, el  $\Delta\delta$  (C5–C6) fue de 35 y 11 ppm, respectivamente, para **2d-1** y **2d-2**, indicando que **2d-1** se corresponde con el oxetano en el que el oxígeno está enlazado al C6. Se observa la misma tendencia, aunque menos exagerada, en los compuestos derivados de **1c** debido al sustituyente *tert*-butilo. El desplazamiento observado para los H6 es consistente con esta asignación y se encuentran más desapantallados en **1d-1** y **2d-1**,  $\delta = 6.05$  y 5.37 ppm, respectivamente, que en **1d-2** y **2d-2**  $\delta = 5.18$  y 4.87 ppm.

Es de resaltar que entre los fotoproductos obtenidos no se encontraron DCBs, que resultarían de una TETT entre el fotosensibilizador y la base, lo cual indica que la reacción que tiene lugar entre BP y **1c** es predominantemente una Paternò-Büchi. Para favorecer la TETT entre los dos reactivos, se llevaron a cabo nuevas irradiaciones aumentando la proporción de base presente en el medio.<sup>9</sup> Así se irradió **1c** (**2c**):BP en proporción 3:1. El análisis del crudo de reacción mediante RMN de protón y HPLC-MS en el caso de **1c**, evidenció que de nuevo solamente se forman los oxetanos **1d-1** y **1d-2** (Fig. 4.14 anexo). Sin embargo, en el caso de **2c**, en estas condiciones, se forman además otros com-

puestos atribuibles a los DCBs (Fig. 4.15 anexo). Estos nuevos compuestos se aislaron e identificaron como los DCBs *cis-sin* y *trans-sin* **2e-1** y **2e-2** (Fig. 4.7). La estereoquímica se estableció para el DCB **2e-2** en base al efecto NOE observado entre el metilo (s,  $\delta = 1.65$  ppm) y los CH<sub>2</sub> (d,  $\delta = 4.99$  ppm y 3.66 ppm) así como entre el mismo metilo (s,  $\delta = 1.65$  ppm) y el OCH<sub>3</sub> (s,  $\delta = 3.77$  ppm). El NOE del compuesto DCB **2e-1** no mostró estas interacciones.

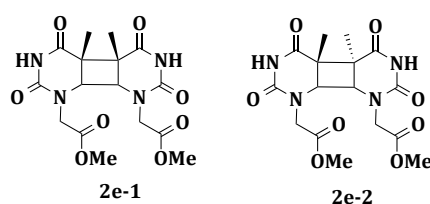
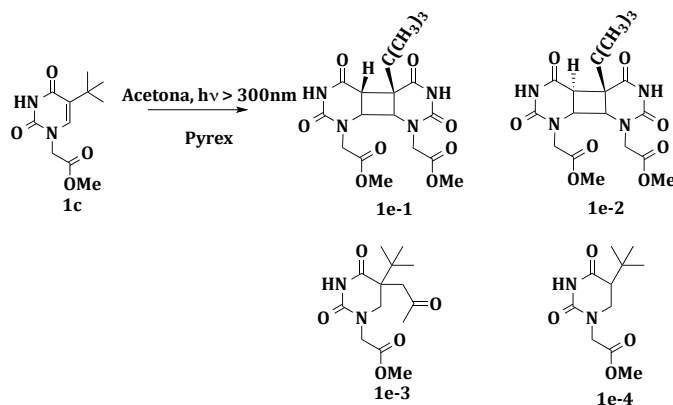


Fig. 4.7: Estructura química de los DCBs *cis-sin* y *trans-sin* **2e-1** y **2e-2**.

#### 4.3.3 Irradiación de **1c** (y **2c**) fotosensibilizada por acetona

Se preparó una mezcla acetona:agua (38:54 v/v) y se disolvió en ella **1c** 0.5 mM para posteriormente irradiarla ( $300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ ) a través de pyrex en atmósfera inerte. El RMN de protón del crudo de reacción (Fig. 4.16 anexo) puso de manifiesto que tras 18 h de irradiación i) el grado de conversión era pequeño y ii) se habían formado nuevos fotoproductos que se procedió a aislar y caracterizar. El fotoproducto mayoritario, **1e-3**, se identificó como el derivado acetónico de **1c** (Fig. 4.8), equivalente al identificado previamente tras irradiar Tmd en las mismas condiciones.<sup>5</sup> Además se obtuvieron los dímeros mixtos uracilo- 5-*tert*-butiluracilo **1e-1** y **1e-2** y el fotoproducto fruto de una hidrogenación **1e-4** (Fig. 4.8). De nuevo es de destacar la ausencia de DCBs homodímeros, como resultado de la reacción entre dos unidades de **1c**, debido al impedimento estérico provocado por el grupo *tert*-butilo presente en la posición C5.

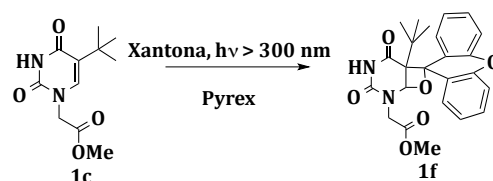
Paralelamente se realizó el experimento con **2c**, obteniéndose los mismos DCBs, **2e-1** y **2e-2** que en el caso de la irradiación usando BP como fotosensibilizador. No se detectó la formación del derivado acetónico correspondiente.



**Fig. 4.8:** Estructuras de los fotoproductos obtenidos tras irradiar con luz  $300\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm}$  una mezcla acetona: ACN que contenía **1c** (5 mM).

#### 4.3.4 Irradiación de **1c** (y **2c**) fotosensibilizada por xantona

Se preparó una disolución ACN:agua (4:1) que contenía 3 equivalentes de **1c** (88 mM) y 1 equivalente de Xan y se irradió a través de pyrex durante 17 h con lámparas  $300\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm}$ . De nuevo el avance de la reacción fue muy limitado tal y como puso de relieve el RMN de protón del crudo de reacción (Fig. 4.17 anexo). El aislamiento del principal fotoproducto de reacción por cromatografía de sílice permitió identificarlo como un oxetano de xantona (Fig. 4.9). La regioquímica pudo ser asignada según el desplazamiento químico del protón H6 ( $\delta = 6.40\text{ ppm}$ ), por analogía a los oxetanos obtenidos tras irradiación con BP. Por otro lado, al igual que en las irradiaciones anteriores, la reacción de **1c** en presencia del fotosensibilizador es mucho más lenta que en el caso de **2c**. Al irradiar **2c** en presencia de Xan se obtuvieron los dímeros **2e-1** y **2e-2**, al igual que en las fotosensibilizaciones con BP y acetona.

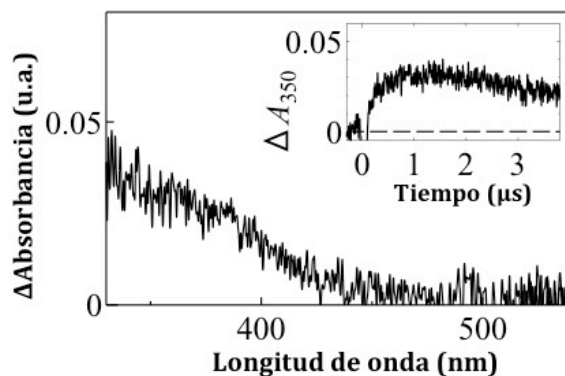


**Fig. 4.9:** Esquema de la irradiación fotosensibilizada de **1c** por xantona y con luz  $300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ .

#### 4.3.5 Fotólisis de destello láser

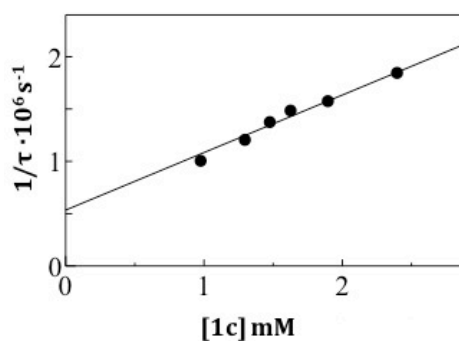
Se preparó una disolución 1.6 mM de **1c** en ACN que además contenía 0.6 M de acetona y se registró el espectro de absorción transitoria tras excitación láser a 308 nm (la absorbancia de la muestra a 308 nm fue de 1.6).<sup>a</sup> El espectro que se obtuvo (Fig. 4.10) es muy similar al descrito para el triplete del monofosfato de timidina: una banda desestructurada con que se extiende hasta los 420 nm.<sup>13</sup> La variación de la absorbancia que se observa es muy pequeña, de 0.03, indicando que se forma poco triplete y/o que el coeficiente de absorción molar del mismo es muy bajo. La evolución de la señal a 350 nm se presenta en la inserción de la Fig. 4.4. La constante de formación del triplete de **1c** resultó ser de  $1.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ .

<sup>a</sup> Estos experimentos en particular se hicieron en colaboración con el Dr. Minoru Yamaji en la Universidad de Gunma de Japón.



**Fig. 4.10:** Espectro de absorción transitoria obtenido 1.3  $\mu\text{s}$  tras el pulso láser ( $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$ ) de una muestra que contiene 0.6 M de acetona y 1.6 mM de **1c** en acetonitrilo a 285 K. Inserción: perfil de tiempo registrado a 350 nm.

El experimento se llevó a cabo variando la concentración de **1c** entre 1 y 2.4 mM (Fig. 4.11). La representación de las inversas de los tiempos de vida frente a la concentración se ajustó una recta de cuya pendiente se pudo determinar que la constante de desactivación del triplete de la acetona por **1c** es de  $5.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor, no muy alto, indica que la energía de triplete de **1c** está muy cerca de la de la acetona ( $E_T = 332 \text{ kJ/mol}$ ), seguramente entre 4 y 8 kJ/mol.

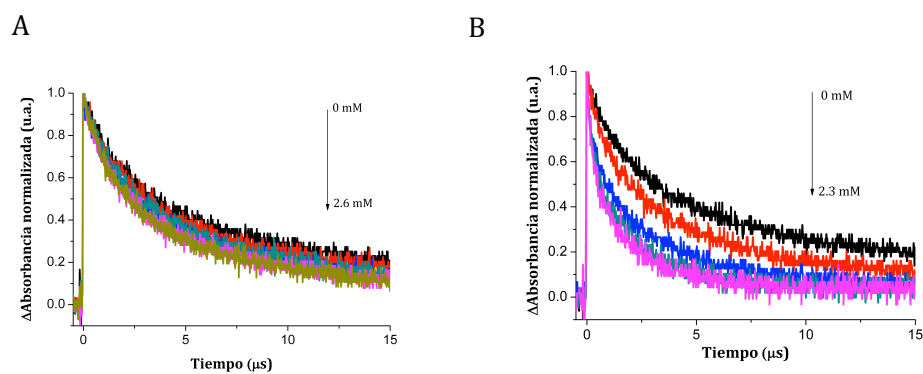


**Fig. 4.11:** Representación Stern-Volmer de la inversa de los tiempos de vida del estado triplete excitado de acetona en función de la concentración de **1c**.



#### 4.3.5.1 Desactivación de los estados excitados tripletes de benzofenona y xantona por **1c**

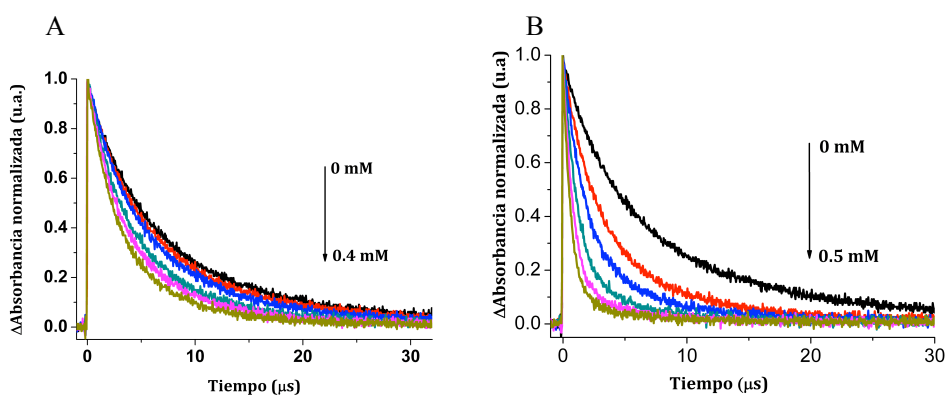
Se preparó una disolución de BP en ACN a la que se añadieron cantidades crecientes de **1c** (de 0 a 2.6 mM, absorbancia final a 355 nm aprox. de 0.3) y se registró la señal correspondiente a su estado excitado triplete a 530 nm. Como se aprecia en la Fig. 4.12A, no existe una variación significativa del tiempo de vida de  $^3\text{BP}^*$  en presencia de **1c**, a diferencia del experimento realizado con **2c** (Fig. 4.12B).



**Fig. 4.12:** Desaparición de la señal de absorción del triplete de BP registrado a 530 nm tras excitación láser a 355 nm con cantidades crecientes de A) **1c** (0.5 mM a 2.6 mM) y B) **2c** (de 0.7 mM a 3.4 mM).

A partir de la representación Stern-Volmer se calculó una  $k_q$  del triplete de BP por **2c** de  $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , consistente con la publicada para la desactivación del  $^3\text{BP}$  por Tmd.<sup>9</sup>

También se realizaron experimentos de desactivación de  $^3\text{Xan}^*$ . Así pues, a una disolución de Xan se añadieron cantidades crecientes de **1c** (de 0.05 mM a 0.43 mM) y **2c** (de 0.08 mM a 0.52 mM). La cinética se registró a 612 nm observando, a diferencia de BP, que **1c** sí desactiva  $^3\text{Xan}^*$  (Fig. 4.13A). Al representar la inversa del tiempo de vida en presencia de **1c** se determinó una  $k_q$  de  $3.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Para el caso de **2c** esta fue de  $2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 4.13B).



**Fig. 4.13:** Desaparición de la señal de absorción del triplete de xantona registrado a 612 nm tras excitación láser a 355 nm con cantidades crecientes de A) **1c** (hasta 0.4 mM) y B) **2c** (hasta 0.5 mM).

## 4.4 Conclusiones

La presencia de un grupo voluminoso en C5 de uracilo provoca diferencias en su fotoquímica durante los procesos de fotosensibilización. En presencia de tres sensibilizadores (acetona, BP, Xan), se ha observado una disminución notable de la fotorreactividad de la molécula **1c** con respecto a la timina análoga **2c**.

Según los resultados obtenidos, la presencia del grupo *tert*-butilo en la estructura de **1c** no provoca divergencia alguna en la regioquímica de los oxetanos que se obtienen en irradiaciones con BP. La irradiación de acetona en presencia de **1c** da lugar a la formación del derivado acetónico, dímeros mixtos uracilo-5-*tert*-butiluracilo y un fotoproducto fruto de una hidrogenación. En el caso de Xan se aísla como único fotoproducto un oxetano.

## 4.5 Sección experimental

### 4.5.1 Fotólisis de destello láser

En la espectroscopía de absorción transitoria las muestras se excitaron con un láser Nd:YAG ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ). Se preparó una disolución de BP en ACN:H<sub>2</sub>O (4:1 v/v). A esta disolución se añadieron cantidades crecientes de **1c** (0-2.61 mM) o **2c** (0- 3.25 mM). En todas las disoluciones la absorbancia a 355 nm fue de 0.3. En el caso de Xan las cantidades añadidas de **1c** y **2c** fueron hasta 0.43 mM y 0.52 mM, respectivamente.

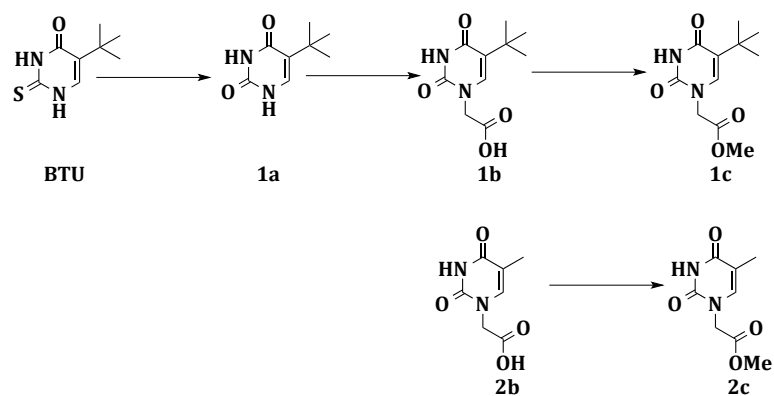
Para registrar el espectro de absorción transitoria de **1c** se empleó el láser Xe/HCl ( $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$ ). Se preparó una disolución de **1c** en ACN (1.6 mM) que contenía 0.6 M de acetona. La absorbancia de la muestra a 308 nm fue de 1.6. También se preparó una disolución de acetona (0.6 M) en la que se introdujeron cantidades crecientes de **1c** (entre 1 y 2.4 mM). Las señales fueron registradas a 350 nm.

## 4.5.2 Síntesis de los compuestos

### 4.5.2.1 General

Metanol, ACN (grado HPLC), AcOEt y hexano fueron adquiridos de Scharlau. La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice de 60 Å CC 35-70 μm como fase estacionaria, adquirida de Merck y usando disolventes de grado analítico obtenidos de Scharlau. El ácido cloroacético y el bromoacetato de etilo fueron de Sigma-Aldrich.

### 4.5.2.2 Esquema sintético de **1c** y **2c**

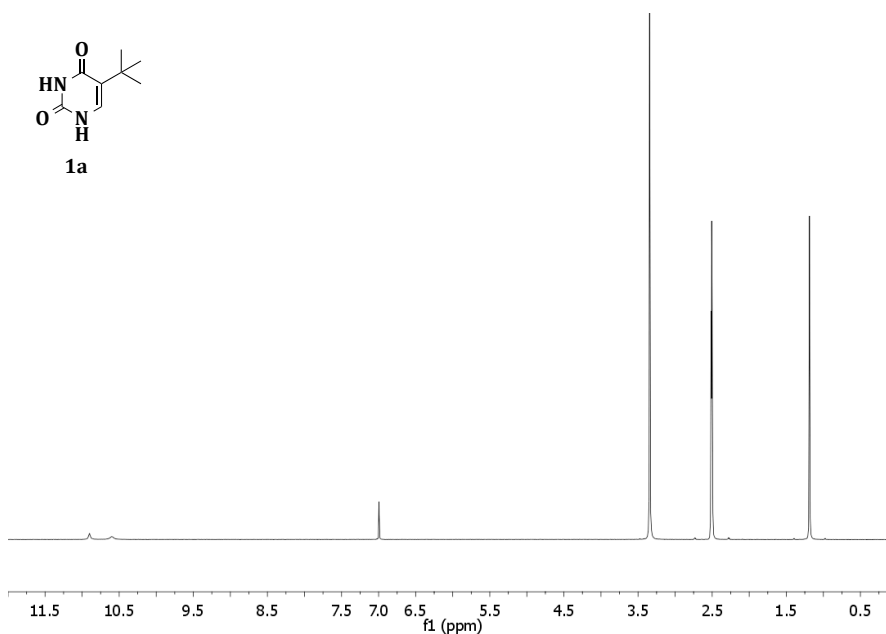


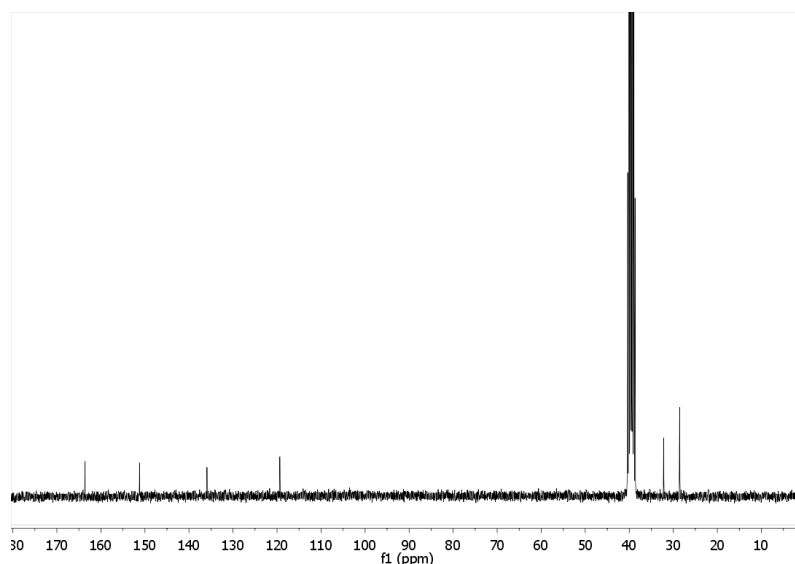
#### 4.5.2.3 Síntesis de **1a**

el compuesto BTU se sintetizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3. A continuación **1a** fue preparado y purificado según el siguiente procedimiento previamente publicado:<sup>14</sup> Una mezcla de BTU, ácido cloroacético y agua en la proporción 1:3:40 (volumen) se calentó a reflujo hasta que el producto de partida se consumió (la reacción se siguió por capa fina, eluyente ACOEt. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y luego se dejó en el frigorífico durante unas horas. El compuesto cristalino formado se recolectó por succión y se lavó con pequeñas cantidades de agua para obtener **1a**.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.00 (s, 1H), 1.19 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 163.6, 151.2, 135.9, 119.4, 32.2 y 28.5. **HRMS (MH<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 169.0969 encontrada 169.0977.

#### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **1a**



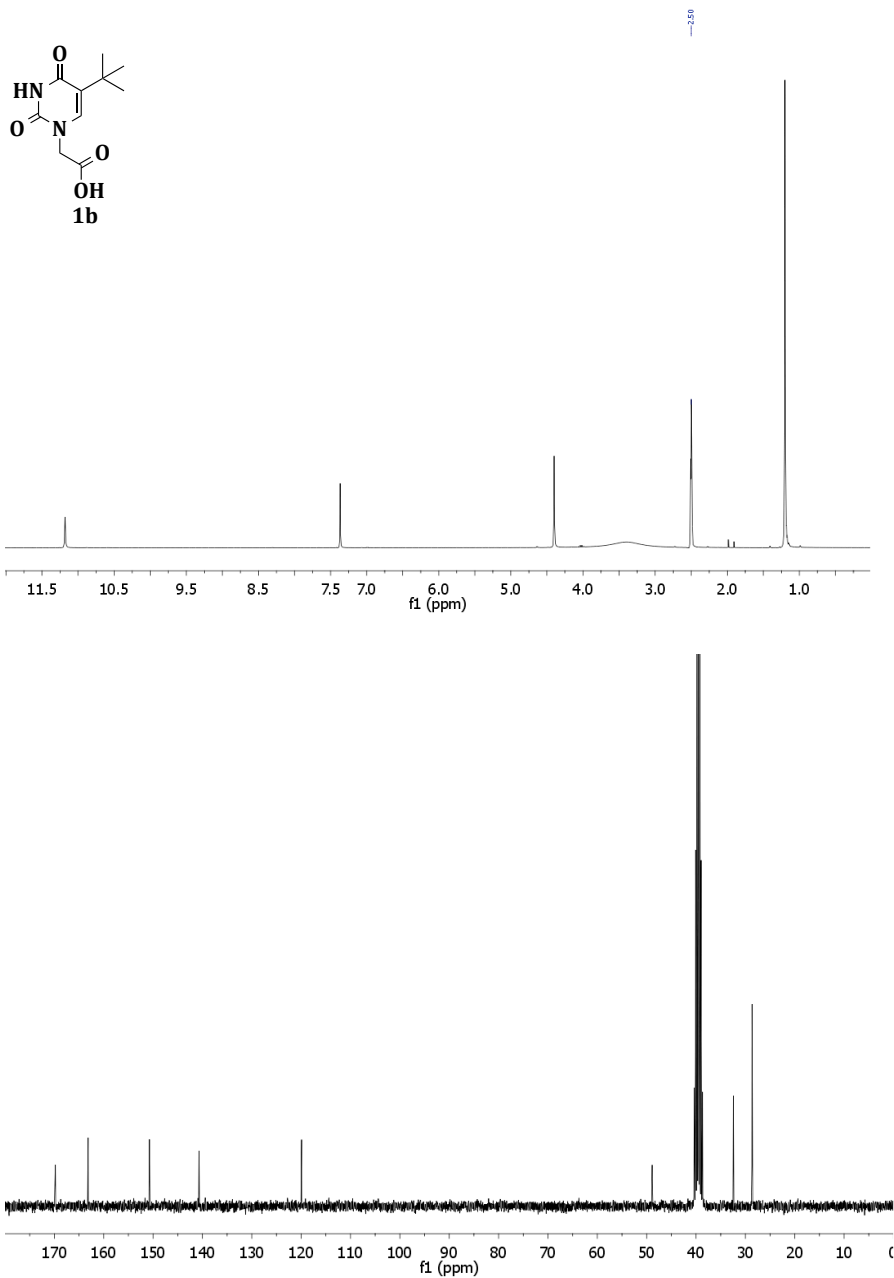


#### 4.5.2.4 Síntesis de **1b**

A una suspensión de 13 mL de H<sub>2</sub>O conteniendo **1a** (1.0 g, 6.0 mmol) se le añadió una disolución acuosa 2N de KOH (13 mL). La mezcla se agitó hasta que la disolución fue transparente. Bromoacetato de etilo (2 equivalentes) se añadió a la reacción gota a gota y después se sometió a reflujo durante toda la noche. La reacción se enfrió y se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1. El producto cristalizado se lavó con HCl 1N, agua y se secó a vacío, obteniendo **1b** (0.8 g, 3.54 mmol). Rendimiento 65 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.18 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 1.19 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 169.7, 163.1, 150.7, 140.6, 119.8, 48.8, 32.4 y 28.6. **HRMS (MH<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 227.1032, encontrada 227.1039.

### Espetros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto **1b**

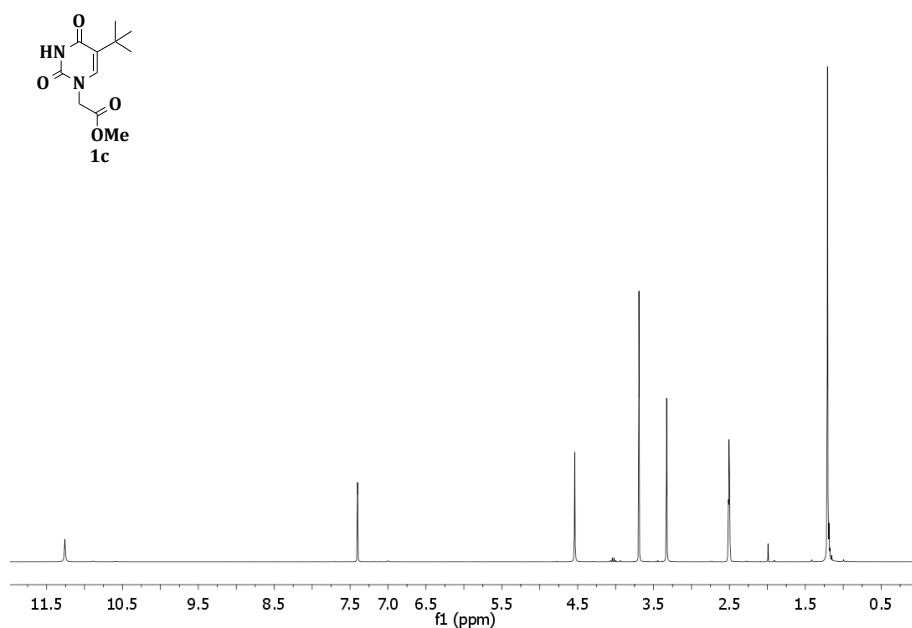


#### 4.5.2.5 Síntesis de **1c** y **2c**

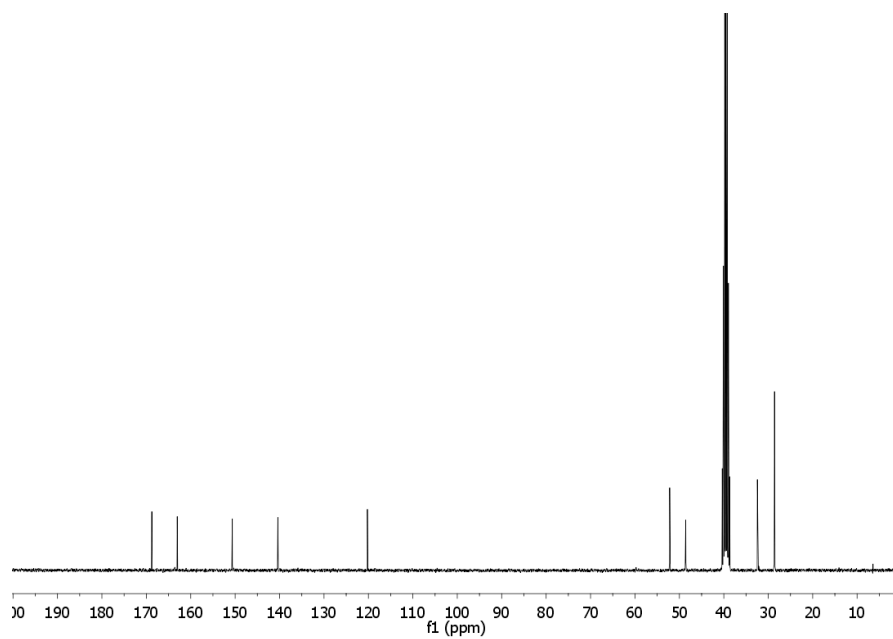
A una disolución de **1b** (0.2 g, 0.9 mmol) o **2b** (0.2 g, 1.1 mmol) en metanol (5 mL) se le añadió ácido sulfúrico (0.5 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante toda la noche. El disolvente se evaporó bajo presión reducida. El sólido que se obtuvo se disolvió en AcOEt, se lavó con una disolución saturada de NaCl (3x) y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. El compuesto se obtuvo como un sólido blanco en los dos casos: **1c** (0.2 g, 0.8 mmol) o **2c** (0.2 g, 1.0 mmol). Rendimiento 72 % y 90 %, respectivamente.

**<sup>1</sup>H NMR** de **1c** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.26 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 4.54 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 1.21 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 168.8, 163.0, 150.6, 140.4, 120.2, 52.2, 48.6, 32.5 y 28.6. **HRMS (MH<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 241.1181, encontrada 241.1188.

#### Espectro <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **1c**

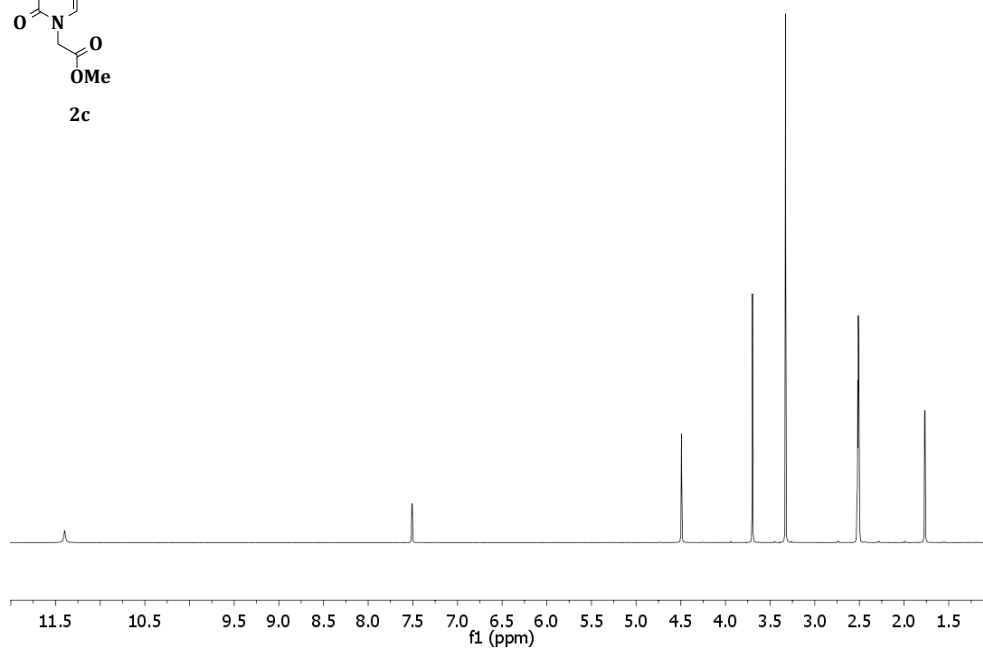
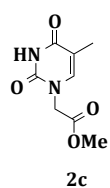






**<sup>1</sup>H NMR** de **2c** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.42 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 1.77 (s, 3H). **HRMS (MH<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 199.0717 encontrada 199.0719.

**Espectro <sup>1</sup>H del compuesto 2c**



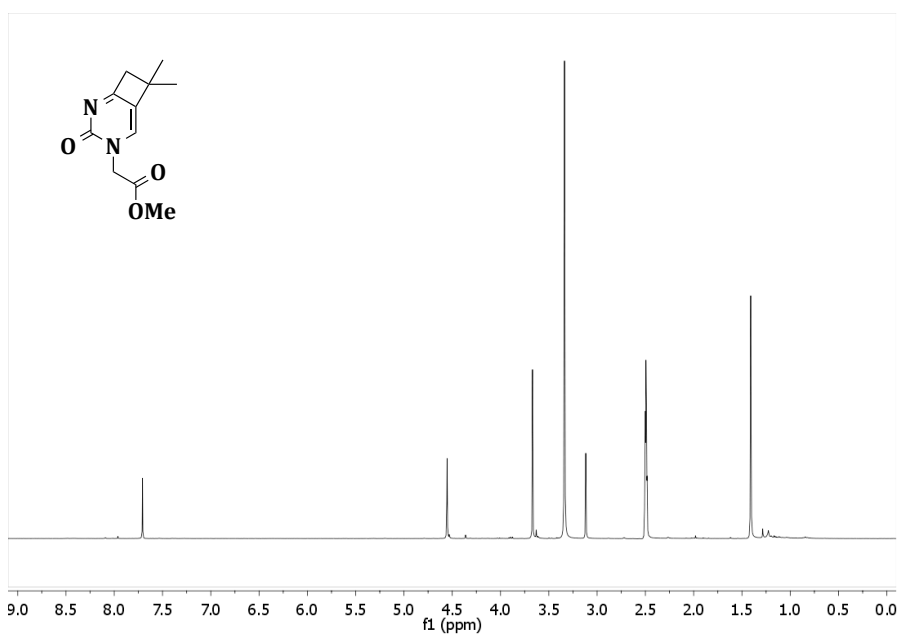
### 4.5.3 Procedimiento de las irradiaciones

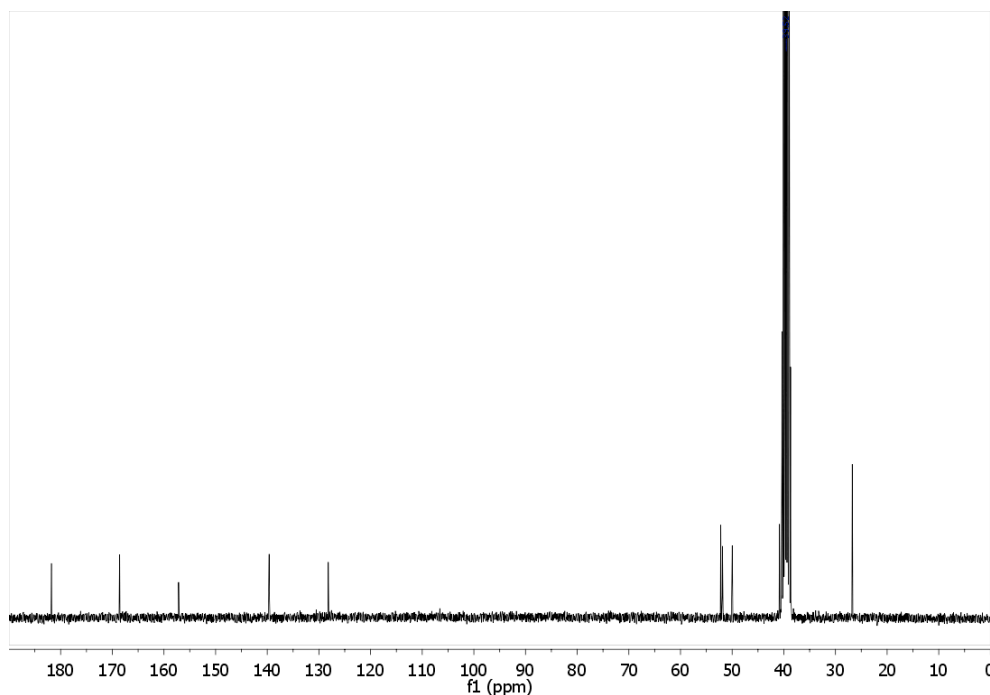
#### 4.5.3.1 Irradiación directa de **1c**

El compuesto **1c** (10 mg, 41.7  $\mu\text{mol}$ ) en ACN (30 mL) fue irradiado a 254 nm con un fotorreactor (Rayonet). La reacción se monitorizó mediante espectrometría UV. Cuando la nueva banda que se forma con  $\lambda_{\text{max}}$  a 315 nm correspondiente al cromóforo de pirimidona llegó a su máximo de absorbancia la disolución irradiada se evaporó a vacío. Rendimiento 99%.

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.70 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.12 (s, 2H), 1.40 (s, 6H);  **$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  181.7, 168.5, 157.2, 139.7, 128.4, 54.5, 52.2, 51.9, 50.0 y 26.7; **HRM ( $\text{M}+\text{H}^+$ )**: Calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$  223.1075, encontrada 223.1083.

#### Espectro $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto





#### 4.5.3.2 Fotosensibilización de **1c** o **2c** en presencia de benzofenona

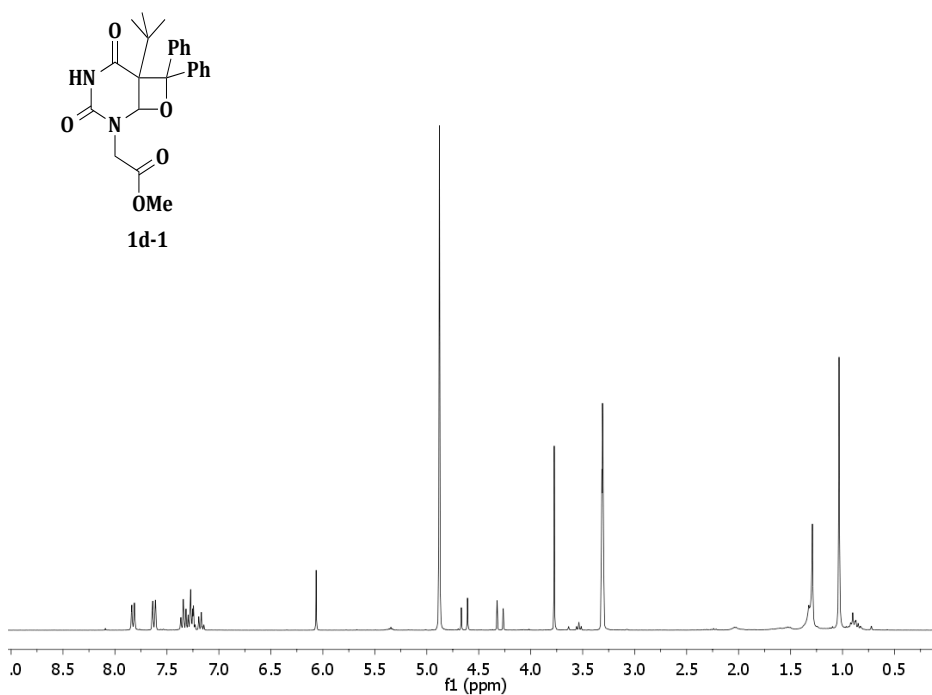
Una disolución que contenía **1c** o **2c** y BP en proporción molar 1:2 en ACN/agua (11:3 v/v) se introdujo en un tubo de pyrex, se purgó durante 30 min con N<sub>2</sub> y se irradió mediante un fotorreactor con lámparas que emiten en la región 300 nm-400 nm. Tras 17 horas de irradiación (o 12 en el caso del compuesto **2c**) el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El crudo de reacción se sometió a cromatografía de sílice utilizando hexano: AcOEt como mezcla de eluyentes (60:40). Dos fracciones conteniendo los dos oxetanos regioisómeros se aislaron y caracterizaron.

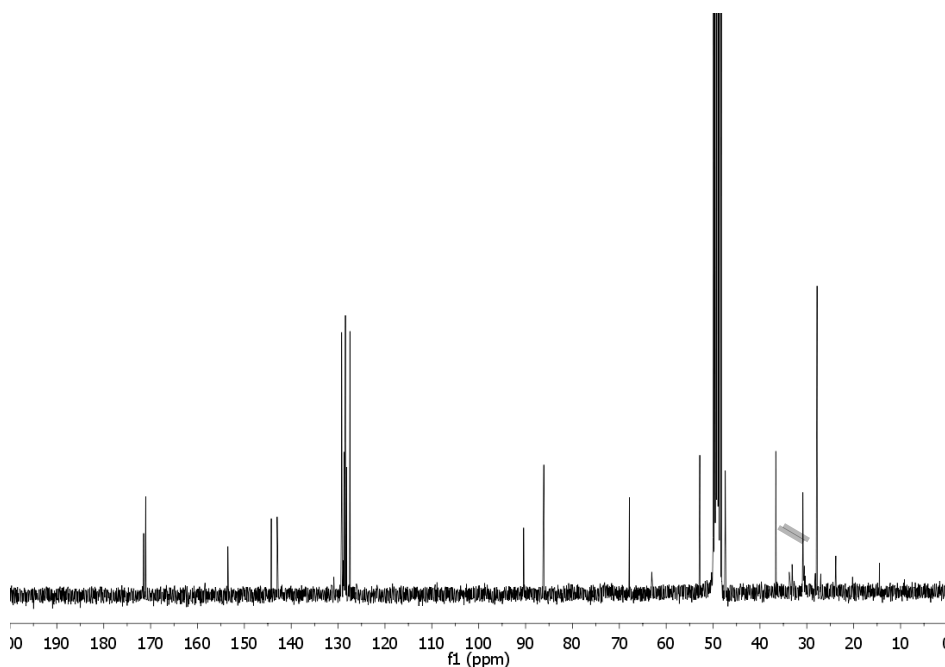
#### 4.5.3.2.1 Fotoproductos obtenidos de **1c**

- Oxetano **1d-1**

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.82 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.43-7.13 (m, 6H), 6.05 (s, 1H), 4.64 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 18 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 1.03 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 171.5, 171.0, 153.5, 144.3, 143.0, 129.3, 128.9, 128.7, 128.4, 128.2, 127.5, 90.4, 86.1, 67.9, 52.8, 47.4, 36.6 y 27.8. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: *m/z* Calculada para C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 445.1763, encontrada 445.1735. Rendimiento 5 %.

#### Espectro <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **1d-1**

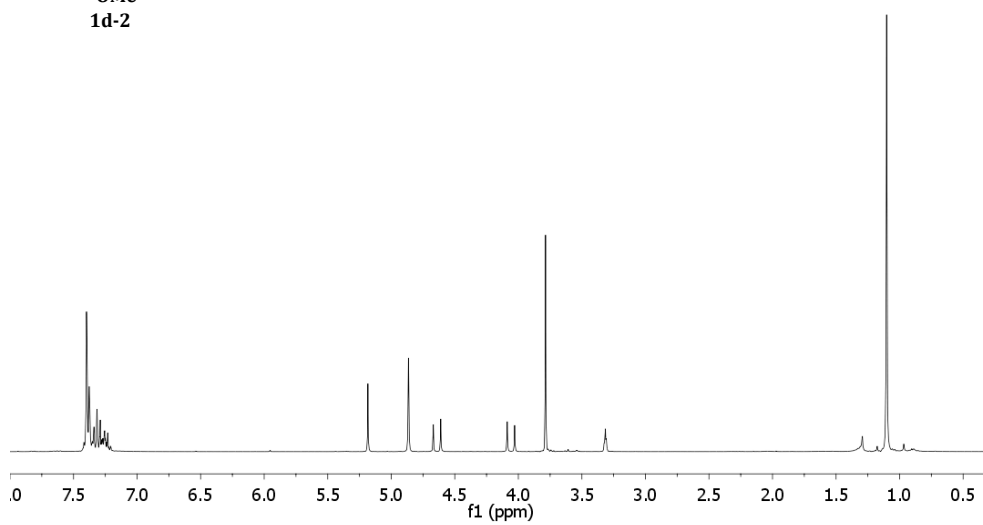
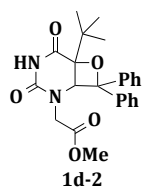


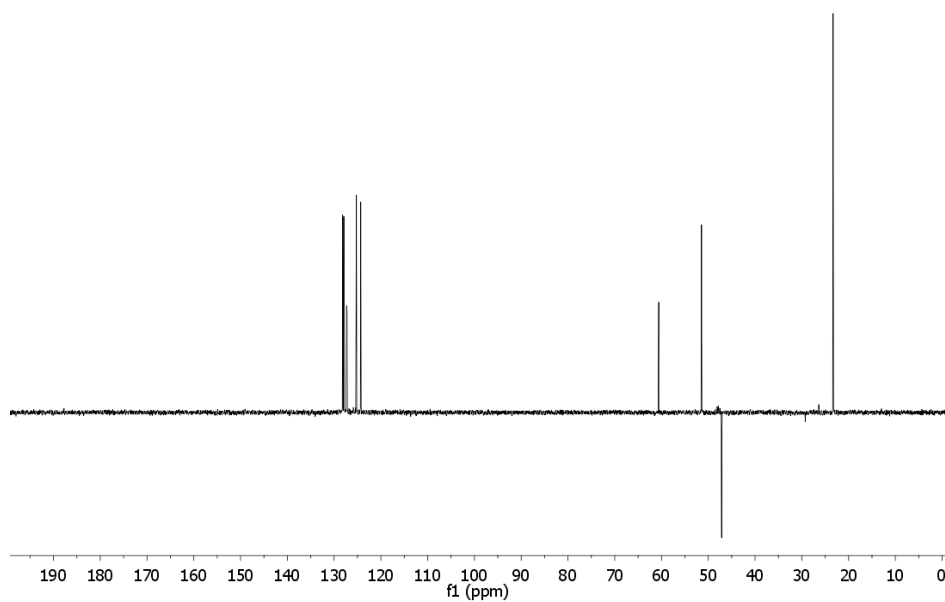
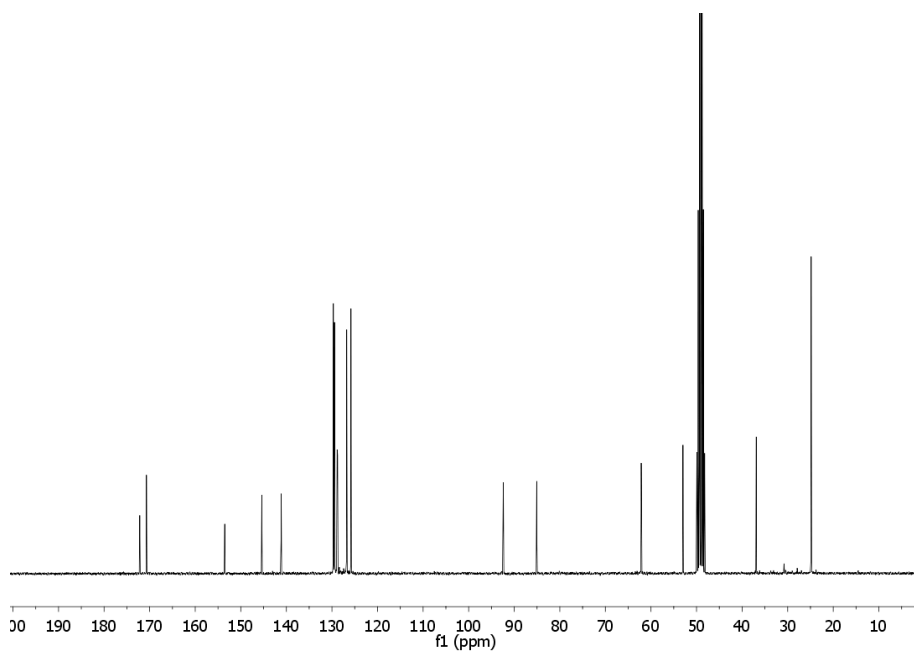


- Oxetano **1d-2**

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{H}}$ : 7.43-7.20 (m, 10H), 5.18 (s, 1H), 4.64 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 18 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 1.13 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 172.2, 170.7, 153.5, 145.4, 141.2, 129.7, 129.5, 128.9, 128.8, 126.7, 125.8, 92.4, 85.1, 62.1, 53.0, 49.9, 36.9 y 24.9. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na 445.1739, encontrada 445.1709. Rendimiento 23 %.

### Espectro $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y dept del compuesto 1d-2





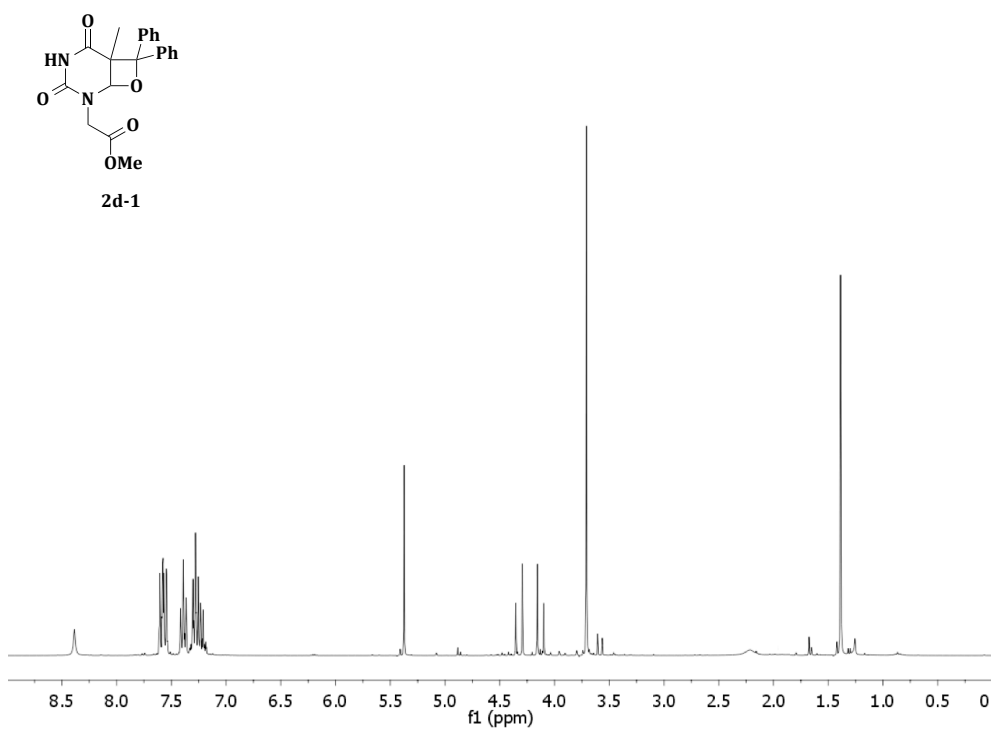


#### 4.5.3.2 Fotoproductos obtenidos de **2c**

- Oxetano **2d-1**

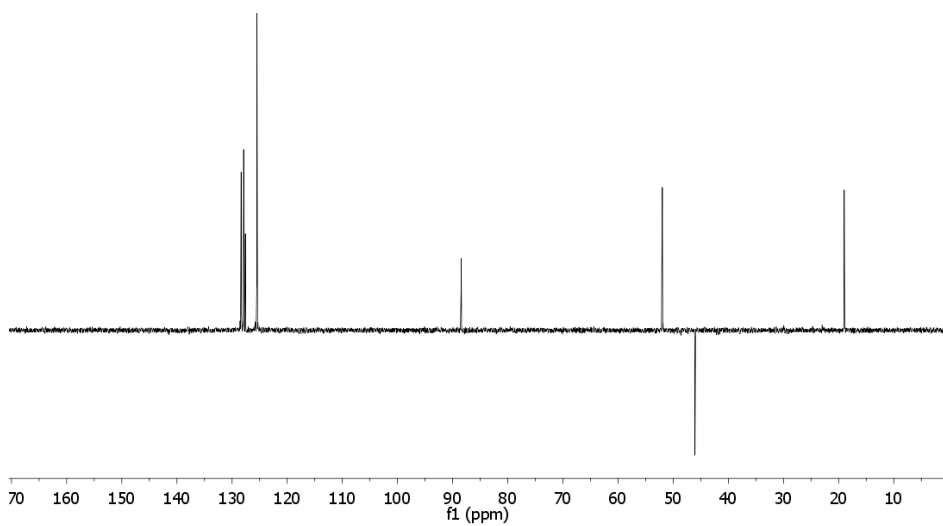
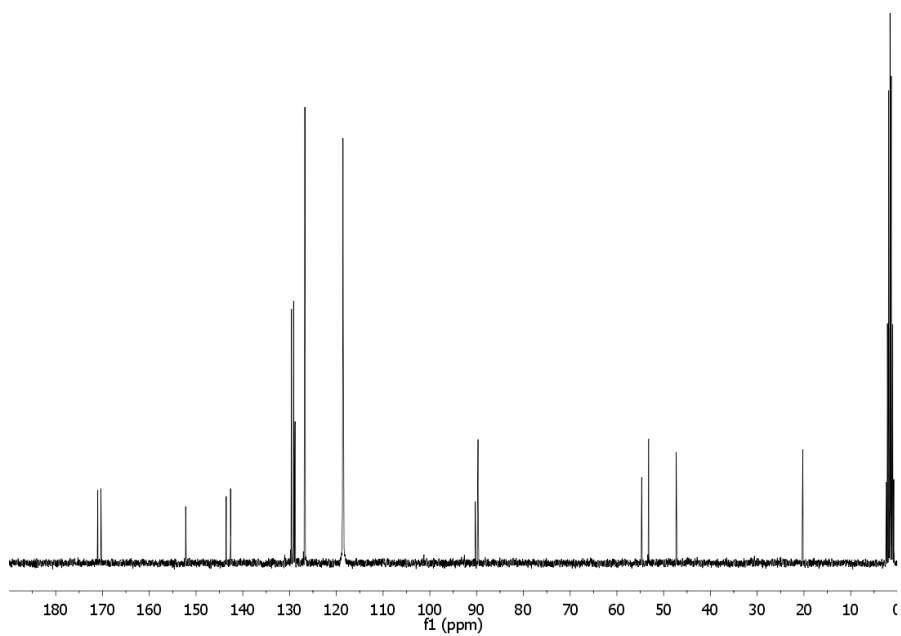
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 8.39 (s, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 4H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 4H), 5.37 (s, 1H), 4.32 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.13 (d, J = 18 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 1.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 171.0, 170.3, 152.2, 143.5, 142.6, 129.6, 129.1, 128.9, 128.8, 126.7, 90.3, 89.7, 54.7, 53.2, 47.3 y 20.3. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 381.1450, encontrada 381.1441. Rendimiento 19 %.

#### Espectro <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y dept del compuesto **2d-1**



Capítulo 4: Efecto del sustituyente en C-5 sobre la fotorreactividad de pirimidinas

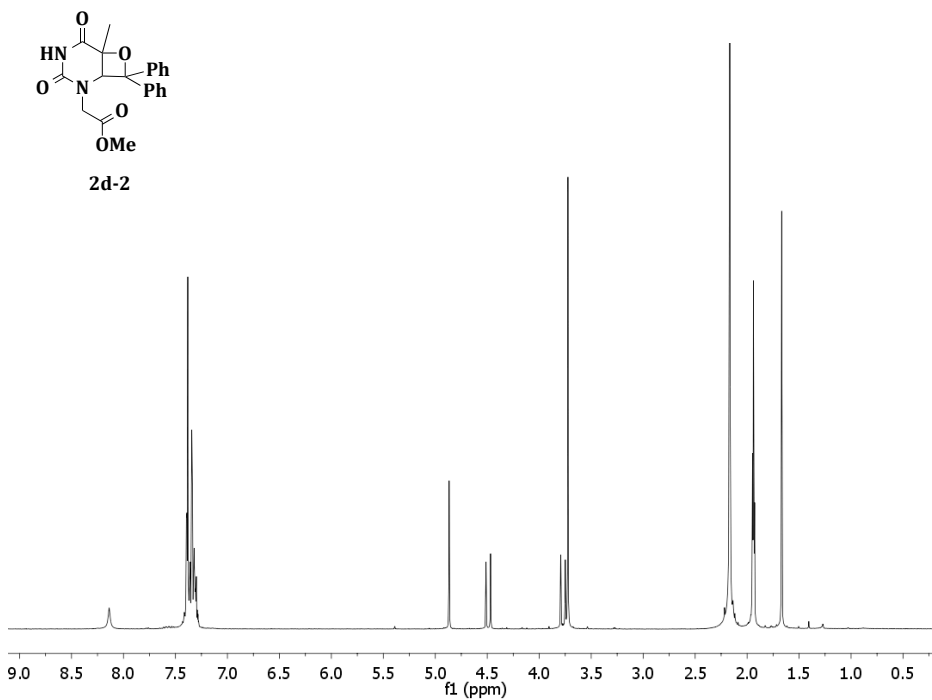
---



• Oxetano **2d-2**

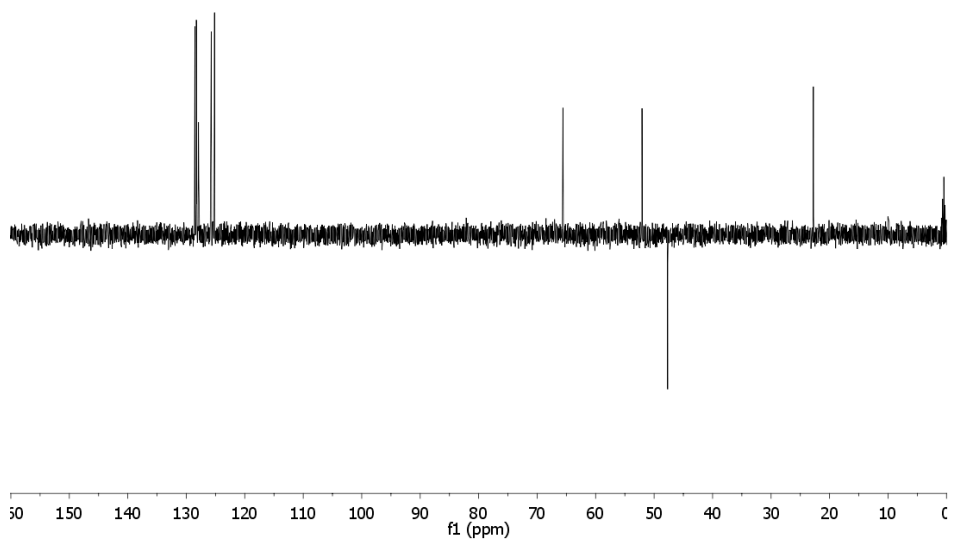
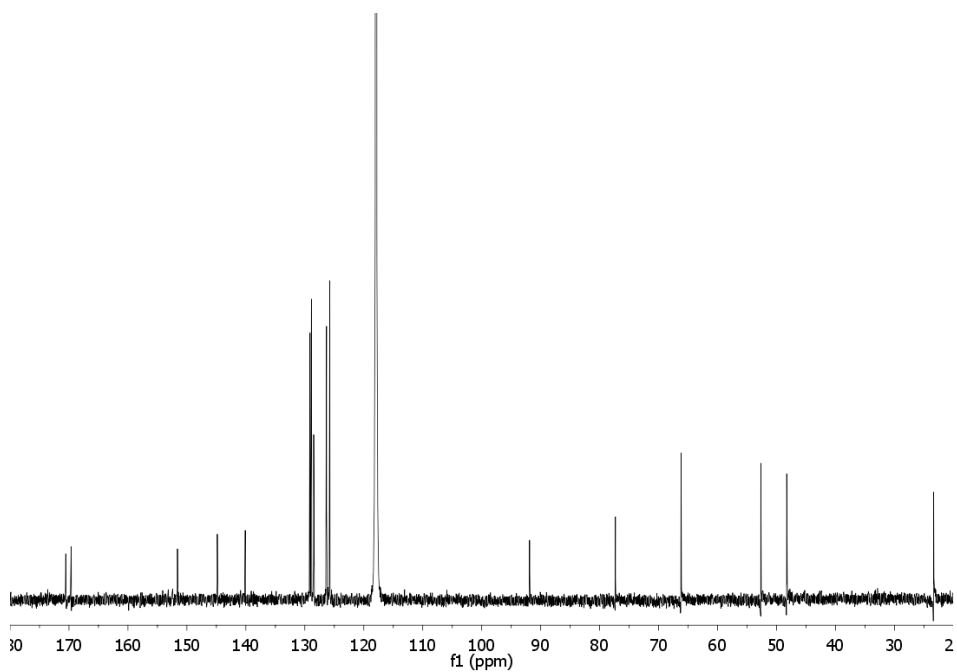
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 8.14 (s, 1H), 7.39-7.28 (m, 10H), 4.87 (s, 1H), 4.49 (d, J = 16 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 16 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 1.67 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 170.5, 169.6, 151.6, 144.8, 140.1, 129.1, 128.9, 128.5, 128.4, 126.3, 125.8, 91.9, 77.3, 66.2, 52.7, 48.3 y 23.3. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)** Calculada para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na 403.1270, encontrada 403.1255. Rendimiento producto 9 %.

**Espectro <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y dept del compuesto 2d-2**



Capítulo 4: Efecto del sustituyente en C-5 sobre la fotorreactividad de pirimidinas

---



#### 4.5.3.3 Fotosensibilización de **1c** o **2c** por acetona

Una disolución de **1c** o **2c** (0.5 mmol) en acetona:agua (38:54 v/v) se dispuso en tubos de pyrex y se purgó con N<sub>2</sub> durante 30 min. La irradiación se llevó a cabo en un fotorreactor usando lámparas que emiten en la región 300 nm-400 nm durante 18 horas. El disolvente se eliminó bajo presión reducida, el crudo de reacción tenía un aspecto aceitoso de color amarillo.

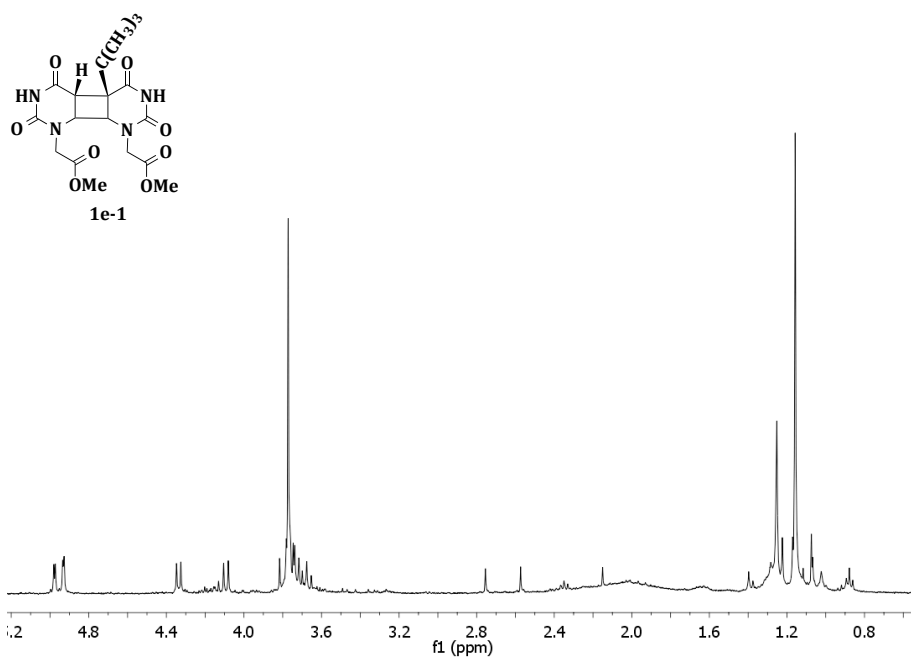
##### 4.5.3.3.1 Fotoproductos obtenidos de **1c**

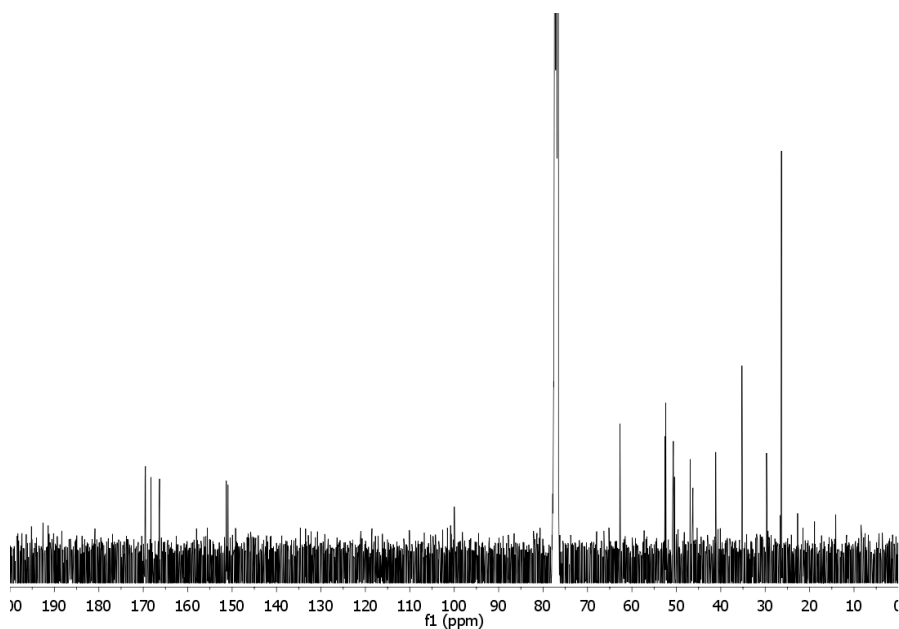
Los fotoproductos resultantes se aislaron mediante HPLC semipreparativo con una mezcla de eluyentes que contenía una disolución acuosa con 25mM de formiato amónico y metanol (60:40). Durante la inyección, la proporción de metanol se aumentó linealmente de 40 a 70 % durante 35 minutos. La elución de los productos se siguió a 220 nm.

- Fotoproducto **1e-1**

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.00-4.90 (m, 2H), 4.34 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 8, 1H), 3.82-3.65 (s+m, 6+3H), 1.16 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.6, 169.5, 168.3, 166.3, 151.3, 150.9, 62.7, 52.5, 50.7, 50.4, 46.9, 46.3, 41.1, 35.2, 29.7 y 26.3. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> 425.1659, encontrada 425.1672. Rendimiento 6 %.

### Espectro $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto 1e-1

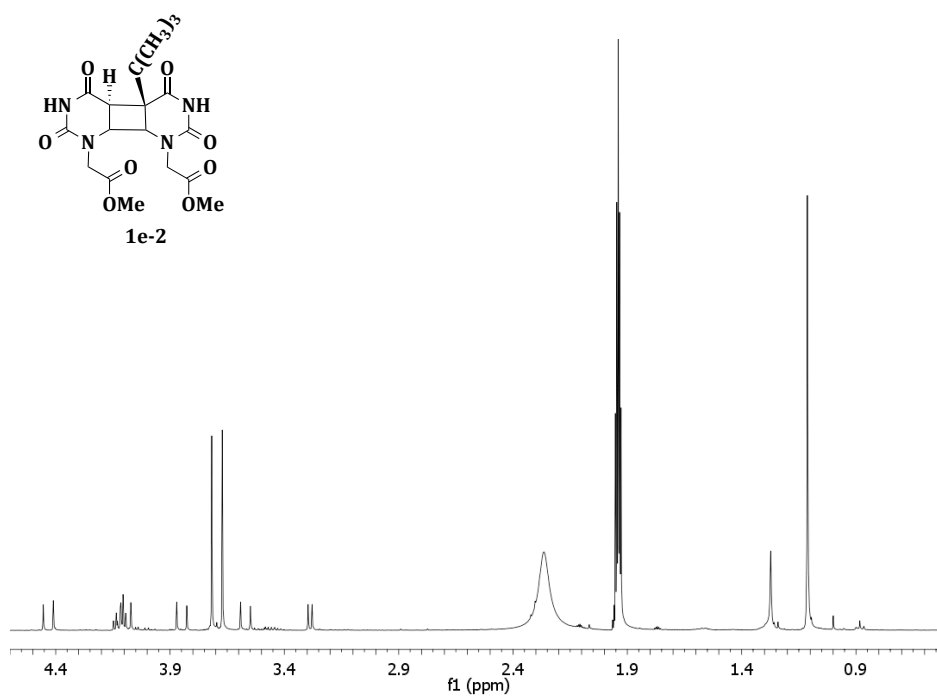




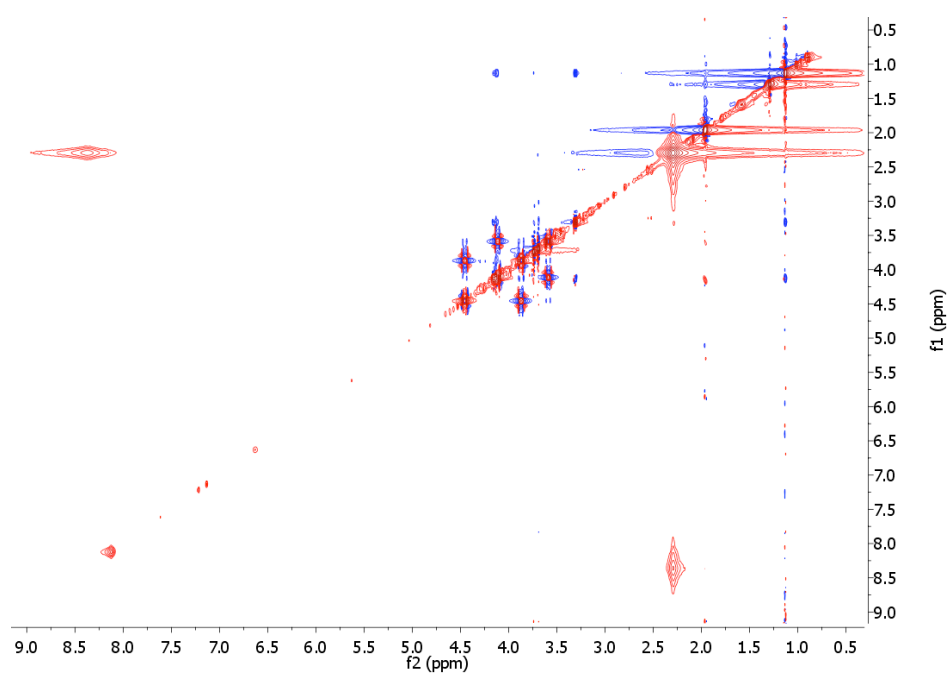
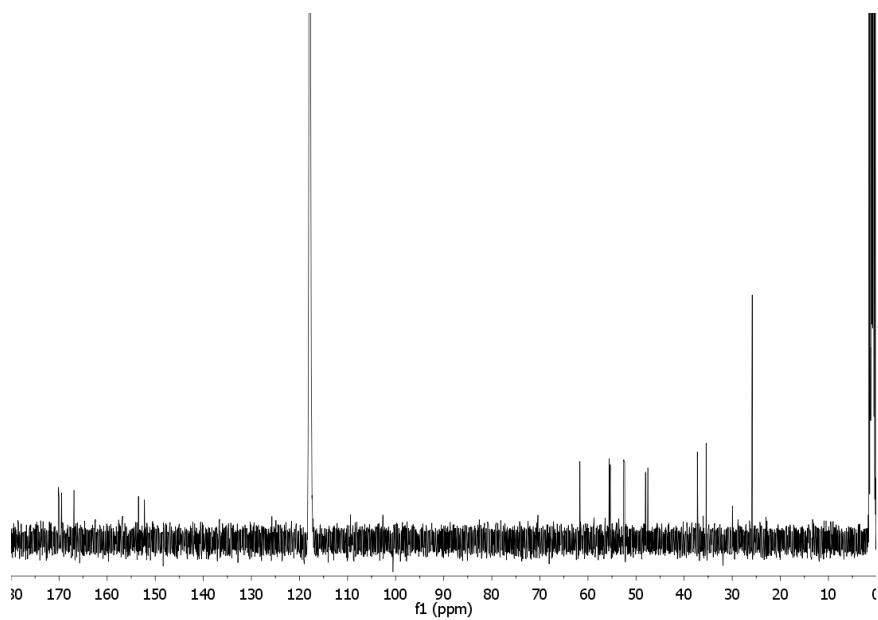
- Fotoproducto **1e-2**

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 4.45 (d, J = 16 Hz, 1H), 4.11 (m, 3H), 3.84 (d, J = 20 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.57 (d, J = 16 Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 1.11 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 170.2, 169.5, 166.9, 153.5, 152.3, 61.7, 55.6, 55.4, 52.4, 48.0, 47.6, 37.3, 35.4 y 25.9. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: *m/z* calculada para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H<sup>+</sup>] 425.1658, encontrada 425.1672. Rendimiento 8 %.

### Espectro $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y NOE del compuesto 1e-2



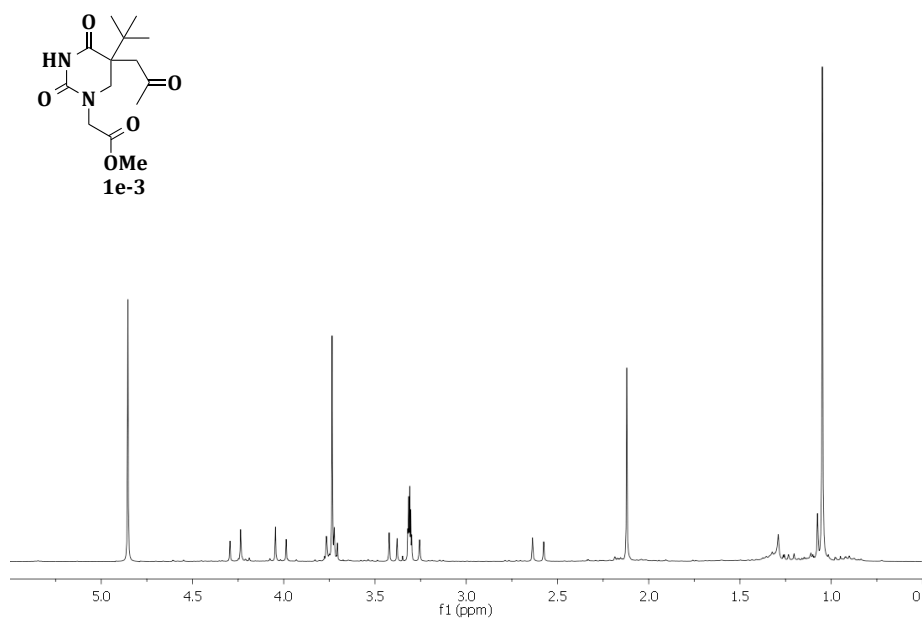


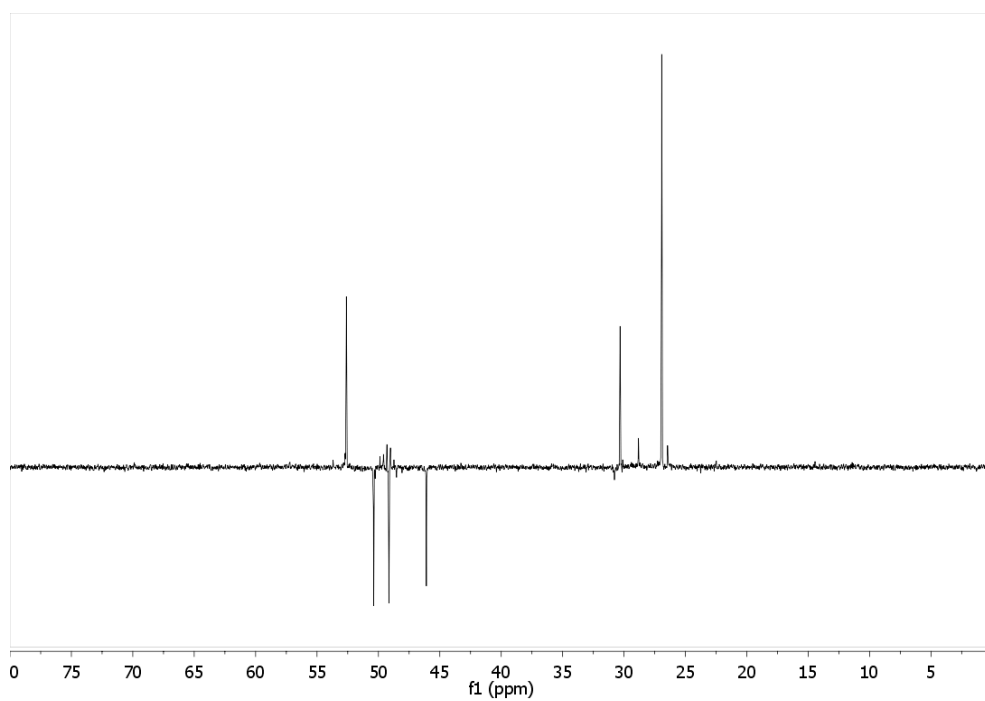
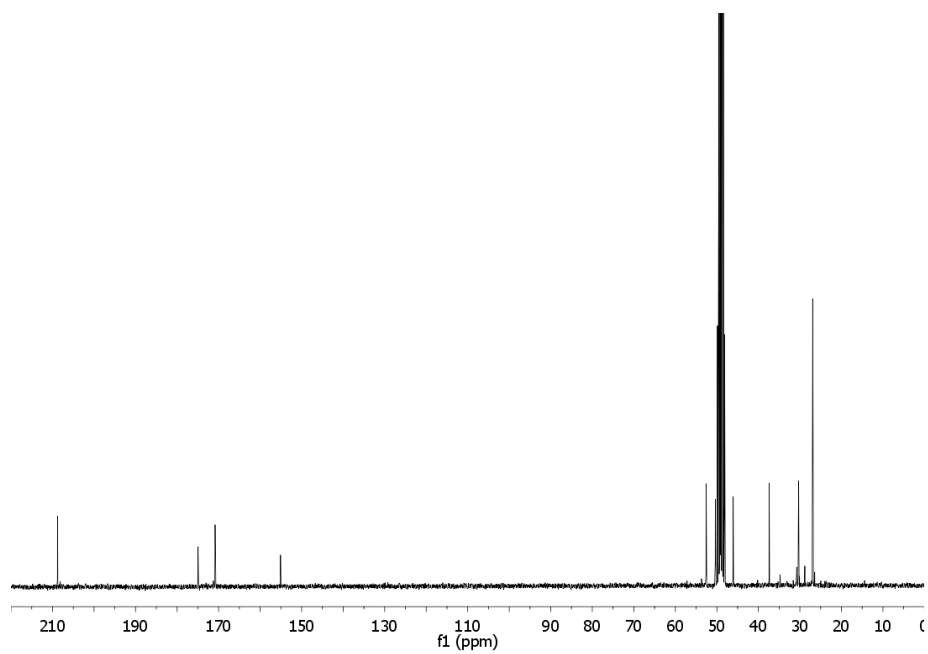


• **Fotoproducto 1e-3**

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 4.26 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 18 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.71 (d, J = 6 Hz, 1H), 3.40 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.26 (s, 1H), 2.61 (d, J = 18 Hz, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.05 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 208.8, 175.0, 170.8, 155.1, 52.6, 50.4, 49.1, 46.1, 37.4, 30.3 y 26.9. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 299.1607, encontrada 299.1601. rendimiento 23 %.

**Espectro <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 1e-3**

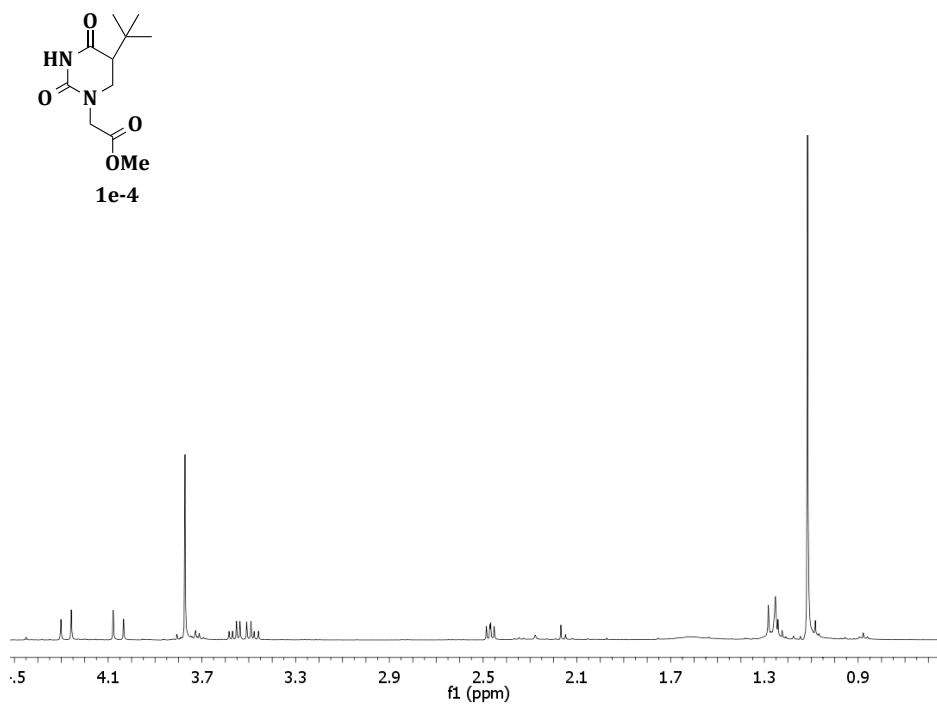


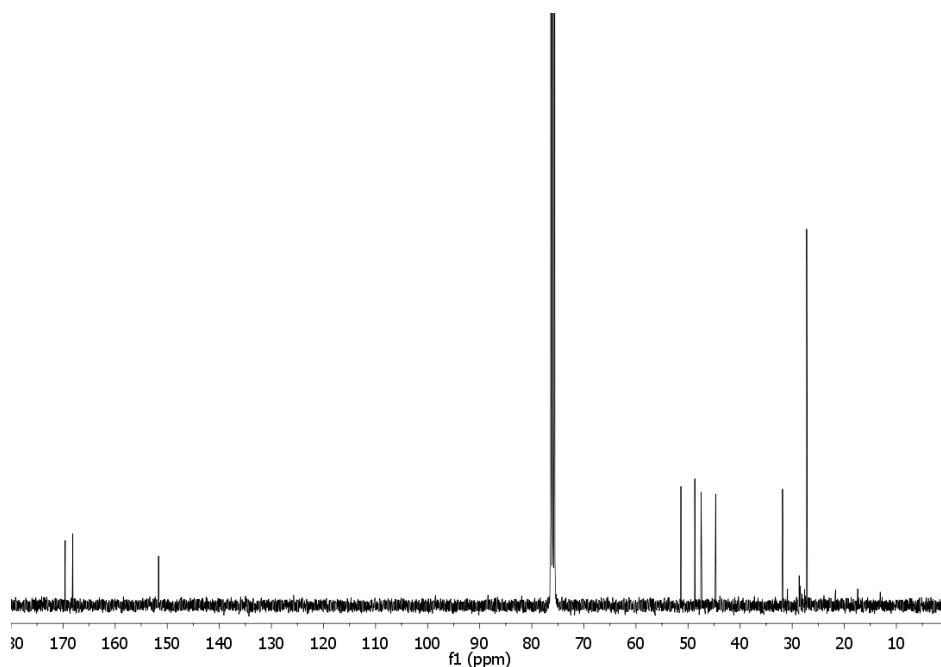


- **Fotoproducto 1e-4**

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub>: 4.28 (d, J = 16 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 16 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.56 (m, 2H), 2.47 (m, 1H), 1.12 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.6, 168.1, 151.7, 51.4, 48.7, 47.5, 44.7, 31.9 y 27.2. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na 243.1345, encontrada 243.1361. Rendimiento 8 %.

**Espectro <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 1e-4**





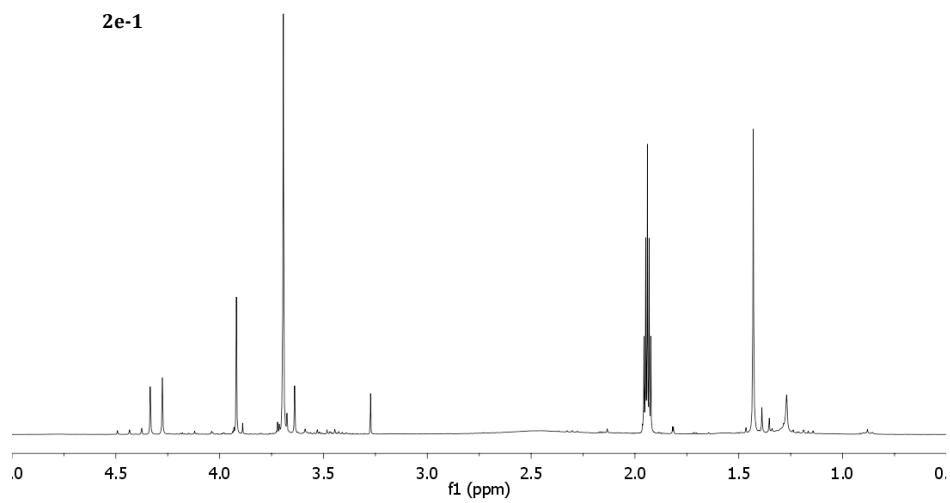
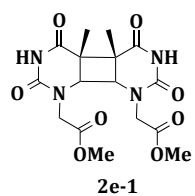
#### 4.5.3.3.2 Fotoproductos obtenidos de **2c**

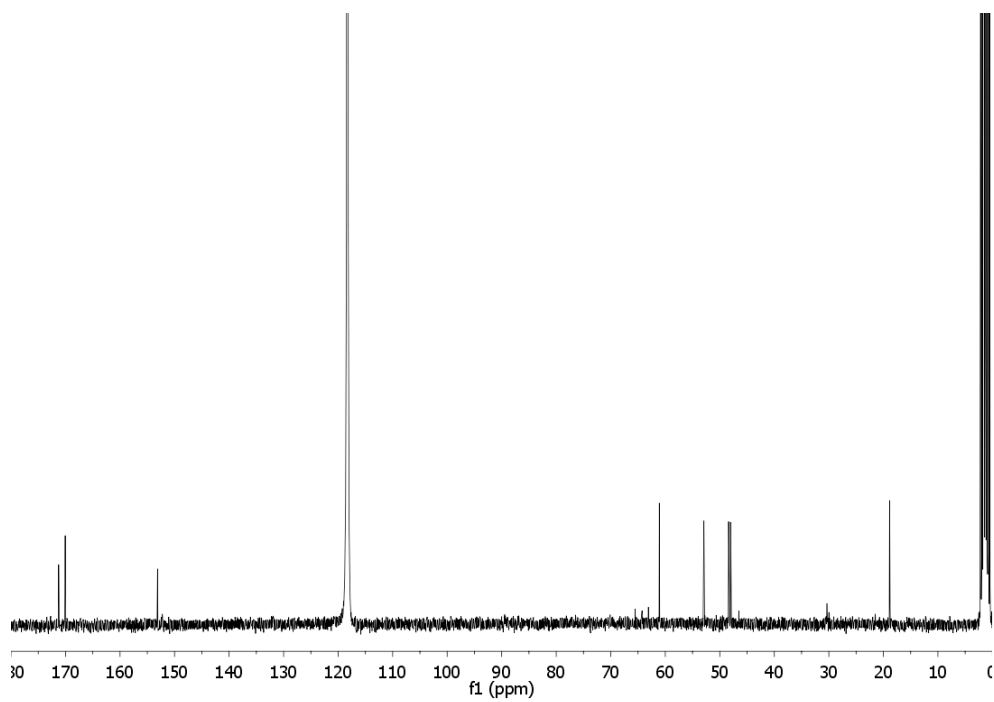
Los fotoproductos resultantes se aislaron mediante HPLC semipreparativo con una mezcla de agua que contenía 25 mM de formiato amónico y metanol (80:20). La cantidad de metanol aumentaba linealmente desde un 20 a un 40% en 35 minutos. La elución de los fotoproductos se siguió a 220 nm. Dos nuevos productos se aislaron y se identificaron como DCBs (**2e-1** y **2e-2**) con un tiempo de retención de 12 min y 21 min, respectivamente.

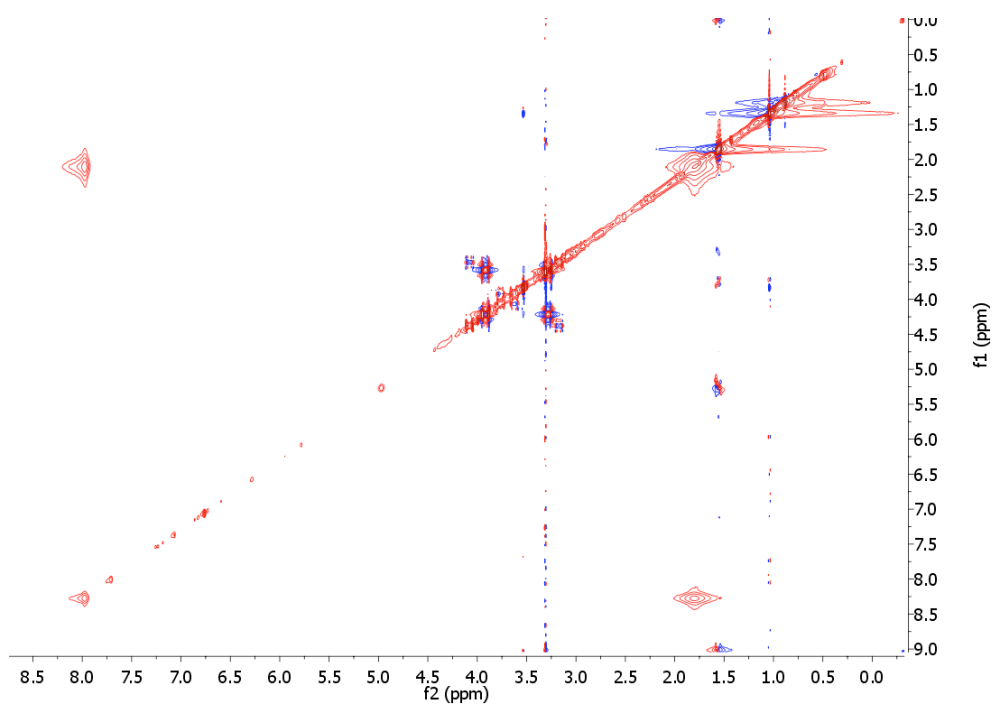
- DCB **2e-1**

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 4.30 (d, J = 15 Hz, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.70-3.64 (d+s, 2+6H), 1.43 (s, 6H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171.3, 170.0, 153.1, 61.1, 52.9, 48.4, 48.0 y 19.0. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> 397.1359, encontrada 397.1342. Rendimiento 8 %.

### Espectro $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y NOE del compuesto 2e-1





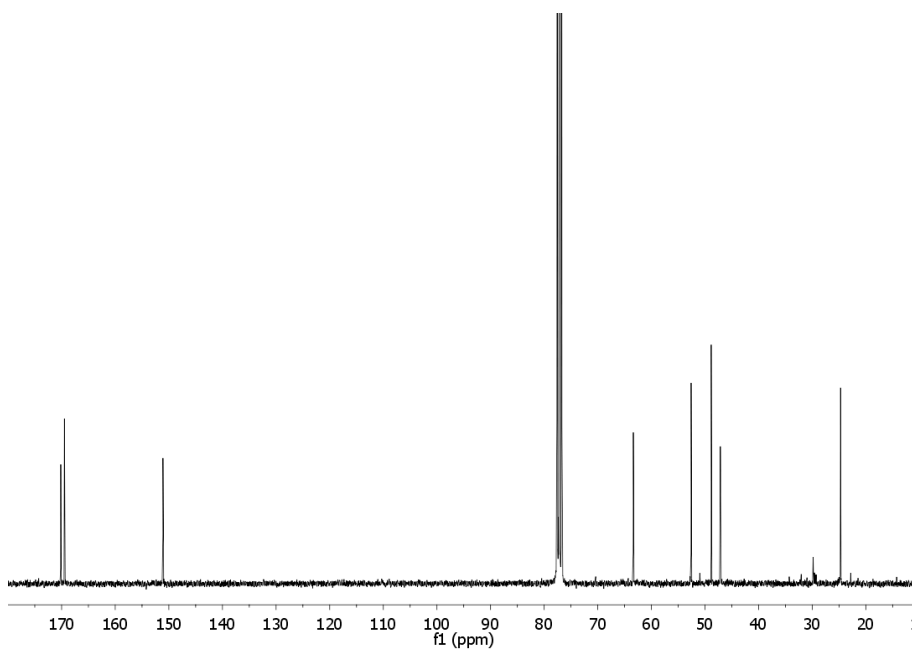
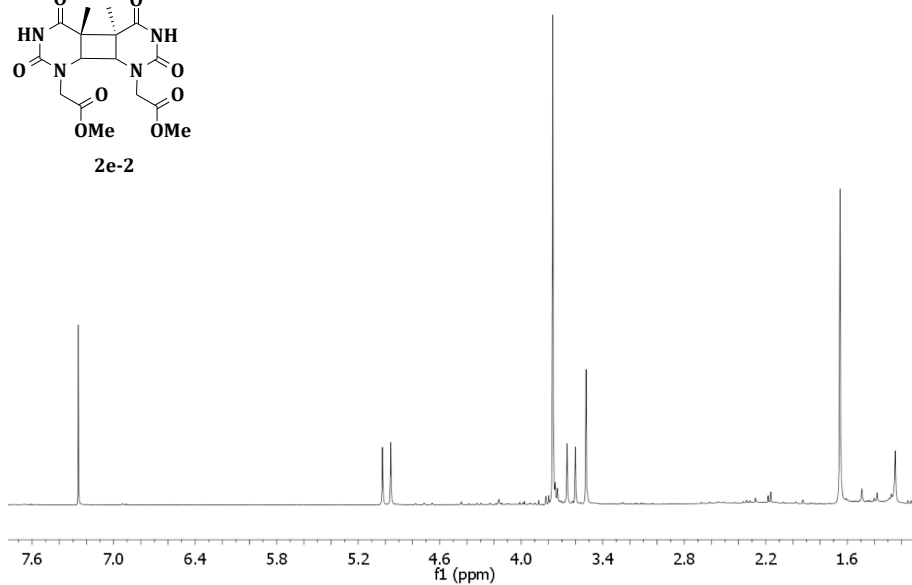
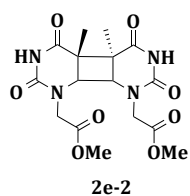


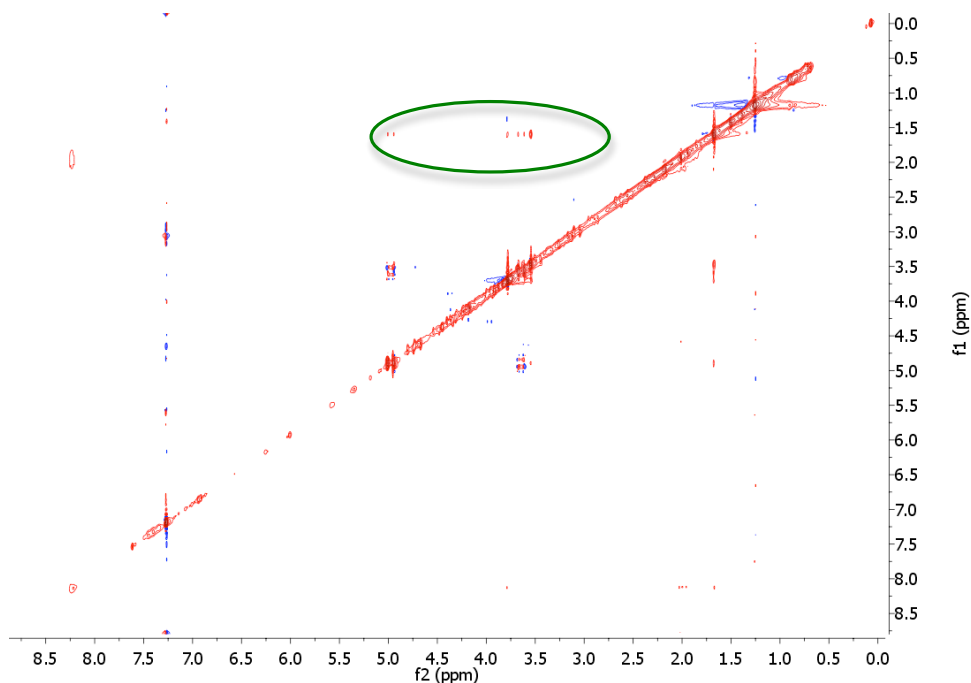
- DCB **2e-2**

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.99 (d, J = 18 Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.63 (d, J = 18 Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 1.65 (s, 6H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.2, 169.5, 151.1, 63.4, 52.6, 48.8, 47.1 y 24.7. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> 397.1359, encontrada 397.1345. Rendimiento 9 %.



### Espectro $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y NOE del compuesto 2e-2





#### 4.5.3.4 Fotosensibilización de **1c** o **2c** por xantona

Una disolución de ACN-H<sub>2</sub>O (11:3 v/v) que contenía xantona y **1c** o **2c** en proporción molar 1:3 se dispuso en tubos de pyrex, se purgó con N<sub>2</sub> durante 30 min y se irradió en un fotorreactor con lámparas que emiten en la región 300 nm <  $\lambda$  < 400 nm durante 17 horas (o 12 horas en el caso de **2c**). El disolvente del crudo de reacción se rotaevaporó bajo presión reducida.

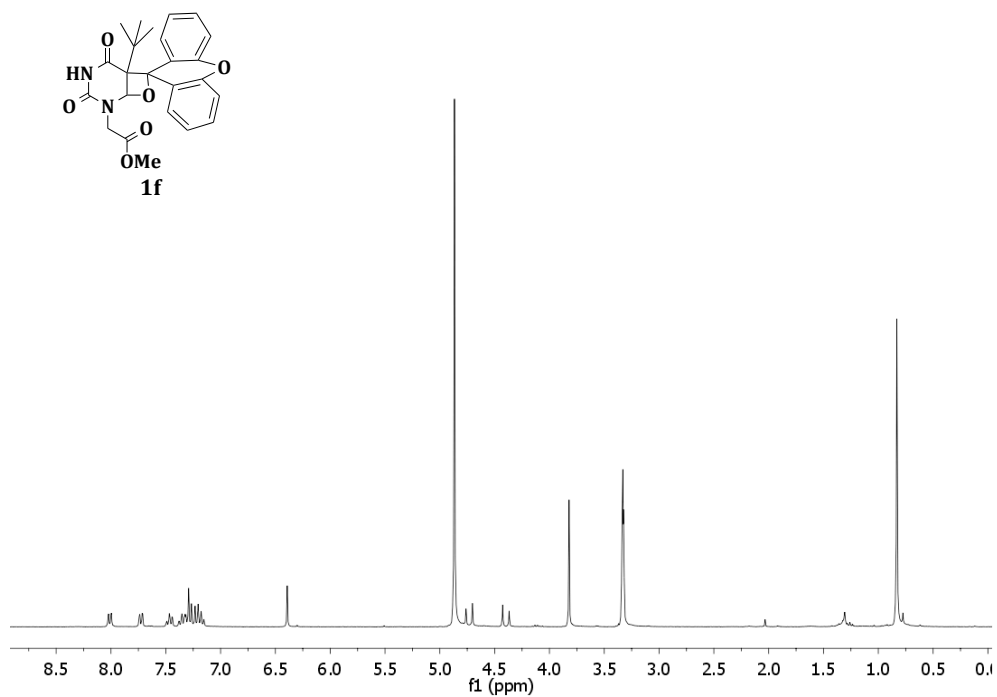
##### 4.5.3.4.1 Fotoproductos obtenidos de **1c**

El crudo de la irradiación se sometió a cromatografía de sílice utilizando AcOEt y hexano como eluyentes (70:30), obteniendo **1f** como un único fotoproducto. Rendimiento 16.4 %.

- Fotoproducto **1f**

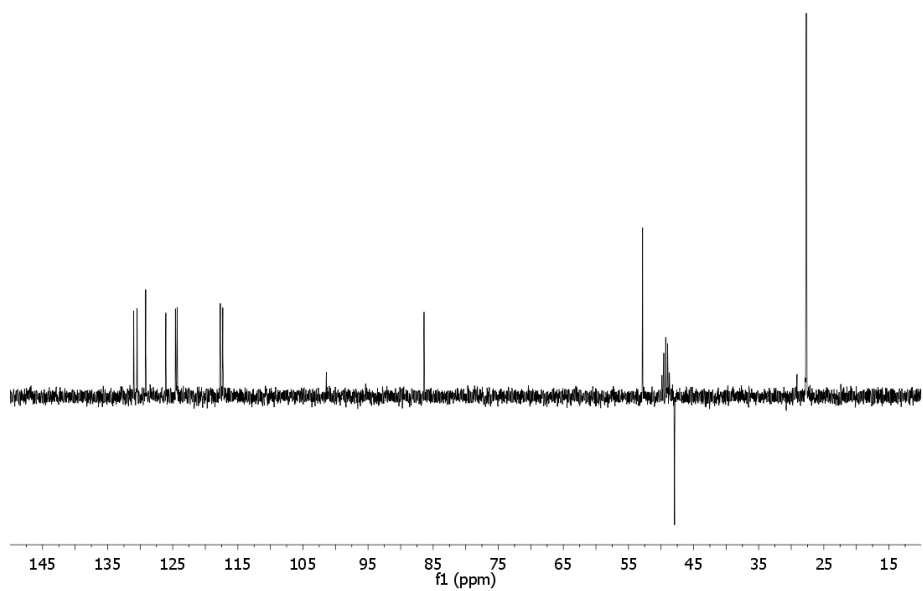
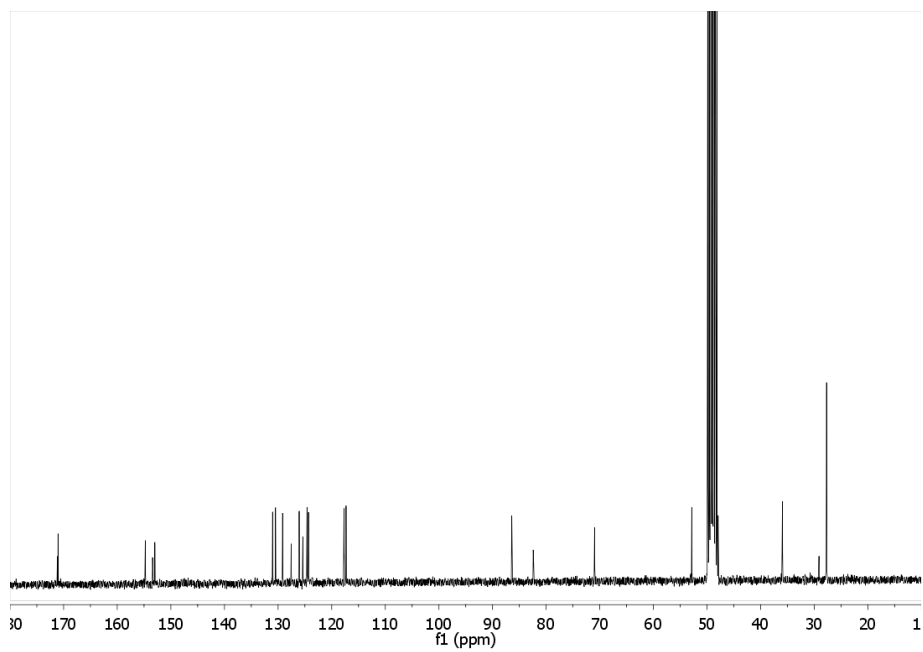
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.01 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 9, 1H), 7.49-7.44 (m, 1H), 7.38-7.15 (m, 5H), 6.40 (s, 1H), 4.73 (d, J = 18, 1H), 4.40 (d, J = 18, 1H), 3.82 (s, 3H), 0.83 (s, 9H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 171.0, 154.8, 153.4, 153.0, 131.0, 130.5, 129.1, 127.5, 126.0, 125.4, 124.6, 124.30, 117.7, 117.3, 86.4, 82.4, 70.9, 52.8, 49.8, 35.9 y 27.7. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na 437.1727, encontrada 437.1713.

**Espectro <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y dept del compuesto 1f**



*Capítulo 4: Efecto del sustituyente en C-5 sobre la fotorreactividad de pirimidinas*

---



#### *4.5.3.4.2 Fotoproductos obtenidos de 2c*

Los fotoproductos resultantes se analizaron mediante HPLC con una mezcla de agua que contenía 25 mM de formiato amónico y metanol (80:20). La cantidad de metanol aumentaba linealmente desde un 20 a un 40 % en 35 minutos. La elución de los fotoproductos se siguió a 220 nm. Dos productos se identificaron como DCBs (**2e-1** y **2e-2**) con un tiempo de retención de 12 min y 21 min, respectivamente, al igual que en el caso de las fotosensibilizaciones con acetona y BP (proporción 1:3 BP:**2c**).

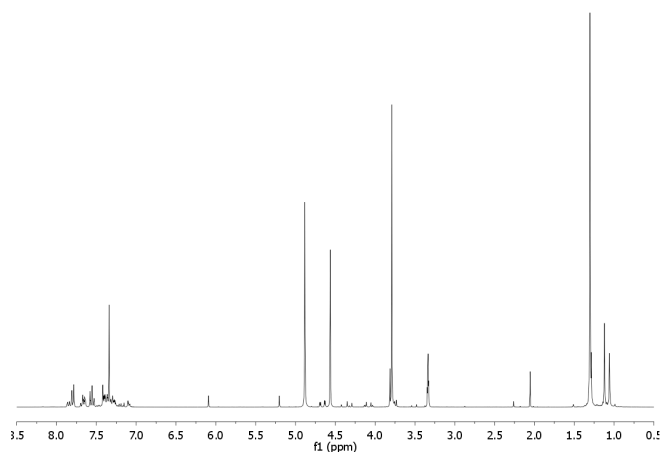
## 4.6 Referencias

1. Xiaoming, H.; Qinhu, S.; Wenjian, T.; Hongbo, W.; Quinxiang, G.; Shuqin, Y.; *Progress in Natural Sci.*; **2005**, *15*, 375.
2. Wagner, P. J.; Bucherck, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1969**, *92*, 181.
3. Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *Chem. Sci.*; **2011**, *2*, 1219.
4. Lamola, A. A.; Mittal, J. P.; *Science*; **1966**, *154*, 1560.
5. Cadet, J.; Voituriez, L.; Hruska, F. E.; Kan, L.-S.; de Leeuw, F. A. A.; Altona, C.; *Can. J. Chem.*; **1985**, *63*, 2861.
6. Varghese, A. J.; *Photochem. Photobiol.*; **1975**, *21*, 147.
7. Kong, F.-F.; Zhai, B.-C.; Song, Q.-H.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2008**, *7*, 1332.
8. Liu, X.-L.; Wang, J.-B.; Tong, Y.; Song, Q.-H.; *Chem. Eur. J.*; **2013**, *19*, 13216.
9. Encinas, S.; Belmadoui, N.; Climent, M. J.; Gil, S.; Miranda, M. A.; *Chem. Res. Toxicol.*; **2004**, *17*, 857.
10. Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2006**, *128*, 6318.
11. Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *J. Phys. Chem. B.*; **2007**, *111*, 7409.
12. Basnak, I.; McKinnell, D.; Spencer, N.; Balkan, A.; Ashton, P. R.; Walker, R. T.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*; **1997**, *1*, 121.

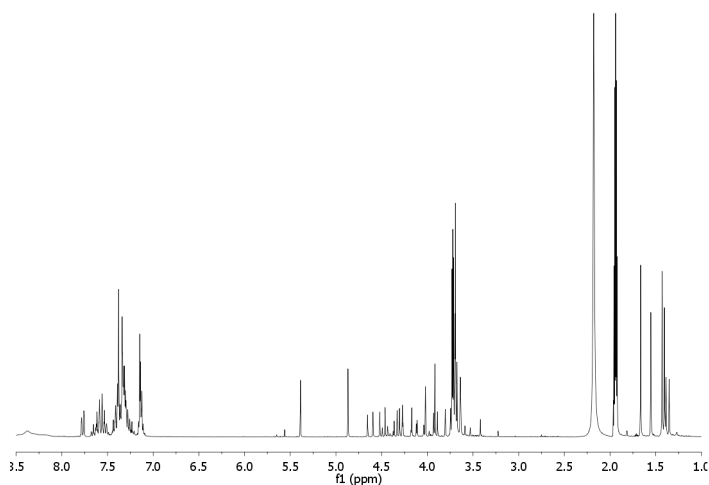
13. Gut, I. G.; Wood, P. D.; Redmond, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**, *118*, 2366.
14. Basnak, I.; Balkan, A.; Coe, P. L.; Walker, R. T.; *Nucleosides. Nucleotides*; **1994**, *13*, 177.

#### 4.7 Anexo

A continuación se presentan las figuras que no aparecen en el apartado de resultados.

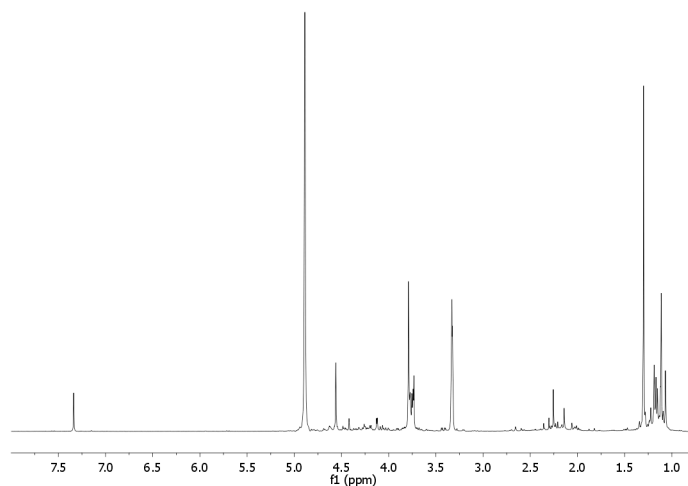


**Fig. 4.14:** Espectro <sup>1</sup>H de RMN del crudo de reacción obtenido tras fotosensibilizar **1c** en presencia de BP (proporción 1:3 BP:base).

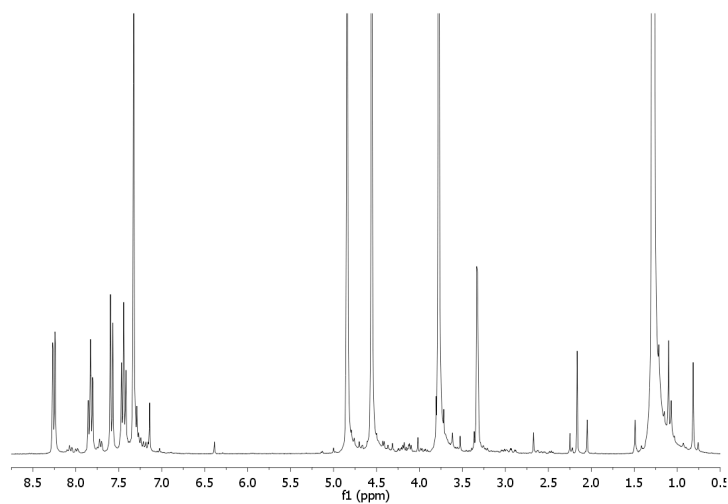


**Fig. 4.15:** Espectro <sup>1</sup>H de RMN del crudo de reacción obtenido tras fotosensibilizar **2c** en presencia de BP (proporción 1:3 BP:base).





**Fig. 4.16:** Espectro <sup>1</sup>H de RMN del crudo de reacción obtenido tras fotosensibilizar **1c** en presencia de acetona



**Fig. 4.17:** Espectro <sup>1</sup>H de RMN del crudo de reacción obtenido tras fotosensibilizar **1c** en presencia de xantona (proporción 1:3 xantona:base).



## **Capítulo 5: Química de los estados excitados superiores de timina generados mediante procesos multifotónicos**



## 5.1 Introducción

Entender la fotoquímica de la timina es esencial para explicar los procesos que están involucrados en el daño al ADN. En este contexto, se ha dedicado durante décadas un gran esfuerzo al aislamiento y caracterización de los productos resultantes de su irradiación, y a la realización de estudios fotofísicos y cálculos teóricos.<sup>1-4</sup> Como resultado, se ha podido establecer que el estado triplete de las bases pirimidínicas, poblado de forma intrínseca o por fotosensibilización, está relacionado con la formación de lesiones diméricas tal y como se ha presentado en la introducción.<sup>2</sup> La formación de dímeros ciclobutánicos (DCBs) se observa tanto por irradiación directa como por sensibilización. Sin embargo, la formación de fotoproductos (6,4) (6,4 PPs) a través de una reacción de Paternò-Büchi entre dos pirimidinas, se observa exclusivamente tras irradiación directa; hasta la fecha todos los experimentos de fotosensibilización de estas lesiones han sido fallidos. Este indicio experimental ha llevado a establecer el paradigma de que el mecanismo de formación de los (6,4) PPs transcurre a través del estado excitado singlete.<sup>5</sup>

No obstante, *la ausencia de 6,4 PPs en experimentos de fotosensibilización podría venir dada por la naturaleza del estado triplete excitado involucrado en el proceso.* Esto es, el  $T_1$  de la timina es de naturaleza  $\pi\pi^*$  y, sin embargo, la fotocicloaddición de Paternò-Büchi es un proceso característico en el que intervienen tripletes  $\pi\pi^*$ , junto con la abstracción de hidrógeno y las fotorreacciones de la familia Norrish.<sup>6</sup>

En general, cuando una molécula absorbe un fotón de luz, es promovida a un estado excitado singlete superior que a través de una rápida CI, alcanza su estado excitado singlete más bajo ( $S_1$ ), desde donde ocurren los diferentes procesos fotofísicos y fotoquímicos. El  $S_1$  puede desactivarse siguiendo varios procesos (Fig. 1.1 del capítulo 1) entre ellos, un CES a estados tripletes superiores, que tras CI acaba poblando el  $T_1$ . Como las CI son procesos de conversión entre estados de la misma multiplicidad separados por unos pocos kJ/mol, ocurren muy rápidamente ( $k_{CI} \approx 10^{11}-10^{13} \text{ s}^{-1}$ ) de manera que normalmente la fotofísica y la fotoquímica que se observa transcurre desde los estados  $S_1$  y  $T_1$  de los cromóforos. Sin

embargo, esto no siempre sucede así; es de sobra conocido que la fluorescencia del azuleno ocurre desde su  $S_2$ .<sup>7</sup> Habitualmente,  $\Delta E (S_2-S_1)$  es de *ca.* 42 kJ/mol, sin embargo, en el caso del azuleno,  $\Delta E (S_2-S_1)$  es de 168 kJ/mol, provocando que la CI entre los dos estados sea más lenta, y que se pueda observar fluorescencia desde el estado singlete superior  $S_2$  (Fig. 5.1).

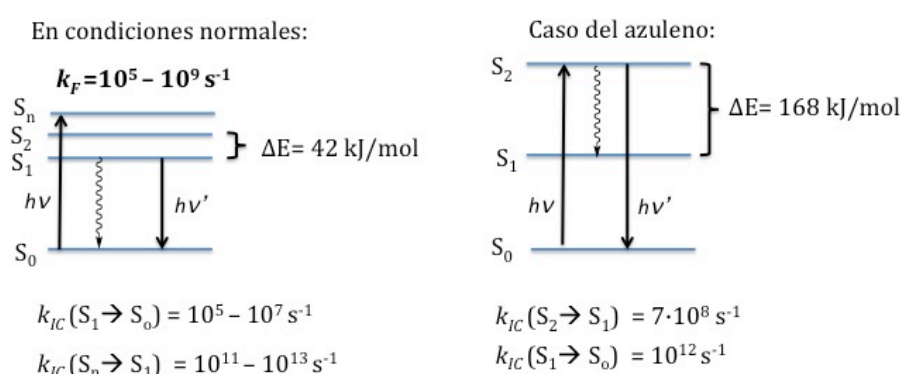
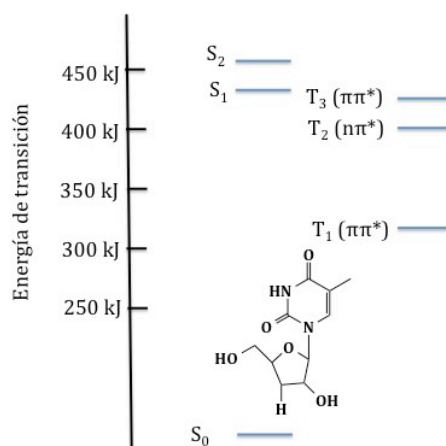


Fig. 5.1: Fluorescencia en condiciones normales y en el caso del azuleno.

Otro ejemplo conocido es el de la fotoquímica de la benzofenona (BP), que en determinadas condiciones puede suceder desde un estado triplete superior  $T_n$  ( $n \geq 2$ ).<sup>8-10</sup> Esto sucede debido a que la diferencia de energía entre el  $T_n$  y el  $T_1$  es de unos 100 kJ/mol, y el tiempo de vida del  $\tau_n$  es de aproximadamente de 37 ps,<sup>11</sup> el suficiente para que se produzca una reacción química, en competencia con la desactivación vía CI hacia el  $T_1$ .

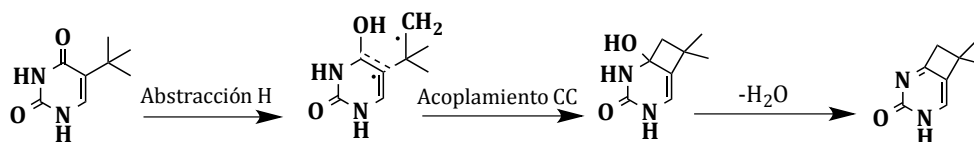
Así pues, la diferencia de energía entre los estados excitados de la misma multiplicidad puede jugar un papel importante en los mecanismos de fotorreacción. En este contexto, se ha establecido mediante cálculos teóricos que la timidina presenta un alto valor de  $\Delta E$  entre los estados  $T_1-T_2$  ( $\approx 96 \text{ kJ/mol}$ ), y que además el  $T_2$  tiene carácter  $n\pi^*$  y estaría situado 35 kJ/mol por debajo del  $S_1$  (Fig. 5.2).<sup>12-13</sup> Estos datos indican por tanto, que parte de la fotoquímica de la timina podría estar teniendo lugar desde este estado excitado superior por ejemplo la reacción de Paternò-Büchi que conduce a la formación de 6,4 PPs.



**Fig. 5.2:** Diagrama de energía de los estados excitados singlete y triplete de timidina. Cada línea horizontal representa el nivel energético para la transición vertical desde el estado fundamental calculado con el método TD-DFT.<sup>12</sup>

## 5.2 Objetivo

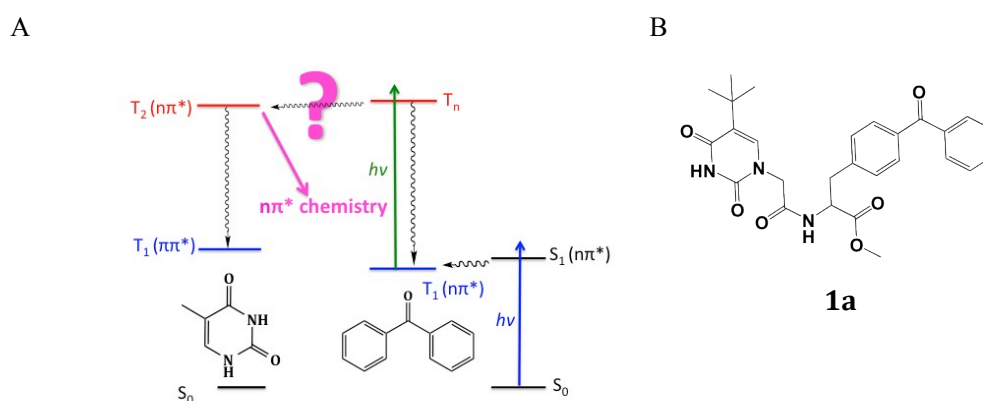
En este capítulo se pretende esclarecer la fotoquímica desde el estado triplete superior de la timidina usando como herramienta la fotociclación de Norrish-Yang (Fig. 5.3), que al igual que la Paternò-Büchi, es una reacción típica de estados excitados  $n\pi^*$ .



**Fig. 5.3:** Representación esquemática de los pasos involucrados en la fotociclación Norrish-Yang del 5 *tert*-butiluracilo.

El compuesto elegido para este estudio fue el 5 *tert*-butiluracilo que presenta hidrógenos gamma susceptibles de ser abstraídos por el carbonilo vecino, conduciendo a la formación del fotoproducto 1,2-dihidrociclobuta[*d*]-2 pirimidona según se ha presentado en el capítulo 4.<sup>14</sup> Para asegurar que la reacción transcurre exclusivamente *vía* el  $T_2$  ( $n\pi^*$ ) el proceso debe ser fotosensibilizado. Con este

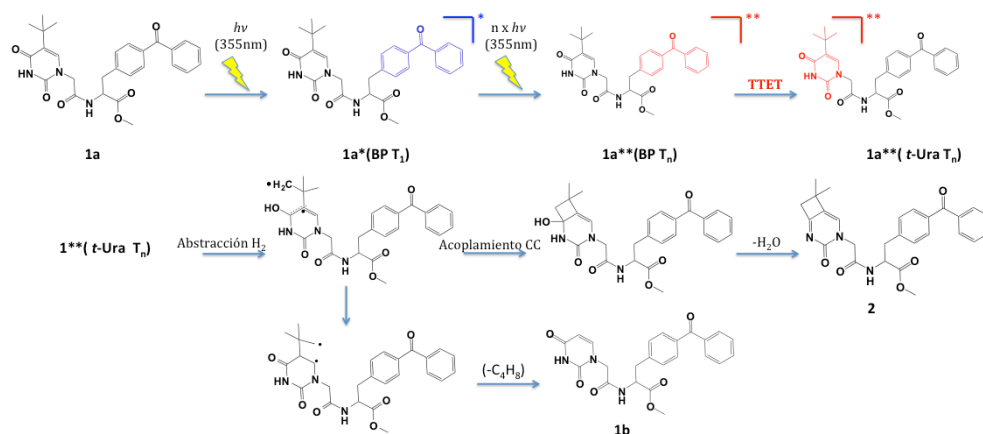
fin se seleccionó el cromóforo BP debido a que: i) puede ser excitado a longitudes de onda mayores de 300 nm<sup>12, 15</sup> y ii) su T<sub>n</sub> (403 kJ/mol, τ ≈ 37 ps) puede generarse mediante excitación multifotónica (Fig. 5.4A).<sup>8,11</sup> El tiempo de vida del T<sub>n</sub> de la BP es demasiado corto para que la TTET tenga éxito intermolecularmente,<sup>16-18</sup> ya que la concentración requerida de fotosensibilizador sería imposible de alcanzar. Por ello, se diseñó y sintetizó la diada **1a** (Fig. 5.4B), compuesta por el grupo *t*-Ura y el cromóforo BP unidos covalentemente mediante un espaciador alifático, de forma que el proceso ocurra intramolecularmente.



**Fig. 5.4:** A) Diagrama de energía de los estados excitados triplete de Thy y BP. B) Estructura de la diada **1a**.

Así pues, y según lo mencionado, en la Fig. 5.5 se presenta el esquema de la reacción que se esperaba que ocurriese. Tras irradiar la diada **1a** con el pulso láser  $\lambda_{exc} = 355$  nm y elevada potencia se alcanzaría el estado triplete excitado de la BP tras absorber un fotón de luz (**1a\***(BP T<sub>1</sub>)). Con el siguiente fotón se excitaría el estado triplete excitado superior **1a\*\***(BP T<sub>n</sub>). Tras una TETT se poblaría el estado excitado triplete del grupo *t*-Ura para dar lugar a la formación del fotoproducto 1,2-dihidrociclobuta[*d*]-2 pirimidona **2** correspondiente. Además, también se esperaba obtener el compuesto **1b** tras una desalquilación del birradical 1,4 involucrado en la reacción.



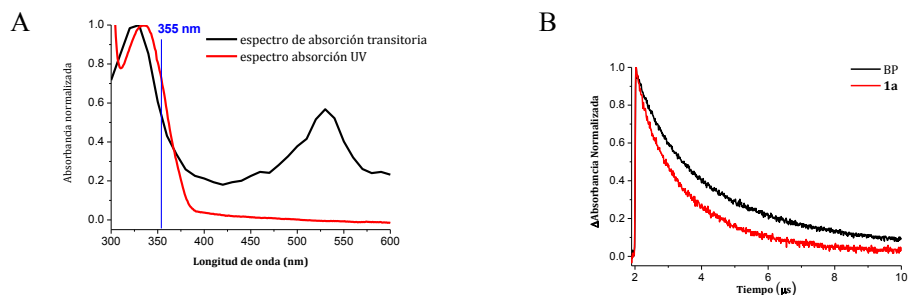


**Fig. 5.5:** Etapas fotoquímicas producidas durante la fotorreacción Norrish-Yang, obteniendo los fotoproductos **2** y **1b** mediante irradiación láser de dos fotones.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Estudio preliminar de la diada. Propiedades fotofísicas

La diada **1a** presenta un espectro de absorción UV-visible con una banda centrada a 260 nm y otra (Fig. 5.6A) a 340 nm. Estudios de fotólisis de destello láser a 355 nm revelaron que la molécula presenta un espectro de absorción transitorio triplete-triplete similar al de la BP, con dos máximos centrados a 330 y a 530 nm. Bajo las mismas condiciones, el tiempo de vida de **1a** fue más corto que el de BP (1.4  $\mu\text{s}$  frente a 2  $\mu\text{s}$ ). Esta desactivación intramolecular ( $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) refleja la interacción entre las unidades BP y *t*-Ura en **1a** (Fig. 5.6B).



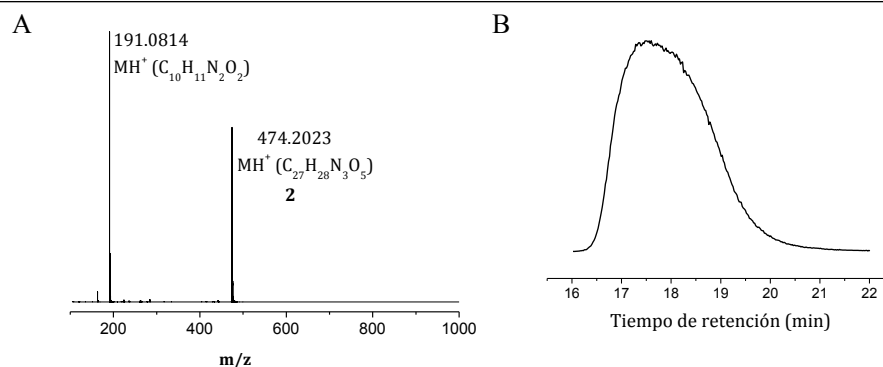
**Fig. 5.6:** A) Espectros absorción ultravioleta (en estado estacionario y en tiempo resuelto tras excitación láser a 355 nm) de **1a** normalizados B) Trazas de BP y **1a** registradas a 530 nm tras excitación láser a 355 nm.

Durante el experimento de fotólisis de destello láser no se observó la formación del radical cetilo ( $\lambda_{\text{máx}}$  550 nm) de la BP que se puede obtener tras una abstracción de hidrógeno intramolecular del grupo *tert*-butilo por el estado triplete de BP.

### 5.3.2 Fotosensibilización de la reacción Norrish-Yang/proceso $n\pi^*$ en el compuesto **1a**

Para realizar el experimento de fotosensibilización se preparó una disolución de **1a** en acetonitrilo burbujeada con  $N_2$  (absorbancia 0.3 a 355 nm) y se irradió con luz láser a 355 nm y una energía de 40 mJ por pulso para la excitación multifotónica.<sup>19</sup> Cabe destacar que a esta  $\lambda$  absorben tanto el estado fundamental como el triplete de la BP (Fig. 5.6A), por tanto, ambas especies podrían competir por la absorción de luz.

Tras la irradiación, se concentraron las muestras a vacío y se analizaron mediante un UPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC- MS/MS). El cromatograma obtenido reveló la presencia de un nuevo compuesto con ión molecular  $MH^+$   $m/z$  474.2023 (Fig. 5.7), que corresponde con la fórmula  $C_{27}H_{28}N_3O_5$ . Éste fue tentativamente asignado al fotoproducto **2** (Fig. 5.5) que sería el resultado de la fotociclación Norrish-Yang seguida por la deshidratación del ciclobutanol que se origina.<sup>14, 20</sup>



**Fig. 5.7:** Espectro de masas obtenido del análisis UPLC-MS/MS de **1a** después de la irradiación a 355 nm con el pulso láser (300 pulsos, 40 mJ). A) Detección del fotoproducto **2** (a los 18 min del tiempo de elución, energía de colisión de 18 V, ión 474.20); B) Cromatograma registrado para la transición 474.20 → 191.08.

Esta asignación se confirmó definitivamente mediante la síntesis independiente de **2** y su posterior análisis *vía* UPLC-MS/MS: Su tiempo de retención, ión molecular y su patrón de fragmentación fueron idénticos entre ellos. El espectro MS/MS de las dos muestras mostró la característica rotura  $\alpha$  de las amidas para dar lugar al catión acilo C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> (m/z 191.0814).

Asimismo, el biradical 1,4 puede sufrir una desalquilación tras tautomerizar, dando lugar al compuesto **1b** tal y como está representado en el esquema de la Fig. 5.5.<sup>14, 21</sup> El análisis de uno de los picos de los cromatogramas obtenidos en el UPLC-MS/MS sugirió la presencia de esta molécula con ión MH<sup>+</sup> a m/z 436.1490, correspondiente a la fórmula esperada C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (Fig. 5.8).

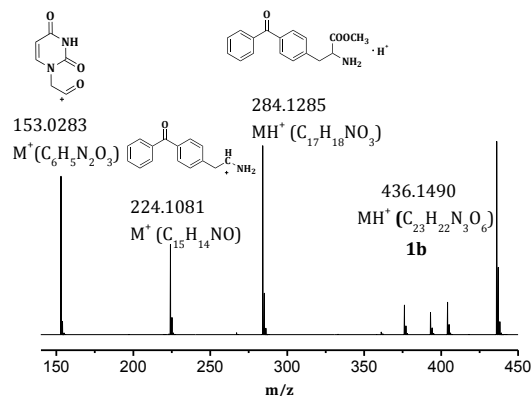


Fig. 5.8: Detección del fotoproducto **1b** mediante análisis UPLC-MS/MS.

De nuevo, la asignación fue confirmada mediante la síntesis independiente de **1b**. El tiempo de retención en el UPLC, el ión molecular y el patrón de fragmentación fueron idénticos para el fotoproducto y el compuesto sintetizado. Además, el espectro MS/MS evidenció fragmentos iónicos compatibles con la estructura de la molécula estudiada tal y como se presenta en la Fig. 5.8.

### 5.3.2.1 Determinación del rendimiento químico de formación de los fotoproductos.

Los rendimientos cuánticos de transferencia de energía desde estados triplete superiores ultra cortos son típicamente muy bajos, debido a la competencia con la eficiente CI para alcanzar  $T_1$ . Un ejemplo de ello es el valor de transferencia de energía desde el estado  $T_n$  de BP al disolvente  $CCl_4$  de 0.0023.<sup>8</sup> Por ello, se espera que el rendimiento cuántico de la ciclación de Norrish-Yang desde **1a\*\*** ( $t$ -Ura  $T_n$ , Fig. 5.5) sea bajo, porque predomina la CI hacia el triplete más bajo ( $T_1$ ). Asumiendo un tiempo de vida de unos 50 ps para **1a\*\*** ( $t$ -Ura  $T_n$ ) y una constante de velocidad de reacción del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , solo el 1% de este estado excitado podría ser generado. En consecuencia, y teniendo en cuenta la eficiencia de ambas reacciones, la de transferencia de energía y la Norrish-Yang, se podría estimar un rendimiento cuántico total para fotoproceso de interés de aproximadamente  $10^{-5}$ .

La cantidad de fotoproducto obtenido por irradiación multifotónica se cuantificó mediante HPLC, usando una curva de calibrado construida usando diferentes concentraciones del compuesto **2** (Fig. 5.9). El rendimiento químico obtenido fue

0.003%. Durante el experimento se limitó a 300 el número de pulsos con el objetivo de mantener la conversión baja y minimizar la fotólisis secundaria de **2**. La cantidad de producto **1b** producida fue incluso más baja, lo suficiente para su detección por UPLC-MS/MS, pero no para llevar a cabo una medida exacta cuantitativa.

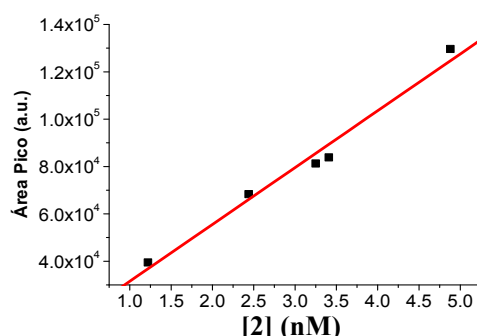


Fig. 5.9: Curva de calibrado construida del compuesto 2 mediante HPLC.

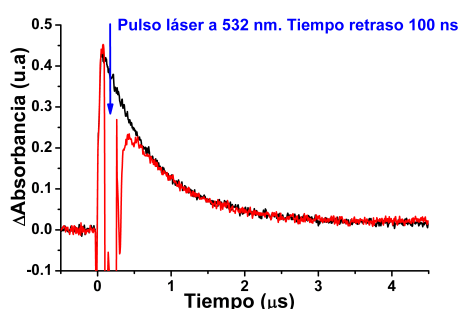
### 5.3.2.2 Evidencias de la formación del fotoproducto 2 mediante un proceso bifotónico

Para establecer que la formación de **2** viene dada exclusivamente por un proceso bifotónico, se llevaron a cabo los siguientes experimentos control:

- El ácido 5-*tert*-butiluracilacético se sometió a fotólisis láser a 355 nm a 40mJ/pulso, solo o en presencia de una cantidad equimolar de *N*-acetil-4-benzoilfenilalanina metil éster. En ninguno de los casos se observó la formación del fotoproducto de Norrish-Yang. Además, en el segundo experimento no se detectó formación de DCBs.
- Se irradió la diada **1a** a 355 nm con una lámpara de xenón y el resultado se analizó por UPLC-MS/MS, que no evidenció la formación de **2**.

Por otra parte, y con el fin de obtener pruebas cinéticas que evidenciaran el proceso bifotónico bajo estudio, se realizó un experimento usando dos láseres- dos

colores. En primer lugar se excitó **1a** a 308 nm (con un láser excímero XeCl), dando lugar a **1a\***(BP T<sub>1</sub>, Fig. 5.5). Un segundo pulso 100 ns después lanzado a 532 nm (láser Nd:YAG) excitó selectivamente el estado transitorio fotoinducido. Desafortunadamente los resultados, presentados en la Fig. 5.10, no muestran un decrecimiento de la traza, probablemente debido al bajo rendimiento cuántico de reacción y las limitaciones impuestas por la proporción señal/ruido.



**Fig. 5.10:** Trazas cinéticas de la fotólisis de **1a** registradas 520 nm después del pulso láser a 308 nm (traza negra) y con el 2- láseres 2- colores (308/532, traza roja).

Además, se realizó un estudio de formación de productos sometiendo a la diada **1a** a fotólisis de láser múltiple mediante la repetición de la secuencia 308/532 nm. Los resultados obtenidos, que fueron analizados con el UPLC-MS/MS, fueron similares a aquellos obtenidos mediante fotólisis de destello láser a 355 nm y elevada potencia. En este caso la formación de **2** fue ligeramente superior y la detección de **1b** fue mejor.

### 5.3.2.3 Formación de **2** mediante un proceso bifotónico

No obstante, la pieza clave que demostró de un modo no ambiguo que la formación del fotoproducto **2** ocurre vía un proceso bifotónico se obtuvo mediante el seguimiento de su formación en función de la energía del pulso de láser empleado. Para ello, **1a** fue irradiado en un rango de energías de pulso desde 12 a 41 mJ. Las mezclas de irradiación fueron analizadas con un HPLC equipado con detector UV y se cuantificó en cada caso la cantidad de **2** obtenida mediante comparación con una curva de calibrado (Fig. 5.9). En la Fig. 5.11 se muestra el

logaritmo de la cantidad de **2** producida en función del logaritmo de la energía del pulso de láser. La pendiente de la recta es de 1.9, confirmando que el proceso de formación del fotoproducto de Norrish-Yang es de naturaleza bifotónica.

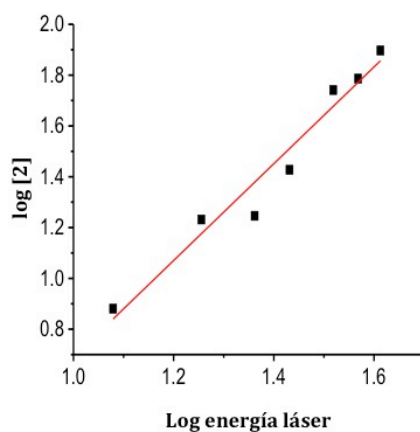


Fig. 5.11: B) Representación del log de **2** en función del log de la potencia de láser.

## 5.4 Conclusiones

En este capítulo de tesis se ha evidenciado la reactividad del estado  $T_2$  de la timina a partir de la reacción de Norrish-Yang en **1a**. La formación del fotoproducto **2** se ha logrado mediante un proceso fotosensibilizado de TETT desde el estado superior  $T_n$  del cromóforo BP presente en la diada **1a** a la subestructura *t*-Ura, confirmando la naturaleza bifotónica del proceso. La técnica de destello láser a  $\lambda_{exc} = 355$  nm a elevada energía y el uso dos láseres dos colores (308/532) ha sido crucial para llevar a cabo los experimentos.

## 5.5 Sección experimental

En esta sección del capítulo se van a describir los procesos experimentales realizados en los análisis UPLC-MS/MS y HPLC. También los relativos a la técnica de fotólisis de destello láser, la irradiación de muestras y la síntesis de los compuestos utilizados. La descripción de los equipos empleados se encuentra detallada en el capítulo 8 de la tesis doctoral.

### 5.5.1 Análisis UPLC-MS/MS

Los análisis se realizaron usando como fase móvil una mezcla metanol:agua (conteniendo 0.01% ácido fórmico) 35:65 v:v con un flujo de 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L. Los flujos del cono y el gas de desolvatación fueron 100 L/h y 800 L/h, respectivamente. El flujo de gas de colisión fue de 0.2 mL/min, aplicando una energía de colisión de 15 o 18 V. Los datos obtenidos fueron adquiridos usando el software Masslynx<sup>TM</sup> (Waters Corp.). Se usó como patrón leucina encefalina que genera un ion [MH<sup>+</sup>] (m/z 556.2771) a la concentración de 500 pg/mL y un flujo de 50  $\mu$ L/min.

### 5.5.2 Análisis HPLC

Para el análisis de las muestras irradiadas mediante HPLC se utilizó una columna C18 *Mediterranean Sea* (5  $\mu$ m, 25 x 0.46 cm). Una mezcla de acetonitrilo:agua-TFA 0.1% 40:60 v:v fue empleada como eluyente a un flujo de 0.7 mL/min. Los cromatogramas se registraron a 320 nm.

### 5.5.3 Fotólisis de destello láser

Para los experimentos de fotólisis de destello laser se empleó un láser a una longitud de onda de excitación de 355 nm. La absorbancia fue de 0.3 a 355 nm.



#### **5.5.4 Fotólisis de destello dos láseres dos colores**

Para realizar el experimento, la absorbancia de las muestras fue ajustada a 1.1 a 308 nm (cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico). Como fuentes de excitación se usaron un láser excímero XeCl (308 nm, Lambda Physik, Lextra 50) y sincronizado con el pulso del segundo armónico (532 nm) de un láser NG:YAG (Lotis TII, LT-2137) a la velocidad de repetición de 1 Hz. El tiempo de retraso entre los pulsos láser de 308 nm y 532 nm fue de 100 ns. Los haces de los láseres se situaron perpendicularmente en el centro de la muestra. La absorbancia se registró con una lámpara de Xe con un filtro de corte ( $\lambda = 470$  nm) pasando al sistema de detección. La intensidad de los pulsos láser incidentes a 308 y 532 nm fue 30 y 132 mJ/pulso, respectivamente. Después del primer pulso de laser a 308 nm, se generó un cambio de absorbancia a 532 nm de 0.41 a los 100 ns. Para el análisis de formación de fotoproductos, la muestra recibió 3600 pulsos con las dos longitudes de onda.

#### **5.5.5 Irradiación de las muestras**

Una disolución de **1a** en acetonitrilo con absorbancia de 0.3 a 355 nm fue preparada y burbujeada con N<sub>2</sub> antes de la irradiación en cubetas de cuarzo.

A) Irradiación multifotónica. La excitación de las muestras fue realizada usando el aparato láser descrito en el capítulo 7 a una potencia de 40 mJ/pulso. El experimento control fue realizado con una energía de 15 mJ/pulso.

B) Irradiación monocromática. La irradiación fue realizada usando un sistema Microbeam (modelo L-201) que incluye una lámpara de Xenón (150 W) equipado con un monocromador (modelo 101). Las muestras fueron irradiadas durante 2.5 h a 355 nm

C) Dependencia cuadrática del rendimiento de **2** con la potencia del láser. Las muestras fueron irradiadas (300 pulsos) usando diferentes energías de láser, desde 12 a 41 mJ/pulso. La mezcla irradiada fue concentrada (50 x) y analizada con el HPLC. Mediante una recta de calibrado construida con muestra autentica sintetizada a diferentes concentraciones se determinó el rendimiento de forma-

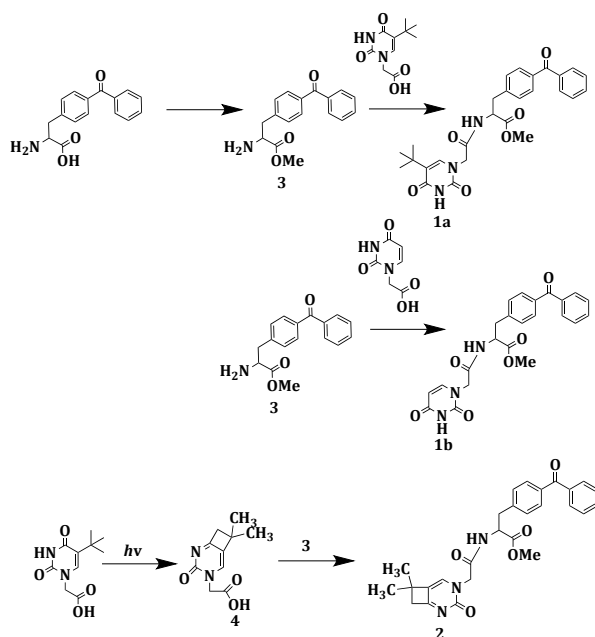
ción de 2.

### 5.5.6 Síntesis de los compuestos

#### 5.5.6.1 General

Metanol y acetonitrilo de grado HPLC, acetato de etilo, diclorometano y hexano fueron adquiridos de Sharlau. Dimetilformamida fue adquirida de Across. Cloroformo (CH<sub>3</sub>Cl) fue adquirido de J.T Backer. Ácido sulfúrico, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) fueron adquiridos de Sigma. El compuesto 4-benzoilfenilalanina se adquirió en Bachem.

#### 5.5.6.2 Esquema sintético

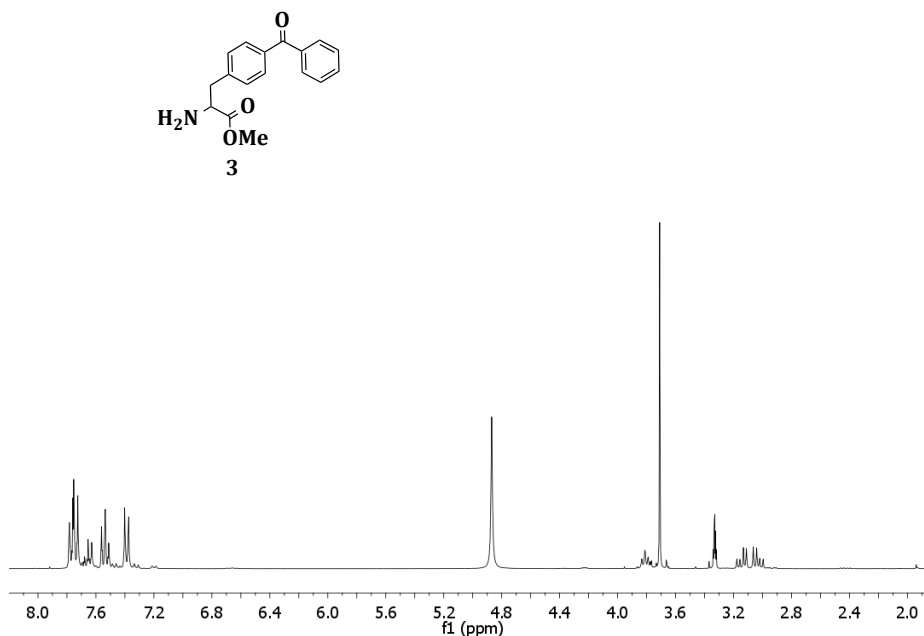


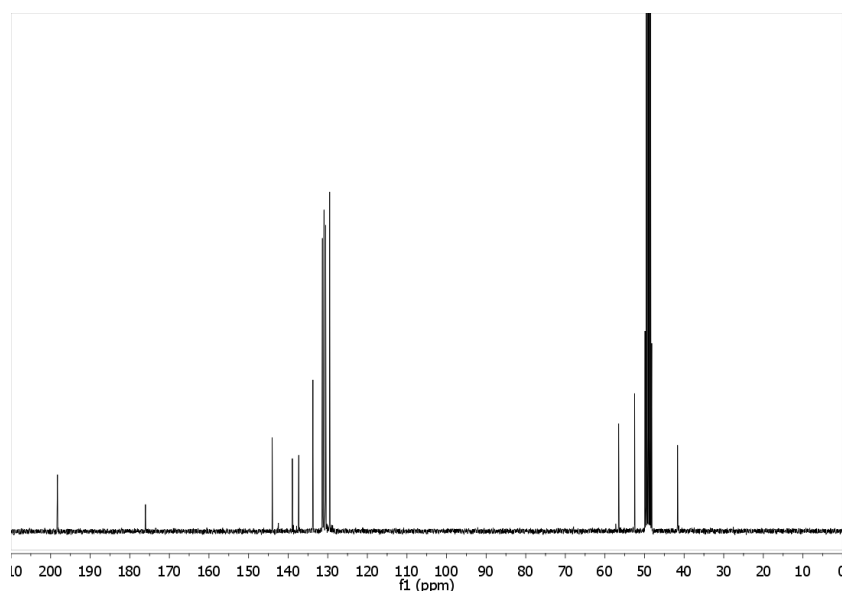
### 5.5.6.3 Síntesis de **3**

A una disolución de 4-benzoilfenilalanina (1.0 g, 3.7 mmol) en metanol (20 mL) se añadieron 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 12 h y se concentró a vacío hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de sílice usando CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9.8:0.2 como eluyente. El compuesto (0.7 g, 2.5 mmol) se obtuvo como un aceite amarillento. Rendimiento 68%.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.85–7.16 (m, 9H), 3.87–3.76 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.14 (dd,  $J = 13.5, 6.0$  Hz, 1H), 3.03 (dd,  $J = 13.5, 7.1$  Hz, 1H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  198.2, 176.0, 144.0, 138.9, 137.3, 133.7, 131.3, 130.9, 130.5, 129.5, 56.5, 52.5 y 41.6; **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> 284.1287, encontrada 284.1300.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **3**





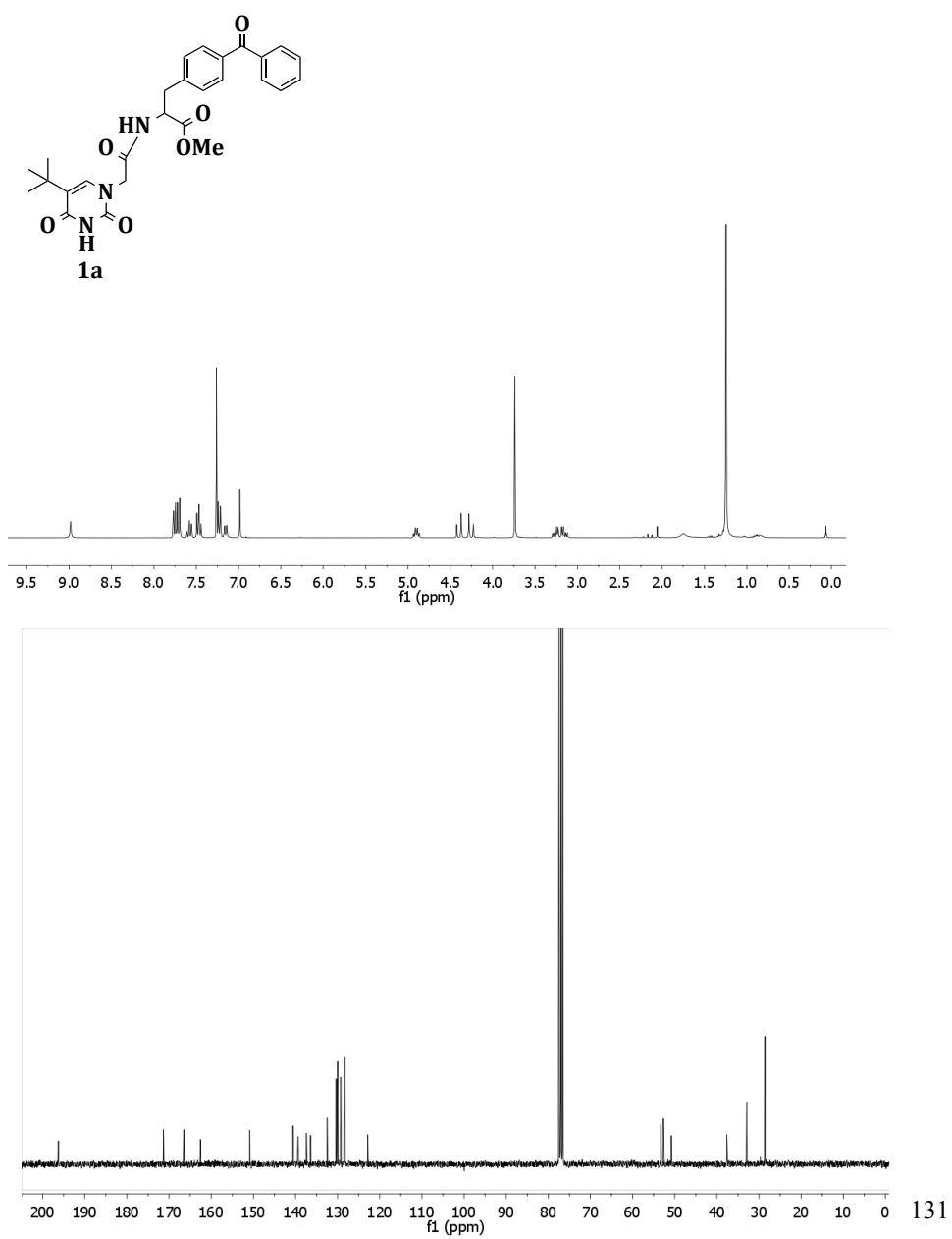
#### 5.5.6.4 Síntesis de **1a**

A una disolución de ácido 5-*tert*-butiluracilacético (0.5 g, 2.2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se añadió EDC (0.4 ml, 2.2 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción fue agitada durante 0.5 h a 0°C. Después, **3** (0.6 g, 2.2 mmol) y DMAP (0.1 eq) disueltos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añadieron gota a gota a la disolución. La mezcla de reacción fue mantenida durante 12 h en agitación a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado bajo presión reducida y el residuo redisolto en AcOEt (20 ml). La fase orgánica fue lavada sucesivamente con 1N HCl, 5% NaHCO<sub>3</sub> y sal, secada sobre NaSO<sub>4</sub> y evaporada bajo presión reducida. El producto final fue purificado con cromatografía de sílice usando AcOEt/Hexano 8:2 como eluyente. El compuesto **1a** se obtuvo como un sólido blanco (0.7 g, 1.4 mmol). Rendimiento 65%.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.98 (s, 1H), 7.79–7.43 (m, 7H), 7.24–7.12 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 4.90 (dt, J = 7.7, 6.0 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.32–3.10 (m, 2H), 1.25 (s, 9H); <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.4, 171.5, 166.7, 162.7, 151.0, 140.7, 139.5, 137.6, 136.6, 132.6, 130.5, 130.1,

129.4, 128.5, 123.0, 53.5, 52.8, 50.9, 37.8, 33.1 y 28.8; **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 492.2144, encontrada 492.2135.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 1a

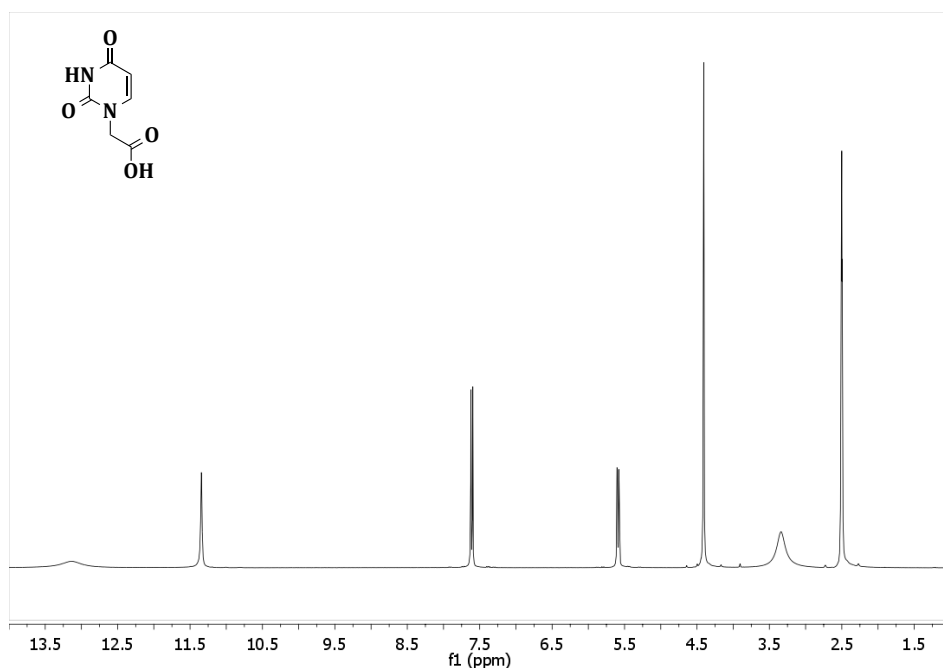


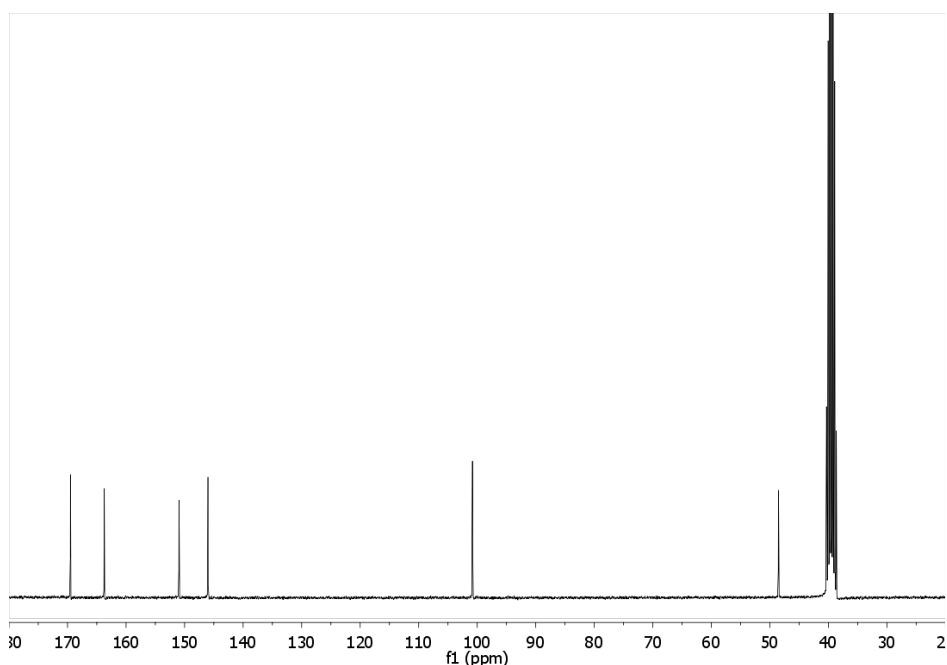
### 5.5.6.5 Síntesis del ácido uracilacético

A una suspensión de 20 mL de H<sub>2</sub>O que contiene uracilo (1.0 g, 9 mmol) se le añadió una disolución acuosa 2N de KOH (20 mL). La mezcla se agitó hasta que la disolución fuera transparente. Bromoacetato de etilo (2 equivalentes) se añadió a la reacción gota a gota y después se sometió a refujo durante toda la noche. La reacción se enfrió y se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1. El producto cristalizado se lavó con HCl 1N y agua y se secó a vacío, obteniendo el ácido uracilacético (1.0 g, 5.87 mmol). Rendimiento 66 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13.16 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 7.61 (d, J = 6 Hz, 1H), 5.59 (dd, J = 6, 3 Hz, 1H), 4.41 (s, 2H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 169.53, 163.91, 150.99, 146.04, 101.05 y 48.73. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 171.0400, encontrada 171.0406.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto ácido uracilacético





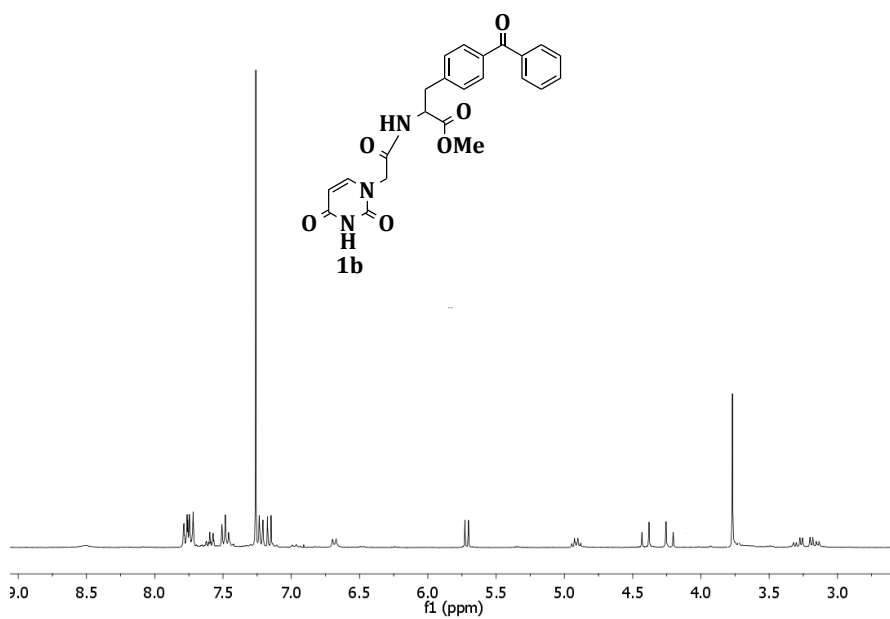
#### 5.5.6.6 Síntesis de **1b**

A una disolución de ácido uracilacético (0.3 g, 1.8 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se añadió EDC (0.3 mL, 1.8 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación durante 0.5h a  $0^\circ\text{C}$ . Luego, **1** (0.5 g, 1.8 mmol) y DMAP (0.1 eq) disueltos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se añadieron gota a gota a la disolución. La mezcla de reacción se mantuvo durante 12 h en agitación a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo fue redisolto en AcOEt (20 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con 1N HCl, 5%  $\text{NaHCO}_3$  y NaCl, se secó sobre  $\text{NaSO}_4$  y evaporada bajo presión reducida. El producto final se purificó mediante una cromatografía de sílice usando AcOEt/Metanol 100:1 como eluyente. El compuesto **1b** se obtuvo como sólido blanco. Rendimiento 12%.

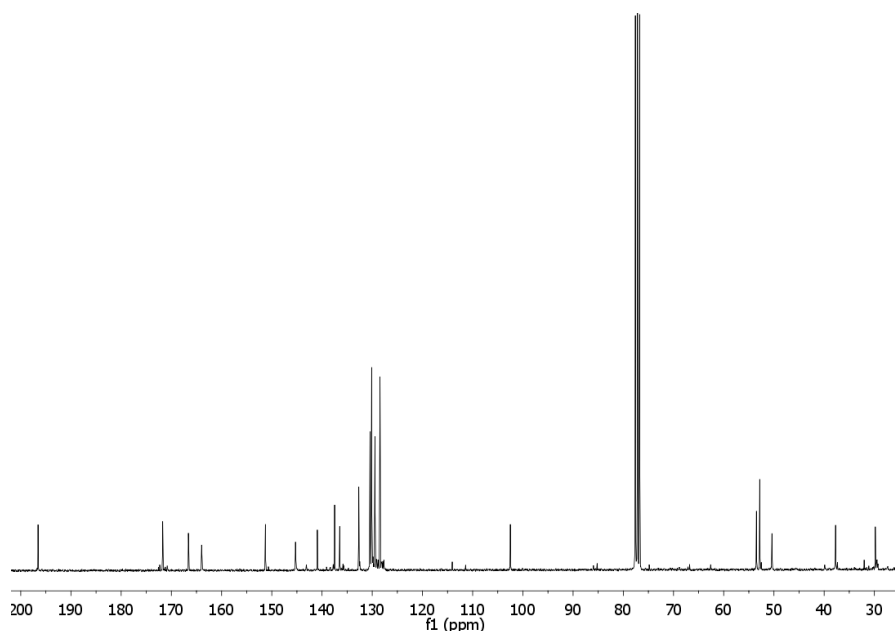
**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78–7.45 (m, 8H), 7.22 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 6.5$ , 1H), 4.91 (m, 1H), 4.40 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 4.23 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.28 (dd,  $J = 6.0, 14.0$  Hz, 1H), 3.16 (d,  $J = 4.0, 14.0$  Hz,

$^1\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.6, 171.7, 166.6, 164.0, 151.2, 145.3, 141.0, 137.4, 136.4, 132.6, 130.4, 130.1, 129.4, 128.4, 102.4, 53.4, 52.8, 50.3 y 37.7; HRMS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): Calculada para  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6$  436.1509, encontrada 436.1490.

### Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto 1b







#### 5.5.6.7 Síntesis de ácido (7,7-dimetil-3-oxo-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octa-1,5-dien-4-il) acético (**4**)

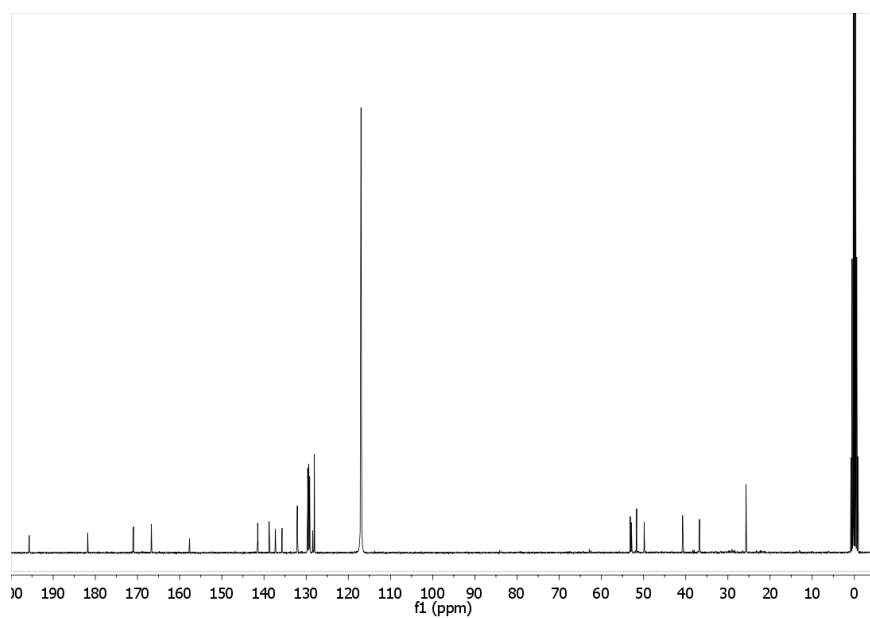
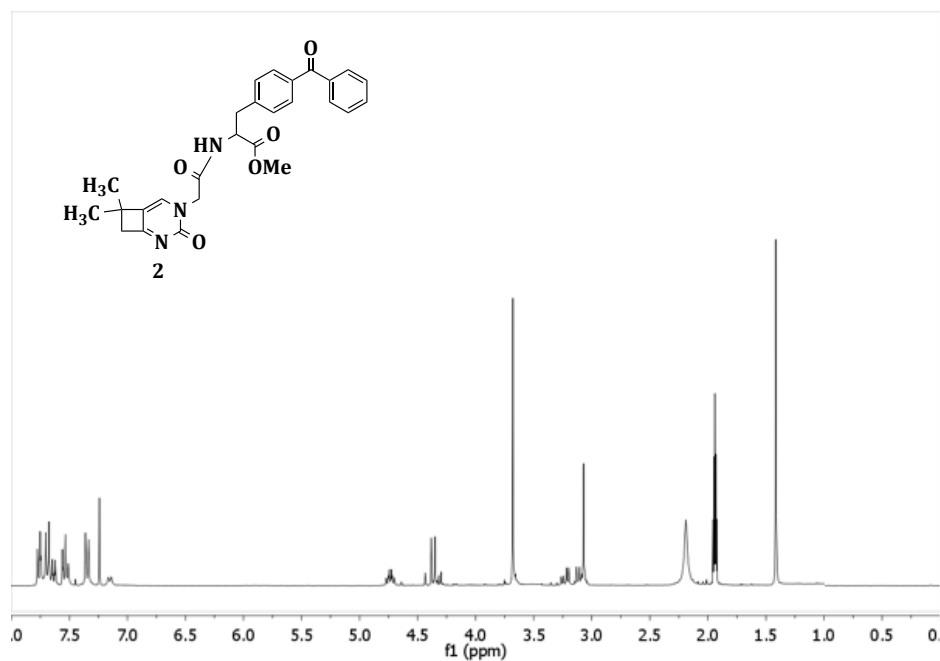
Ácido 5-*tert*-butilacético (0.2 g, 0.9 mmol) en acetonitrilo (500 mL) fue irradiado a 254 nm con un fotorreactor (Rayonet). La reacción se monitorizó mediante espectrometría UV. Después de 4 h, la nueva banda que absorbe a 315 nm correspondiente al cromóforo de pirimidona llegó a su máximo de absorban-  
cia. En este punto la disolución irradiada se evaporó a vacío. El aceite amarillo obtenido (0.2 g, 0.9 mmol) fue usado en el siguiente paso de síntesis sin previa purificación. Rendimiento 99%. El compuesto fue caracterizado como su metil éster. Los RMNs y la masa exacta se encuentran en la sección experimental del capítulo 4.

#### 5.5.6.8 Síntesis de **2**

A una disolución de **4** (0.2 g, 1.0 mmol) en DMF anhidro (2 mL), se añadió una disolución que contenía **3** (0.3 g, 1.0 mmol), TBTU (1.1 mmol) y DIEA (2.7 mmol) en 2 mL de DMF. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y seguidamente se desactivó mediante la adición de agua (4 mL). Después la mezcla de reacción se extrajo con tolueno (2 x 6 mL), se lavó con agua (2 x 6 mL), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y purificó por cromatografía de sílice. Se obtuvo **2** como aceite amarillento. Rendimiento 69%.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 7.80–7.64 (m, 5H), 7.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.20 (d, J = 60 Hz, 1H), 4.80–4.73 (m, 1H), 4.43 (d, J = 15 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 15 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.25 (dd, J = 15.0, 6.0 Hz, 1H), 3.16–3.10 (m+s, 3H), 1.43 (s, 6H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 195.6, 181.8, 171.0, 166.7, 157.7, 141.5, 138.8, 137.3, 135.7, 132.1, 129.6, 129.4, 129.2, 128.5, 128.1, 53.2, 52.9, 51.6, 49.9, 40.7, 36.7 y 25.7; **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> 474.2029, encontrada 474.2023

### Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto 2



## 5.6 Referencias

1. Cadet, J.; Mouret, S.; Ravanat, J.-L.; Douki, T.; *Photochem. Photobiol.*; **2012**, *88*, 1048.
2. Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *Chem. Sci.*; **2011**, *2*, 1219.
3. Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cadet J.; Miranda, M.A.; *Acc. Chem. Res.*; **2012**, *45*, 1558.
4. Heil, K.; Pearson, D.; Carell, T.; *Chem. Soc. Rev.*; **2011**, *40*, 4271.
5. Douki, T., *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2013**, *12*, 1286.
6. *Modern Molecular Photochemistry of organic molecules*; University Science Books: Herndon VA; Turro N. J.; Ramamurthy V.; Scaiano J. C; **2010**.
7. *Molecular Photochemistry*. Ed W. A Benjamin Inc, New York. Nicholas J. Turro; **1965**.
8. Cai, X.; Sacamoto, M.; Hara, M.; Sugimoto, A.; Tojo, S.; Kawai, K.; Endo, M.; Fujitsuka, M.; Majima, T.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2003**, *2*, 1209.
9. Xichen, C.; Zhenhui, H.; Side, Y.; Nianyun, L.; *Science in china (series B)* **2001**, *44*, 582.
10. Murai, H.; Obi, K.; *J Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2446.
11. Cai, X.; Sakamoto, M.; Fujitsuka, M.; Majima, T.; *Chem. Eur. J.*; **2005**, *11*, 6471.
12. Harada, Y.; Okabe, C.; Kobayashi, T.; Suzuki, T.; Ichimura, T.; Nishi, N.; Yao-Zhong, X.; *J. Phys. Chem. Lett.*; **2009**, *1*, 480.
13. González-Luque, R.; Climent, T.; González-Ramírez, I.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *J. Chem. Theory Comput.*; **2010**, *6*, 2103.

14. Basnak, I.; McKinnell, D.; Spencer, N.; Balkan, A.; Ashton, Peter R.; T. Walker, R.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*; **1997**, *1*, 121.
15. Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; *J. Phys. Chem. B*; **2007**, *111*, 1188.
16. McGimpsey, W. C. S., J.C, *Chem. Phys. Lett* **1987**, *138*.
17. Sakamoto, M. C., X.; Hara, M.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4657.
18. Sakamoto, M.; Cai, X.; Hara, M.; Tojo, S.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Phys. Chem. A*; **2004**, *108*, 10941.
19. Miranda, M. A.; Pérez.-Prieto, J.; Font-Sanchis, E.; Scaiano, J. C.; *Acc. Chem. Res.*; **2001**, *34*, 717.
20. McKinnell, D.; Basnak. I.; Hamor, T. A.; Spencer, N.; Ashton, P; Walker, R.; *Tetrahedron*; **1996**, *52*, 10159.
21. Shugar, E. K. D.; *Science*; **1971**, *173*, 3995.



**Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2-pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Troya**



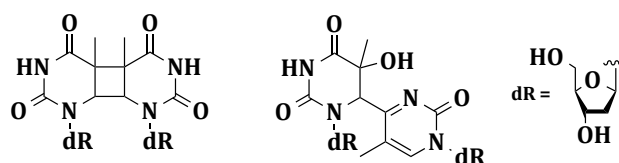


## 6.1 Introducción

Tal y como se ha expuesto en la introducción, la relevancia biológica de la radiación UV reside en la formación de lesiones citotóxicas y mutagénicas en el ADN,<sup>1</sup> siendo los dímeros ciclobutánicos (DCBs) y los fotoproductos (6,4) (6,4 PPs) las lesiones mayoritarias inducidas y relacionadas con el cáncer de piel (Fig. 6.1).<sup>2-4</sup>

Los 6,4 PPs se observan solo tras radiación directa (UVB), a diferencia de los DCBs que aparecen tanto por radiación directa como fotosensibilizada (UVA).<sup>5</sup> Además de la formación de DCBs, la radiación UVA también está involucrada en la oxidación de purinas mediante especies reactivas de oxígeno (Fig 1.7).<sup>6-7</sup>

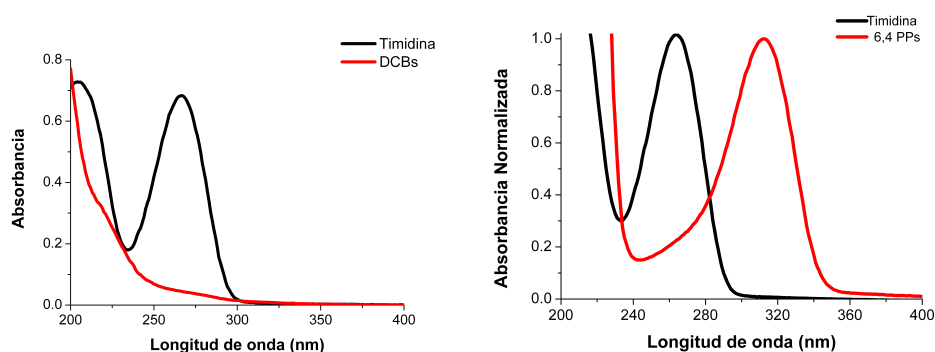
Cabe resaltar que la extensión de la fracción “activa” del espectro solar hacia la región UVA por ciertos agentes exógenos implica un incremento de la probabilidad de desarrollar cáncer de piel tras exposición solar.<sup>7</sup> De hecho, se estima que esta radiación contribuye entre el 10 y el 20% a la dosis de luz carcinogénica en humanos.<sup>8</sup>



**Fig. 6.1** : Estructura de los dímeros ciclobutanos (DCBs) y los fotoproductos 6,4 (6,4PPs).

Desde el punto de vista fotofísico, las bases pirimidínicas presentan una banda de absorción UV característica centrada a 260 nm la cual desaparece al originarse los DCBs como resultado de la formación del anillo ciclobutánico (Fig. 6.2). Por otra parte, los 6,4PPs exhiben una banda de absorción en la región del UVB-UVA (Fig. 6.2) debido a la presencia del cromóforo 5-metil-2-pirimidona.<sup>3</sup> Esto significa que

cuando se originan en el ADN, podrían actuar a su vez como fotosensibilizadores de forma endógena, actuando del mismo modo que un caballo de Troya.

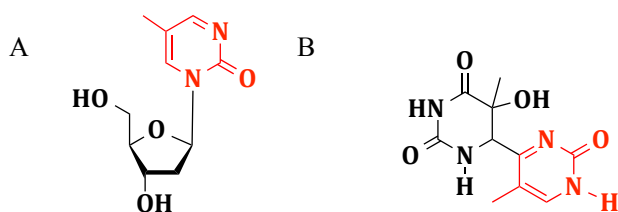


**Fig. 6.2:** Banda de absorción característica de timidina ( $\lambda_{\text{máx}} = 260$  nm) que izquierda) desaparece tras la formación de DCBs. derecha) Espectro UV característico del 6,4PP con máximo a 310 nm.

Las propiedades fotofísicas del cromóforo 5-metil-2-pirimidona varían dependiendo de las estructuras complejas de las que forma parte. Así, para su estado excitado singlete se ha descrito que su  $\lambda_{\text{máx}}$  se sitúa entre los 380 y los 400 nm, con un rendimiento cuántico que varía de 0.01 hasta 0.2.<sup>9</sup> Además se ha descrito que su estado excitado triplete tiene un tiempo de vida que se encuentra en el rango de los microsegundos cuando se evalúa el cromóforo 5-metil-2-pirididona aislado o unos pocos nanosegundos cuando el daño se produce en un dinucleótido.<sup>10-12</sup> La energía de singlete y triplete del daño se ve también influenciada por el medio en el que se encuentre, incluso por la secuencia de bases que la flanquea. En este contexto parece conveniente establecer las propiedades fotofísicas de los daños 6,4 PPs aislados, cómo varía su comportamiento en presencia de unidades estructurales del ADN como la timina y su potencial fotosensibilizador de la biomacromolécula.

El presente capítulo se ha estructurado en dos partes: en la primera de ellas se muestran los resultados obtenidos al evaluar el potencial fotosensibilizador de los 6,4 PPs en el ADN usando su cromóforo como modelo. Para ello se sintetizó el pro-

ducto 1- $\beta$ -D-(2'-deoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona (Pyo). En la segunda parte se presentan los resultados obtenidos con el propio daño (6,4 PP) (Fig. 6.3).



**Fig. 6.3:** Estructura de los compuestos a estudiar: A) 1- $\beta$ -D-(2'-deoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona (Pyo) y B) 6,4PP.

## 6.2 Objetivo

El objetivo general de este capítulo consiste en i) elucidar la fotofísica de 1- $\beta$ -D-(2'-deoxiribosil)-5-metil 2-pirimidona (Pyo) y la lesión 6,4 PP y ii) demostrar que los fotoproductos 6,4 pueden actuar como fotosensibilizadores de ADN a través de reacciones de transferencia de energía y/o generación de especies reactivas de oxígeno.

## Parte 1: 1- $\beta$ -D-(2'-deoxiribosil)-5-metil 2-pirimidona como fotosensibilizador del ADN

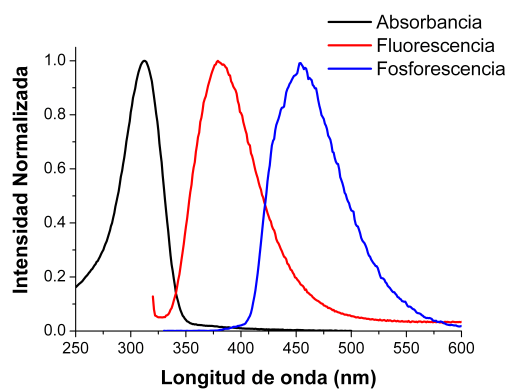
### 6.3.1 Resultados

#### 6.3.1.1 Propiedades fotofísicas de Pyo

Entre los diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en el daño fotosensibilizado al ADN se encuentran la dimerización de bases pirimidínicas como resultado de transferencia de energía triplete-triplete (TETT) y la oxidación de purinas mediante especies reactivas de oxígeno (ROS).<sup>6-7,13</sup> En los dos casos es importante esclarecer las propiedades fotofísicas del agente endógeno o exógeno para evaluar su potencial como fotosensibilizador.

##### 6.3.1.1.1 Espectros de absorción UV, emisión de fluorescencia y fosforescencia

En la Fig. 6.4 se presenta el espectro de absorción ultravioleta registrado de Pyo en una disolución salina tamponada (PBS) junto con emisión de fluorescencia que presenta un máximo a 380 nm. De la intersección entre los espectros normalizados de emisión y excitación se calculó la energía del estado singlete, su valor fue de 351 kJ/mol. La energía del estado excitado triplete de Pyo, de 291 kJ/mol, se obtuvo a partir del espectro de fosforescencia registrado en etanol a 77 K (Fig. 6.4).

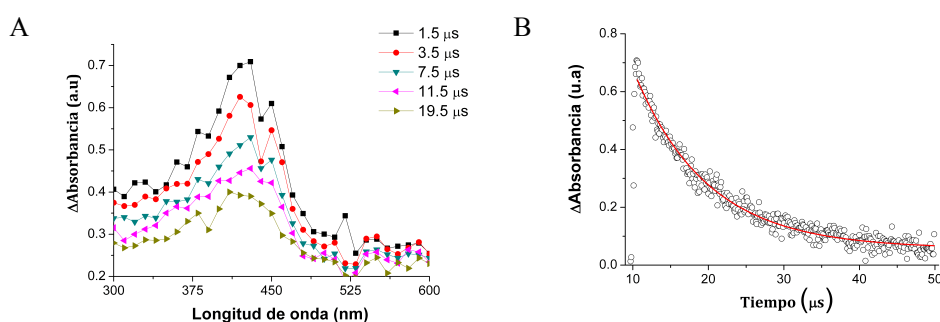


**Fig. 6.4:** Espectros de absorción (negro) y fluorescencia (rojo) de Pyo en PBS. Espectro de fosforescencia en etanol (azul) registrado a 77 K.

Asimismo, el rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.083, se calculó utilizando carbazol como referencia ( $\phi_F=0.42$ ).<sup>14</sup>

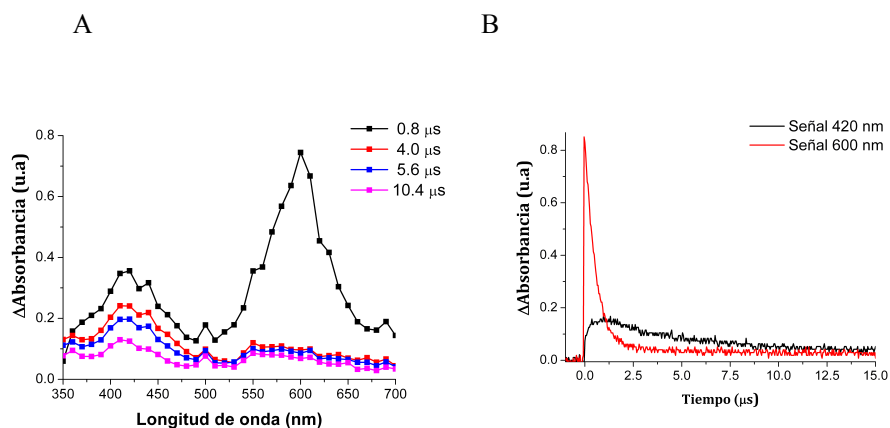
### 6.3.1.1.2 Fotólisis de destello láser

Se registró el espectro de las especies transitorias mediante fotólisis de destello láser y se obtuvo una sola banda con un máximo de absorción a 420 nm y un tiempo de vida( $\tau_T$ ) de 9.7 $\mu$ s (Fig. 6.5).



**Fig. 6.5:** A) Fotólisis de destello láser de Pyo en PBS y burbujeado con  $N_2O$  a distintos tiempos después del pulso del láser. B) Señal láser registrada a 420 nm.

Esta banda se asignó tentativamente al estado triplete excitado de Pyo debido a su desactivación eficiente por  $O_2$  (anexo). Para confirmar dicha asignación se llevó a cabo un experimento de fotosensibilización por TETT entre la xantona y Pyo. Así la excitación selectiva de xantona, a 355 nm en presencia de Pyo condujo a la disminución de la banda asociada al estado excitado triplete de la primera ( $^3Xan^*$ ,  $\lambda_{max}=620$  nm) al mismo tiempo que crecía la banda a 420 nm del  $^3Pyo^*$  (Fig. 6.6). Este resultado confirmó la multiplicidad del estado excitado observado. Además, a partir de la representación de la inversa los tiempos de vida de  $^3Xan^*$  frente a la concentración de Pyo se determinó que la constante del proceso es de  $1.6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ , típica de los de transferencia de energía.

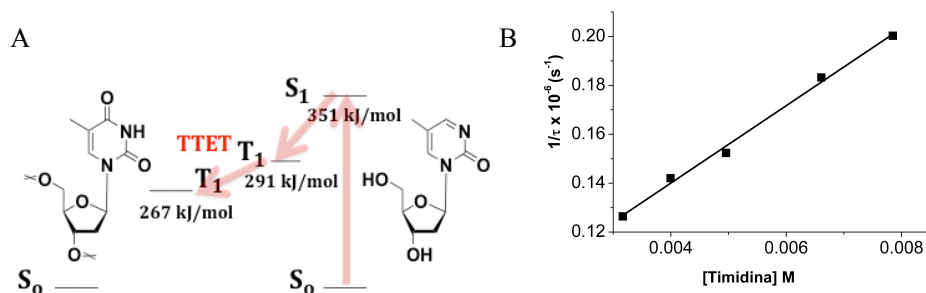


**Fig. 6.6:** A) Fotólisis de destello láser de xantona en presencia de Pyo a distintos tiempos después del pulso del láser. B) Señales registradas a 420 nm y 600 nm.

Además, se calculó el rendimiento cuántico de triplete ( $\phi_T$ ) del compuesto mediante el método de comparación utilizando benzofenona como referencia ( $\epsilon_T=6250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $\phi_T= 1$ ), éste fue de 0.28.

### 6.3.1.2 Formación de dímeros ciclobutánicos

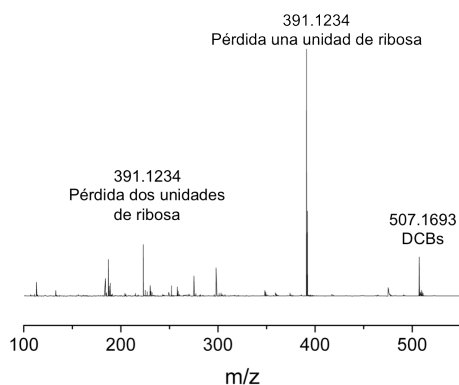
Cabe destacar que la energía de  $^3\text{Pyo}^*$  es 24 kJ/mol más alta que la de la timina cuando forma parte del ADN (Fig. 6.7A).<sup>15</sup> Esto significa que después de absorber luz,  $^3\text{Pyo}^*$  puede realizar una TE a la base en la doble hélice, conduciendo a la formación de lesiones DCBs. Para determinar si el  $^3\text{Pyo}^*$  puede participar en una posible TETT se realizó un estudio de desactivación mediante la adición de cantidades crecientes de timidina. De acuerdo con el pequeño salto energético entre el aceptor timidina y el dador, la constante de desactivación determinada a partir de la representación Stern-Volmer fue de  $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Fig. 6.7B).



**Fig. 6.7:** A) Representación esquemática del proceso de transferencia de energía desde Pyo a timidina. B) Representación de la inversa de los tiempos de vida Pyo en presencia de diferentes concentraciones de timidina.

Adicionalmente, para esclarecer si esta TETT es el origen de los DCBs, se irradió una disolución acuosa que contenía timidina/Pyo (en proporción 2:1) con una fuente de luz acoplada a un monocromador ( $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ) de modo que la luz es absorbida únicamente por Pyo. La mezcla irradiada se analizó por HPLC-MS a través de la detección del correspondiente ión aducto de sodio del DCB de timina a  $m/z$  507. El análisis por UPLC MS/MS permitió identificar la formación de dímeros de timidina, basada en la medida de masa exacta ( $m/z$  507.1693, obtenida para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7$ ) y su fragmentación  $m/z$  391.1234 para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$  y  $m/z$  275.0769 para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ , correspondientes a la pérdida de una y dos unidades ribosa respectivamente(Fig. 6.8).<sup>16</sup>





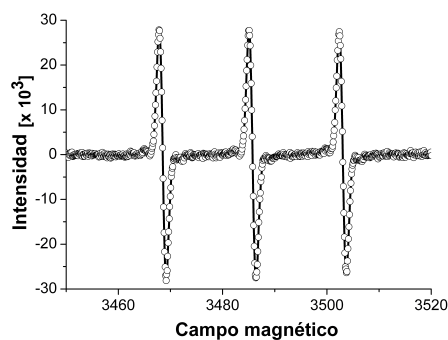
**Fig. 6.8:** Espectro de masas obtenido del crudo de irradiación Pyo: timidina ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) tras el análisis UPLC-MS/MS.

### 6.3.1.3 Procesos oxidativos

Por otra parte, tal y como ha sido mencionado anteriormente, los procesos oxidativos mediante especies ROS representan otro tipo relevante de daño al ADN fotosensibilizado.<sup>6</sup> Entre ellas destacan el oxígeno singlete y el radical hidroxilo. La posible generación de estas especies reactivas ha sido investigada mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) usando el método *spin-trapping*.

#### 6.3.1.3.1 El oxígeno singlete

En particular, la generación de oxígeno singlete se confirmó mediante la irradiación de una disolución acuosa de Pyo ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) en presencia de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP), que dio lugar a su correspondiente radical libre TEMPO. Esta especie se hizo evidente en EPR debido a su señal triplete característica con  $a_N = 17.3$  G y  $g = 2.0053$  (Fig. 6.9).<sup>17</sup> Además, se observó un incremento de la intensidad de la señal cuando el agua fue sustituida por agua deuterada, debido al mayor tiempo de vida del oxígeno singlete en este disolvente.

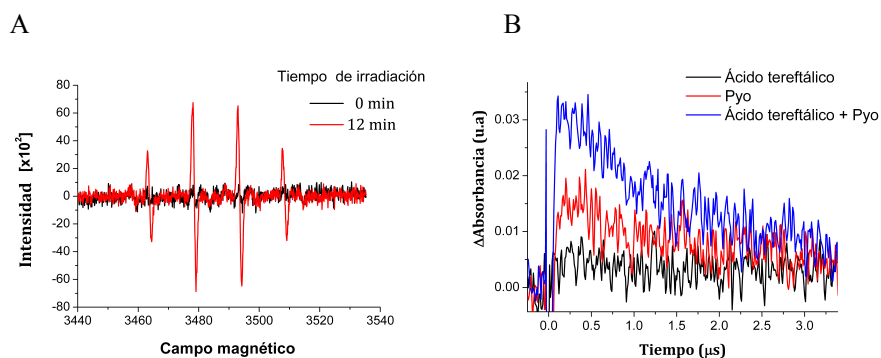


**Fig. 6.9:** Señal de TEMPO obtenida por EPR tras la irradiación de Pyo en presencia de TEMP.

#### 6.3.1.3.2 El radical hidroxilo

La generación del radical hidroxilo se evidenció al irradiar Pyo ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) en presencia del N-óxido de 5, 5-dimetil-1-pirrolidona (DMPO). La muestra resultante se analizó por EPR, mostrando la aparición de un cuarteto con  $a_N = a_G$  15.15 y  $g = 2.0057$ , asignado a la formación del aducto DMPO-OH (Fig. 6.10A).<sup>18</sup>

Además, en presencia del ácido tereftálico, se corroboró la generación del radical hidroxilo por Pyo mediante fotólisis de destello láser. Se observó la formación y crecimiento de una señal que absorbe a 350 nm, asignada al aducto hidroxilo-ácido tereftálico previamente publicado (Fig. 6.10B).<sup>19</sup>



**Fig. 6.10:** A) Espectro del aducto DMPO-OH obtenido tras irradiar Pyo en presencia de DMPO. B) señal de láser a 350 nm correspondiente al aducto hidroxilo de una muestra que contiene una mezcla de ácido tereftálico y Pyo.

#### 6.3.1.4 Pyo como fotosensibilizador de la formación de DCBs de timina en el ADN

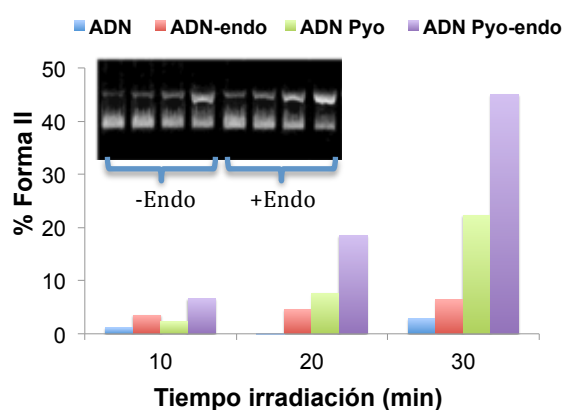
Los experimentos anteriores indican que Pyo puede estar involucrada en la formación de DCBs y de daño oxidativo en las bases del ADN. Así pues se pasó a evaluar si además actúa como *fotosensibilizador del ADN* produciendo ambos tipos de daños. Para ello se utilizó ADN plásmido pBR322, que es una herramienta muy útil en estos casos ya que su forma I (superenrollada) se convierte en forma II (circular), al producirse roturas simples de la doble hélice (SSB),<sup>20</sup> que se deben a la oxidación de los enlaces glicosídicos y fosfodiéster de las bases que la conforman. La diferente movilidad de ambas formas en un gel de agarosa permite detectar y cuantificar este tipo de daño (Fig. 6.11). Sin embargo, la formación de DCBs en el ADN no se puede detectar directamente como los SSB. En este caso, se requiere el uso de una enzima específica reparadora para revelarlo, la T4 endonucleasa V. Ésta, cuando detecta al DCB, se adhiere a su enlace glicosídico e induce la rotura del enlace fosfodiéster. De este modo, tras el tratamiento con la enzima, los DCB pueden ser detectados por el incremento de SSB en comparación con el ADN sin tratar.<sup>21</sup>



**Fig. 6.11:** Esquema representativo del comportamiento del ADN plásmido pBR322 tras la rotura de cadenas simples (SSB) y de su distinta movilidad electroforética sobre un gel de agarosa.

Experimentalmente, una mezcla de Pyo/ADN pBR322 se irradió con un fotorreactor equipado con lámparas que emiten en la región del UVA ( $300 \text{ nm} < \lambda_{\text{irr}} < 400 \text{ nm}$ ), durante 10, 20 y 30 minutos. Las muestras irradiadas se cargaron sobre un gel de agarosa y se le aplicó una diferencia de potencial de 50 voltios durante 2 horas.

El resultado mostró un incremento consistente de la forma II del ADN con el tiempo de irradiación (Fig. 6.12). Esta tendencia se acentuó cuando las muestras se incubaron con T4 endonucleasa V durante 1 hora (Fig. 6.12 inserción). La cantidad de SSB formadas se cuantificó mediante densitometría; la diferencia encontrada entre las muestras sin o con tratamiento enzimático corresponde a la cantidad de DCBs formada.



**Fig. 6.12:** Formación de la Forma II tras irradiación de ADN plásmido pBR322 en presencia o ausencia de Pyo, tratado o no con T4 endonucleasa V (Endo). Inserción: gel de agarosa de las mezclas ADN:Pyo en presencia o ausencia de Endo.

*Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2-pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Troya*

---

## Parte 2: El fotoproducto (6,4) como fotosensibilizador del ADN

### 6.3.2 Resultados

Tras caracterizar y establecer el potencial fotosensibilizador de 1-β-D-(2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona como modelo de los 6,4 PPs, se procedió a evaluar el comportamiento del propio daño.

En primer lugar se sintetizó 6,4 PP (Fig 6.13). Brevemente, se preparó un precursor que contenía dos unidades de timina unidas mediante un puente metilendioxi adaptando un procedimiento descrito en la bibliografía.<sup>22-23</sup> A continuación, se irradió mediante luz UVB siguiendo el avance de la reacción por medio de HPLC-DAD. Se aisló el pico que mostraba un espectro de UV con máximo de absorción a 314 nm. El tratamiento posterior con HF-piridina permitió obtener el producto deseado, que fue purificado por HPLC y caracterizado por RMN y HRMS H<sup>+</sup>.<sup>9</sup>

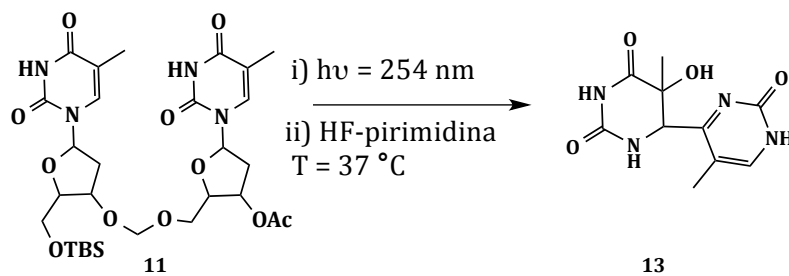
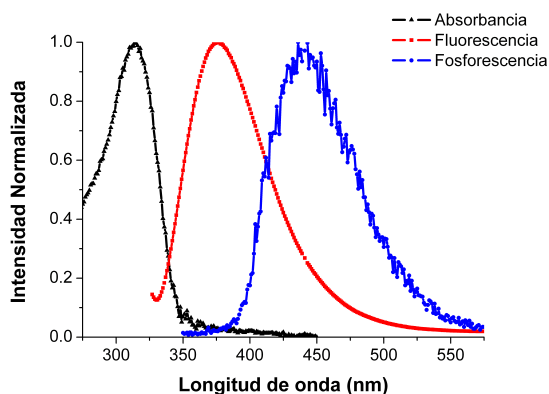


Fig. 6.13: Representación de la reacción del precursor **11** para obtener 6,4PP.

### 6.3.2.1 Propiedades fotofísicas de 6,4PP

En la Fig. 6.14 se muestran los espectros de absorción ultravioleta, de fluorescencia y de fosforescencia de 6,4 PP. El espectro de UV presenta un máximo a 314 nm, mientras que el de la emisión de fluorescencia se encuentra a 376 nm (Fig. 6.14). Del mismo modo que en el caso de Pyo, a partir de la intersección entre los espectros de emisión y excitación se calculó la energía de su estado singlete, que resultó ser de 351 kJ/mol. La energía de su estado triplete a partir del espectro de fosforescencia fue ligeramente superior a la del modelo estudiado (296 kJ/mol frente a 291 kJ/mol para Pyo). (Fig. 6.14).

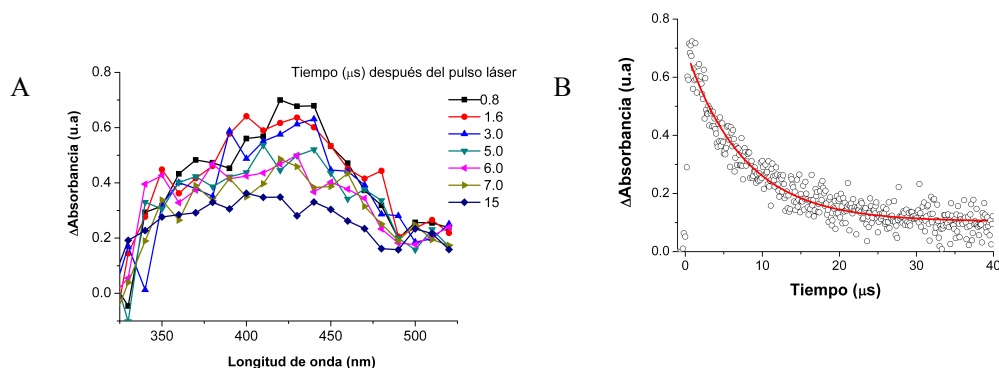


**Fig. 6.14:** Espectros de absorción (negro) y fluorescencia (rojo) de 6,4PP en PBS. Espectro de fosforescencia (azul) en etanol a 77 K.

El rendimiento cuántico de fluorescencia fue de 0.092, calculado usando carbazol como referencia ( $\phi_F=0.42$ ).<sup>14</sup>

### 6.3.2.2 Fotólisis de destello láser

El espectro de absorción transitoria de 6,4 PP se registró excitando a la longitud de onda de 308 nm y presentó una banda amplia centrada sobre 420 nm y un tiempo de vida de 7.5  $\mu\text{s}$ . Este resultado es similar al obtenido en nuestro laboratorio con Pyo y al obtenido por Zinth y colaboradores mediante espectroscopía ultrarrápida de absorción de la lesión formada en el dinucleótido timidilil(3'→5')timidina.<sup>12</sup>



**Fig. 6.15:** A) Fotólisis de destello láser de 6,4 PP en PBS bajo atmósfera de  $\text{N}_2\text{O}$  a distintos tiempos después del pulso láser. B) Desaparición de la señal a 420 nm de 6,4 PP.

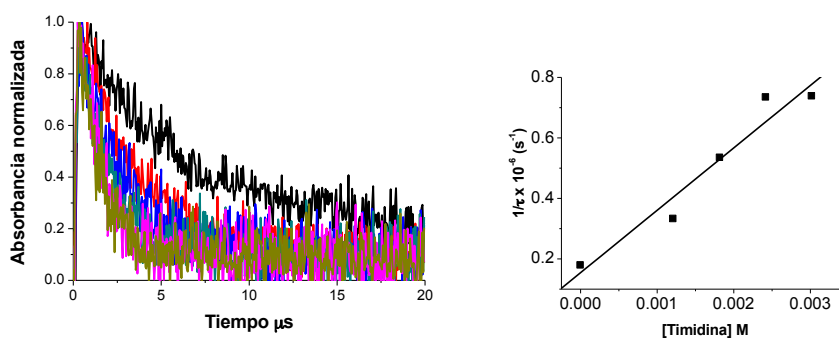
Esta banda se asignó al triplete de 6,4 PP por similitud con el de Pyo (anexo) y porque se desactiva en presencia de oxígeno con una constante de velocidad de  $2.70 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . También se determinó su  $\phi_T$ , que fue de 0.32.

### 6.3.2.3 Formación de dímeros ciclobutánicos

Según los cálculos realizados, la  $E_T$  de 6,4 PP es 29 kJ/mol más alta que la de la timina presente en el ADN;<sup>20</sup> esto implica que, al igual que Pyo, podría realizar una TE a esta base, originando DCBs. De hecho, se realizó un experimento de desactivación del  ${}^36,4 \text{ PP}^*$  (seguido a 420 nm) mediante la adición de cantidades cre-



cientes de timidina y se observó una desactivación efectiva por parte de ésta. La constante de velocidad del proceso fue de  $2.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  calculada a partir de una representación de Stern-Volmer ( Fig. 6.16).



**Fig. 6.16:** A) Señales registradas a 420 nm tras excitación láser de 6,4PP en presencia de cantidades crecientes de timidina (1.2 mM-3 mM). B) Representación de la inversa de los tiempos de vida de 6,4 PP\* en función de la concentración de timidina.

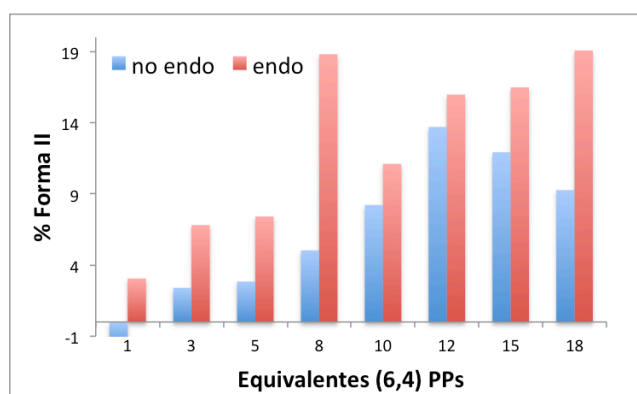
#### 6.3.2.4 El daño 6,4 PP como fotosensibilizador de DCBs de timina en el ADN

El potencial de 6,4PP para actuar como fotosensibilizador de DCBs, se evaluó al igual que en el caso de Pyo, analizando su capacidad para inducir SSB en ADN pBR322 y comparando muestras con tratamiento y sin tratamiento con T4 endonucleasa V para revelar la formación de DCBs. En primer lugar se optimizó la proporción ADN:6,4 PP a utilizar.

##### 6.3.2.4.1 Optimización de la ratio ADN: 6,4 PP

Se prepararon muestras con diversas proporciones de ADN: 6,4 PP y se irradiaron durante 20 min con un fotorreactor (lámparas con  $300 < \lambda_{\text{irr}} < 400$ ). A continuación se cargaron en un gel de agarosa que fue sometido a una diferencia de potencial de 50 V durante 2 h. Los resultados analizados por densitometría de

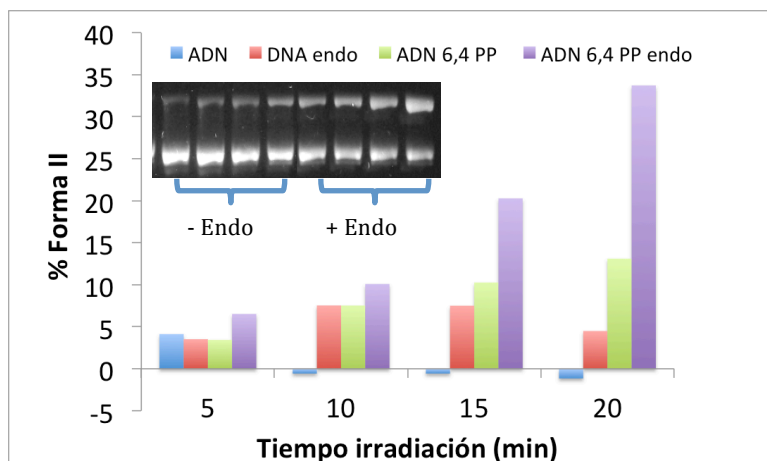
muestras con y sin tratamiento con T4 endonucleasa V evidenciaron que la proporción adecuada de fotosensibilizador para inducir la formación de DCBs era de 8 veces la concentración de ADN (en pares de bases) (Fig. 6.17).



**Fig. 6.17:** Obtención de la forma II tras 20 minutos de irradiación de una mezcla de 6,4PP y ADN en distintas proporciones.

#### 6.3.2.4.2 El 6,4 PP como fotosensibilizador de DCBs en el ADN

Se irradiaron durante 5, 10, 15 y 20 minutos muestras que contenían ADN y 6,4 PP en proporción adecuada, y el resultado se cargó en un gel de agarosa que se sometió a una diferencia de potencial de 50 V durante 2 h. Con este experimento se pudo determinar, al comparar los datos de las muestras con y sin tratamiento con T4 endonucleasa V, que tras 20 minutos de irradiación se induce un 20% de forma II, correspondiente a DCBs en el ADN (Fig. 6.18).



**Fig. 6.18:** Obtención de la forma II tras la irradiación de ADN plásmido pBR322 (38  $\mu$ M en pares de bases) en presencia o ausencia de 6,4PP (302  $\mu$ M), tratado o no con T4 endonucleasa V (Endo). Inserción: gel de agarosa de las mezclas ADN+6,4PP en presencia y ausencia de Endo.

## 6. 4 Conclusiones

La molécula 1- $\beta$ -D-(2' deoxiribosil)-5-metil -2-pirimidona, cromóforo de la lesión 6,4 PP, actúa como agente fotosensibilizador del ADN a través de su estado excitado triplete. También lo hace el propio daño 6,4 PP que puede inducir lesiones en la biomacromolécula, actuando como caballo de Troya y extendiendo la fracción activa de la luz hacia la región UVA. Este hecho convierte al 6,4 PP en un daño potencialmente más peligroso de lo estimado hasta la fecha.

## 6.5. Sección experimental

### 6.5.1 Medidas espectroscópicas

Las medidas de fluorescencia fueron registradas después de ajustar la absorbancia de las muestras a aproximadamente 0.1 a la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc} = 313$  nm). En el caso de la fosforescencia, los compuestos se disolvieron en etanol, se introdujeron en un tubo de cuarzo y se enfriaron a 77 K con nitrógeno líquido.

### 6.5.2 Fotólisis de destello láser

Los experimentos de destello láser se realizaron usando un láser excímero pulsado de Xe/HCl ( $\lambda_{exc} = 308$  nm) y un láser de Nd:YAG ( $\lambda_{exc} = 355$  nm o 266 nm).

Los espectros de absorción de las especies transitorias de Pyo y 6,4 PP en PBS se registraron después de su excitación directa a 308 nm en atmósfera de N<sub>2</sub>O. Por otro lado, se usó timidina (Tmd) como desactivador del <sup>3</sup>Pyo\* y <sup>3</sup>6,4PP\*. Los experimentos, seguidos a 420 nm, se efectuaron introduciendo cantidades crecientes de Tmd, de 1.3 mM a 7.9 mM, a una disolución de Pyo y, de 1.2 mM a 3.0 mM, a una de 6,4 PP. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación fue aproximadamente de 0.3.

El experimento de desactivación de <sup>3</sup>Xan\* por Pyo fue realizado usando el láser Nd:YAG como fuente de excitación. Con este propósito, Pyo (desde 0 mM a 0.5 mM) se añadió a una disolución de Xan en agua/ acetonitrilo 2:1 (v/v) y se registraron las trazas a 420 nm y 520 nm, correspondientes a <sup>3</sup>Pyo\* y <sup>3</sup>Xan\*, respectivamente.

### 6.5.3 Determinación del rendimiento cuántico de triplete Pyo y 6,4 PP. Método de comparación

Los rendimientos cuánticos de triplete de Pyo y 6,4 PP ( $\phi(^3Pyo(420\text{ nm}))$  y  $\phi(^36,4\text{ PP}(420\text{ nm}))$ ) se calcularon aplicando el método de comparación, usando BP ( $\epsilon(^3BP(530\text{ nm})) = 6250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ;  $\phi(^3BP(530\text{ nm})) = 1$ ) como patrón, con la siguiente ecuación:

$$\phi(^3Pyo(420\text{ nm})) \times \epsilon(^3Pyo(420\text{ nm})) = \phi(^3BP(530\text{ nm})) \times \epsilon(^3BP(530\text{ nm})) \times \frac{\Delta OD_{(Pyo\ 420\text{ nm})}}{\Delta OD_{(BP\ 530\text{ nm})}} \quad (6.1)$$

donde  $\Delta OD$  corresponde a la amplitud de la señal a la longitud de onda de excitación 530 nm para BP y 420 nm para Pyo y 6,4 PP.

Según la ecuación (6.1), se necesita saber el valor de  $\epsilon(^3Pyo(420\text{ nm}))$  y  $\epsilon(^36-4\text{ PP}(420\text{ nm}))$ . En los dos casos se utilizó el  $\epsilon(^3Pyo(420\text{ nm}))$ , que fue determinado a partir de un experimento de TETT, en el que se desactivó el estado triplete excitado de la Xan ( $\lambda = 633\text{ nm}$ ) por Pyo o 1-metilnaftaleno (MeNP) usado como estándar.<sup>24</sup> El coeficiente de absorción molar del  $^3Pyo$  fue obtenido del ratio entre el  $\Delta OD$  de Pyo (a  $\lambda = 420\text{ nm}$ ) y 1-metilnaftaleno ( $\lambda = 415\text{ nm}$ ) cuando más del 95% del triplete de Xan se desactiva. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\epsilon(^3Pyo(420)) = \epsilon(^3MeNP(415)) \times \Delta OD(^3Pyo(420)) / \Delta OD(^3MeNP(415)) \quad (6.2)$$

donde  $\Delta OD(^3Pyo(420))$  y  $\Delta OD(^3MeNP(415))$  se refiere a la absorción transitoria de triplete de Pyo y 1-metilnaftaleno (a 420 y 415 nm, respectivamente) al final del proceso, y  $\epsilon(^3MeNP(415))$  corresponde al coeficiente de absorción molar de 1-metilnaftaleno a 415 nm ( $\epsilon = 11\ 200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  en acetonitrilo).<sup>25</sup>

Luego se calculó el  $\phi(^3Pyo(420\text{ nm}))$  y  $\phi(^36,4\text{ PP}(420\text{ nm}))$  aplicando la ecua-

ción 6.1. Para ello se registraron las señales de BP ( $\lambda = 530$  nm), Pyo y 6,4 PP ( $\lambda = 420$  nm) con el láser ( $\lambda_{\text{exc}} = 266$  nm).

#### 6.5.4 Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) se determinaron utilizando carbazol como patrón y aplicando la siguiente ecuación:

$$\phi_F = \phi_P \times \frac{n_i^2}{n_p^2} \cdot \frac{\text{Área}_i}{\text{Área}_p} \times \frac{1-10^{-\text{Abs}_i}}{1-10^{-\text{Abs}_p}} \quad (6.3)$$

donde los subíndices “i” y “P” se refieren a la muestra de interés y al patrón, respectivamente,  $n$  representa el índice de refracción de los correspondientes disolventes,  $\text{Área}$  representa las integrales de los correspondientes espectros de emisión y  $\text{Abs}$  representa la absorbancia a la  $\lambda_{\text{exc}}$ .

#### 6.5.5 Irradiación monocromática

Una disolución que contenía Tmd ( $2.2 \times 10^{-4}$  M) y Pyo ( $1 \times 10^{-4}$  M) en PBS fue introducida en una cubeta de cuarzo, burbujeada con  $\text{N}_2$  e irradiada con una lámpara de Xe equipada con un monocromador para seleccionar una longitud de onda de excitación de 320 nm. El progreso de la reacción fue monitorizado por UPLC-MS/MS.

#### 6.5.6 Análisis UPLC-MS/MS

La separación de las muestras por UPLC-MS/MS fue realizada en una columna C18 ACQUITY UPLC HSS T3 (150mm X 2.1mm i.d., 1.8mm). La temperatura de la columna fue mantenida a 40 °C. El análisis fue llevado a cabo usando una mezcla de metanol/agua 20:80 (conteniendo 0.01% ácido fórmico) como fase móvil y un flujo de 0.2 mL/min.

### **6.5.7 Experimentos “spin trap”/ EPR**

#### *6.5.7.1 Detección de oxígeno singlete*

Una disolución acuosa de 10 mM TEMP, dispuesta en una cubeta de cuarzo y purgada con N<sub>2</sub> conteniendo 0.35 mM de Pyo, (abs < 0.3 a 320 nm), fue irradiada a 320 nm con una lámpara de Xe equipada con un monocromador. El espectro de EPR fue registrado a distintos tiempos de irradiación mediante el espectrómetro EPR Bruker EMX 10/12.

#### *6.5.7.2 Detección del radical hidroxilo*

Una disolución acuosa, de DMPO (150 mM) conteniendo Pyo (0.8 mM) fue irradiada en una cubeta de cuarzo y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a 320 nm mediante una lámpara de xenón acoplada a un monocromador y analizada a diferentes tiempos de irradiación con el espectrómetro EPR Bruker EMX 10/12.

### **6.5.8 Formación del aducto ácido tereftálico-OH**

Una disolución de Pyo ( $8.5 \times 10^{-2}$  mM) en presencia de ácido tereftálico (1 mM) en PBS, purgada con N<sub>2</sub>, fue analizada mediante un láser excímero ( $\lambda = 308$  nm). La presencia del aducto ácido tereftálico-OH fue evidenciada por su absorción transitoria a  $\lambda = 350$  nm.

### **6.5.9 Estados triplete excitados de Pyo o 6,4 PP como sensibilizadores de la dimerización de timidina en el ADN**

Muestras que contenían ADN circular superenrollado (pBR322; 5 mL; 40  $\mu$ M, en de pares de bases) en ausencia o presencia del fotosensibilizador (605  $\mu$ M

de Pyo o 303  $\mu\text{M}$  de 6,4 PP) se usaron en los experimentos de electroforesis. Así, 20  $\mu\text{L}$  de muestra se irradiaron usando un fotorreactor con lámparas emitiendo en el rango de 300-400 nm con un máximo a 355 nm. Después, a 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras irradiadas se añadió 1  $\mu\text{L}$  de una disolución con 2 unidades T4 endonucleasa V. Tras incubar durante 1h a 37 °C, las muestras (tanto las tratadas con la enzima como las que no) fueron cargadas en un 0.8% de gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio o “red safe”, aplicando un potencial de 50 V durante 2 horas. La abundancia relativa del ADN superenrollado (forma I) y el ADN relajado (forma II) fue cuantificada con densitometría.

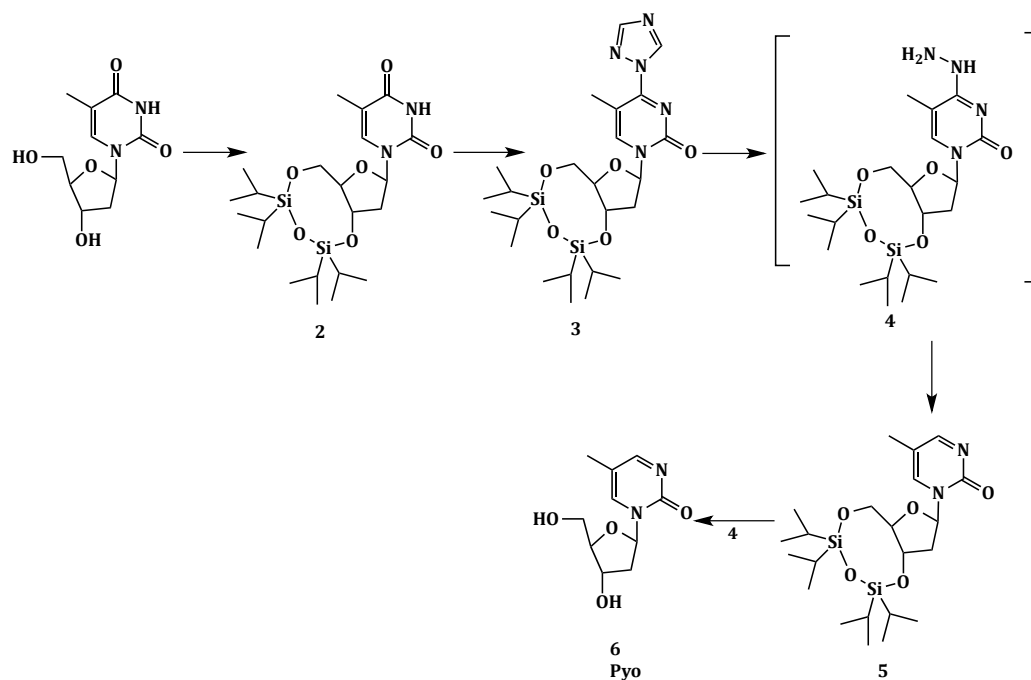
### **6.5.10 Síntesis de los compuestos**

#### *6.5.10.1 General*

Los reactivos de partida se adquieren de Sigma-Aldrich Co. o Berry&Associates, Inc. y usados sin purificación previa. Piridina anhidra fue utilizada como disolvente. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Cromatografías en columna fueron realizadas con gel de sílice de 60 A CC 35-70  $\mu\text{m}$  como fase estacionaria, adquirida de Merck, y usando disolventes de grado analítico obtenidos de Scharlau.



### 6.5.10.2 Esquema sintético de 1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona (Pyo)



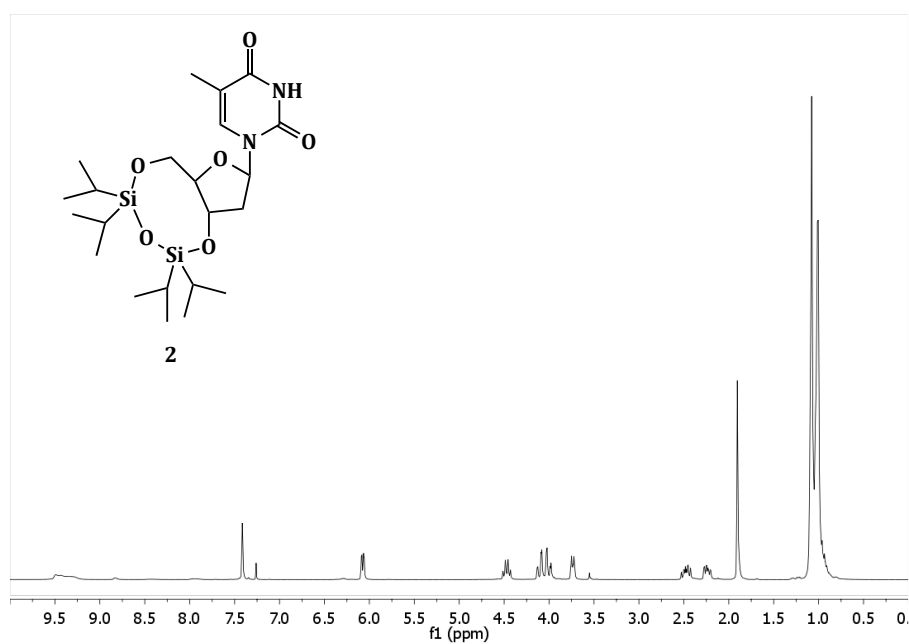
### 6.5.10.3 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-timidina 2

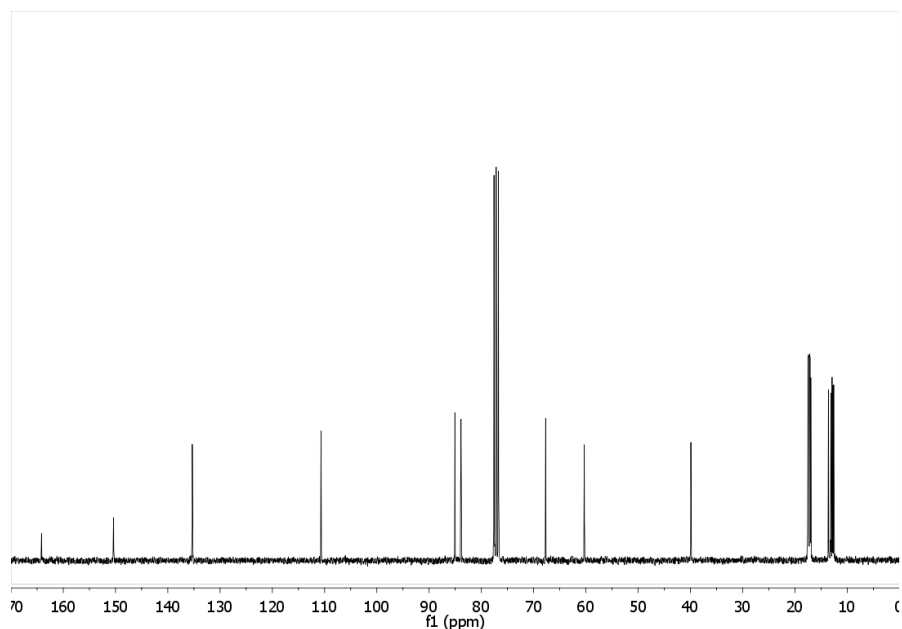
Este compuesto se sintetizó según procedimientos previos descritos.<sup>13</sup> Se disolvió Tmd (1.0 g, 4.1 mmol) en piridina anhidra (12 mL), y se añadió gota a gota 1,3 dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (TIPSCl) (1.3 equivalentes, 1.4 mL, 4.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno. Después se añadieron 2 mL de una disolución saturada de sal y se concentró bajo presión reducida. El residuo aceitoso obtenido se disolvió en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se extrajo, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró. El crudo de reacción se purificó sobre sílice usando hexano: AcOEt (1:0.8) como eluyentes. Rendimiento 95%.

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.45 (1H, bs, NH), 7.42 (br s, 1H), 6.09 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 4.51-4.43 (m, 1H), 4.13-3.98 (m, 1H), 3.76-3.72 (m, 1H), 2.53-2.43 (m, 1H),

2.28-2.20 (m, 1H), 1.90 (br s, 3H), 1.08-1.00 (m, 28H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.0, 150.4, 135.3, 110.7, 85.0, 83.9, 67.7, 60.3, 40.0, 17.6, 17.5, 17.3, 17.2, 17.1, 17.1, 16.9, 13.5, 13.1, 12.9, 12.7, 12.5. HRMS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}_2$  485.2503, encontrada 485.2507.

### Espectros $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ del compuesto 2:





#### 6.5.10.4 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-4-(1,2,4-1H-triazol-1-il)timidina **3**

A una suspensión de 1,2,4-triazol (6.91 g, 100 mmol) en acetonitrilo (ACN) anhidro (75 mL) a 0°C se añadió poco a poco P(O)Cl<sub>3</sub> (23 mmol, 2.1 mL) y trietilamina (100 mmol, 16.7 mL). Después de 30 min a 0°C, se añadió el compuesto **1** (6.5 mmol, 3.15 g) en ACN gota a gota durante 30 min. La reacción fue agitada durante 4 h. Luego se filtró, se evaporó y redisolvió en AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada y otra saturada de sal, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró bajo presión reducida.

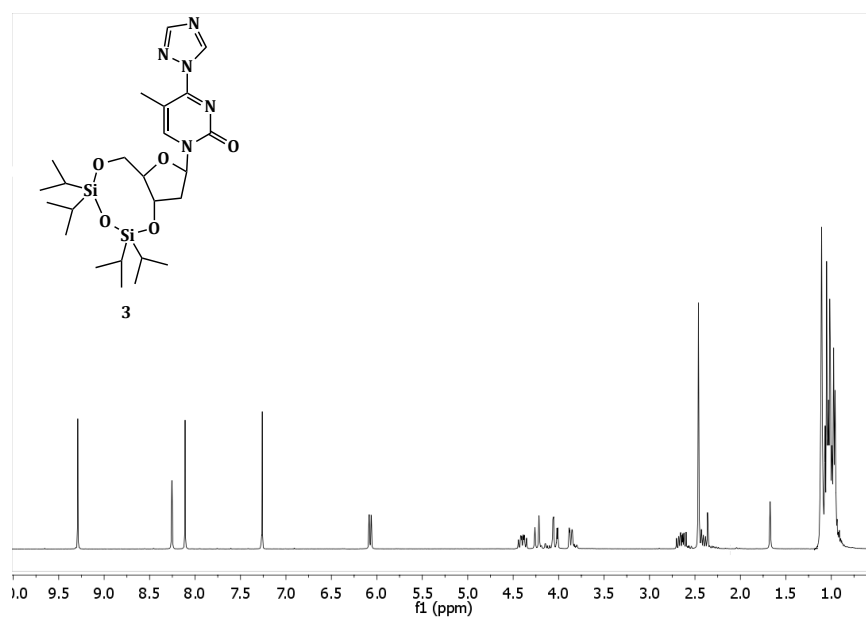
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.28 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.08 (dd, J = 7.5, 2.4 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.25 (dd, J = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 3.89 (m, 1H), 2.71-2.60 (m, 1H), 2.48-2.39 (m, 1H), 2.47 (br s, 3H), 1.12-0.97 (m, 28H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  158.2, 153.8, 153.4, 146.5, 145.1, 105.3, 86.2, 85.5, 66.1, 59.5, 39.5, 17.5, 17.4, 17.3, 17.3, 17.1, 17.0, 17.0, 16.9, 14.9, 13.5,

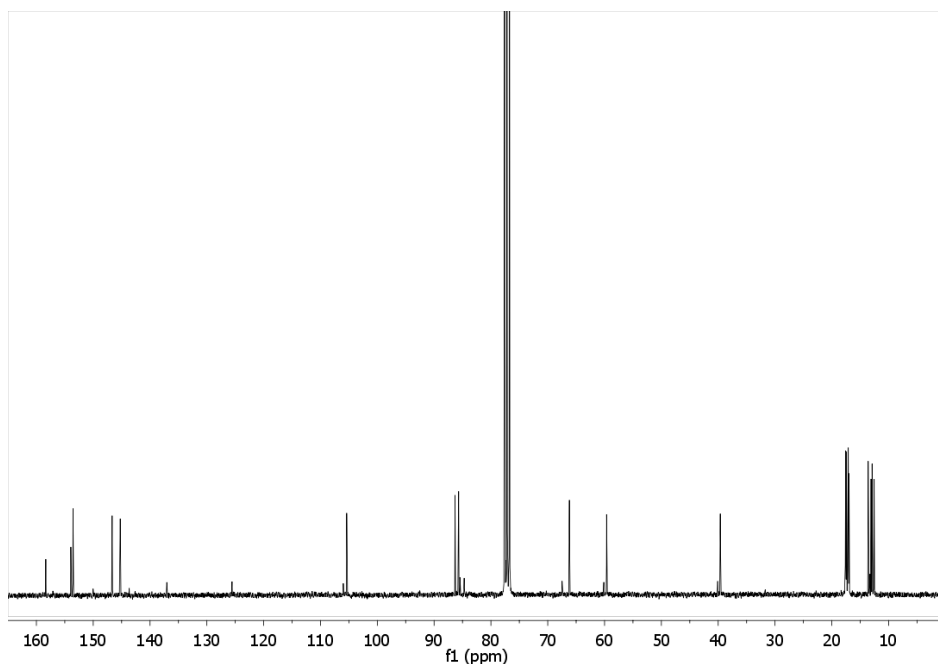
Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2-pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Troya

---

13.1, 12.8, 12.4. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: Calculada para C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> 536.2725, encontrada 536.2728.

**Espectros <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C del compuesto 3:**





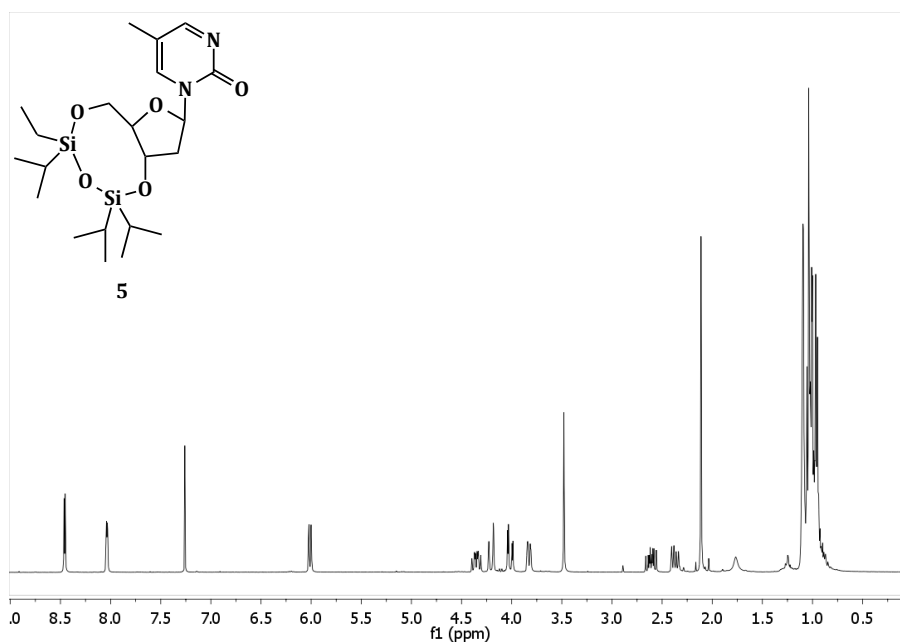
#### 6.5.10.5 Síntesis de 3',5'-O-TIPS-1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona **5**

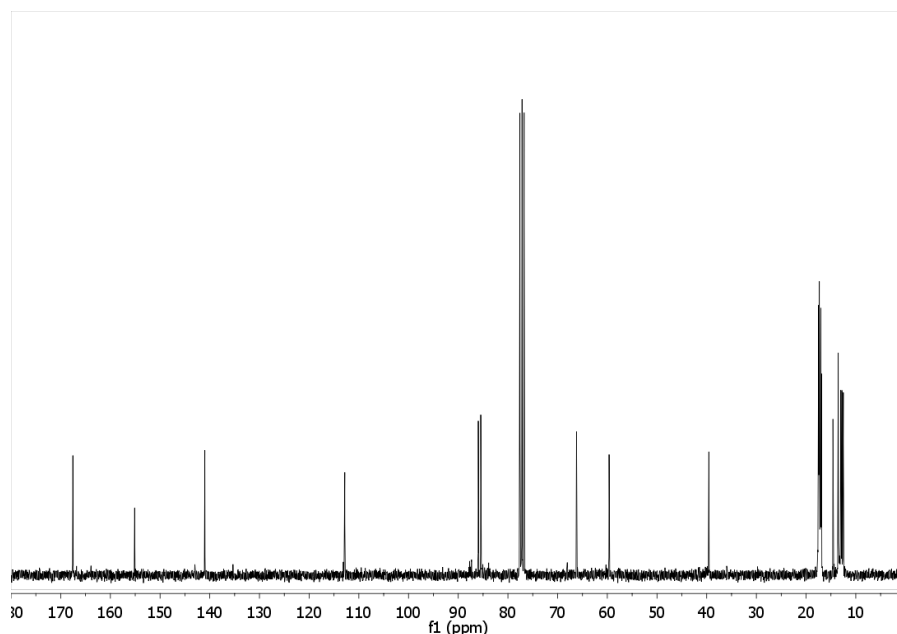
El compuesto **3** (2.8 mmol, 1.49 g) se disolvió en dioxano anhidro (40 mL) bajo una corriente de  $N_2$ . La disolución se enfrió en un baño de hielo hasta que el dioxano comenzó a solidificarse. Después de quitar el baño, y una vez la disolución se volvió clara, se añadieron dos equivalentes de hidracina anhidra (6.25 mL) y se agitó durante 90 min a temperatura ambiente. Después su volumen se redujo a 10 mL. Este residuo se usó sin purificación previa para ser oxidado mediante el siguiente procedimiento: se disolvió en una mezcla de dioxano: agua: trietilamina 9:1:0.5 mL y se añadió  $Ag_2O$  (5.6 mmol, 1.29 g). Después se calentó a reflujo durante 4 h, la disolución se filtró 2 veces sobre celita y el volumen se redujo hasta 10 mL. Luego, se añadieron 50 mL de  $CH_2Cl_2$  y se lavó dos veces con una disolución acuosa que contenía un 10% KI, una con un 10%  $Na_2S_2O_3$  y agua. La fase orgánica

se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y evaporó. Después de una purificación mediante cromatografía de sílice se obtuvo **3** como un aceite amarillento. Rendimiento 61%.

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.45 (d,  $J= 3.3$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J= 3.3$  Hz, 1H), 6.01 (dd,  $J= 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 4.40-4.31 (m, 1H), 4.21 (d,  $J= 12.0$  Hz, 1H), 4.01 (dd,  $J= 12.0, 3.0$  Hz, 1H), 3.89-3.85 (m, 1H), 2.67-2.56 (m, 1H), 2.41-2.34 (m, 1H), 2.11 (br s, 3H), 1.12-0.82 (m, 28H).  **$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.6, 155.1, 140.7, 112.5, 85.8, 85.3, 66.1, 59.5, 39.4, 17.5, 17.4, 17.3, 17.3, 17.1, 17.0, 17.0, 16.9, 14.9, 13.5, 13.1, 12.8, 12.4. **HRMS ( $\text{M}+\text{H}^+$ )**: calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2$  469.2554, encontrada 469.2543.

#### Espectros $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ del compuesto **5**:



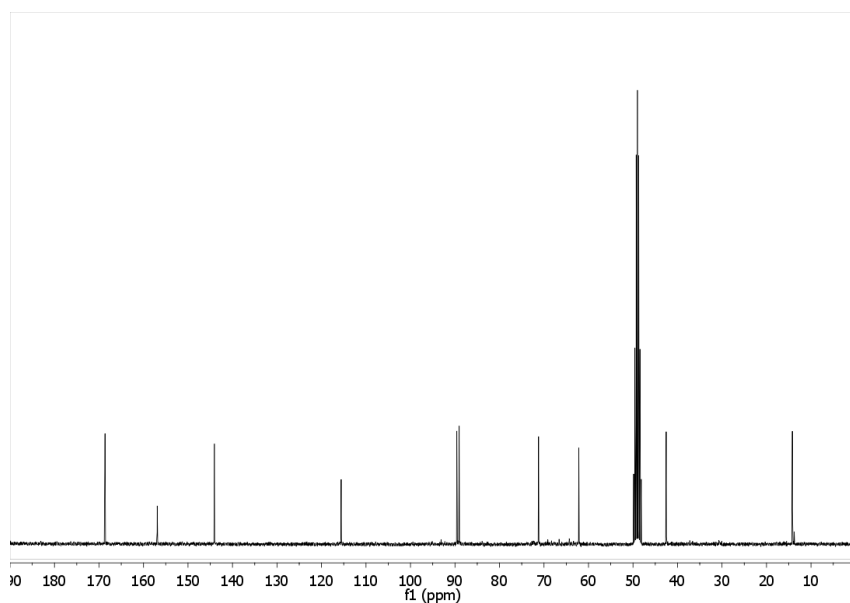
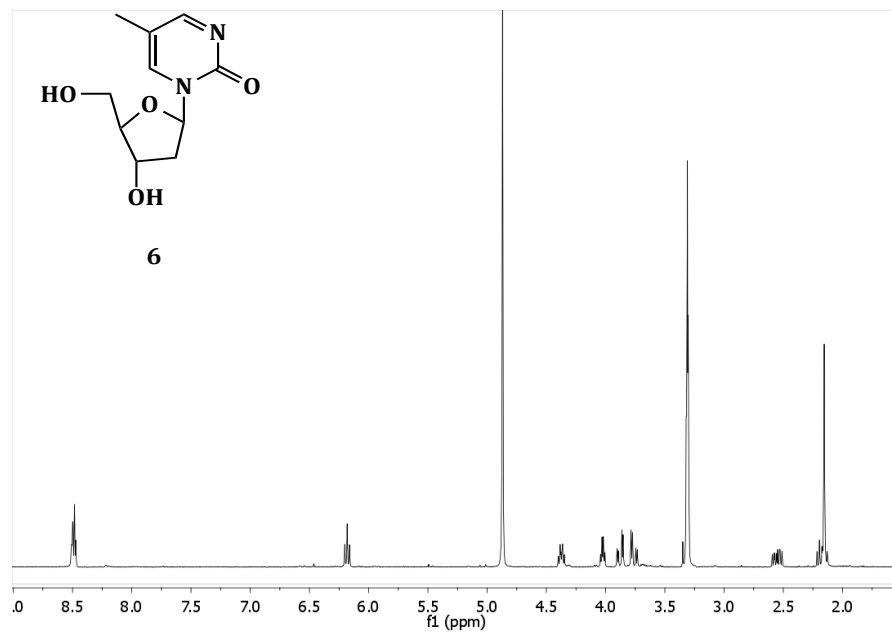


#### 6.5.10.6 Síntesis de 1-( $\beta$ -D-2'-desoxiribosil)-5-metil-2-pirimidona 6

A una disolución de **3** (117 mg, 0.2 mmol) en THF (6 mL) fueron añadidos 8 equivalentes de  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  (258 mg, 1.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se monitorizó por TLC hasta completarse. Luego, se diluyó con piridina-agua (1:4, 10 mL). El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice, usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y metanol (6%) como eluyentes. El producto se obtuvo como un sólido blanco (cuantitativo).

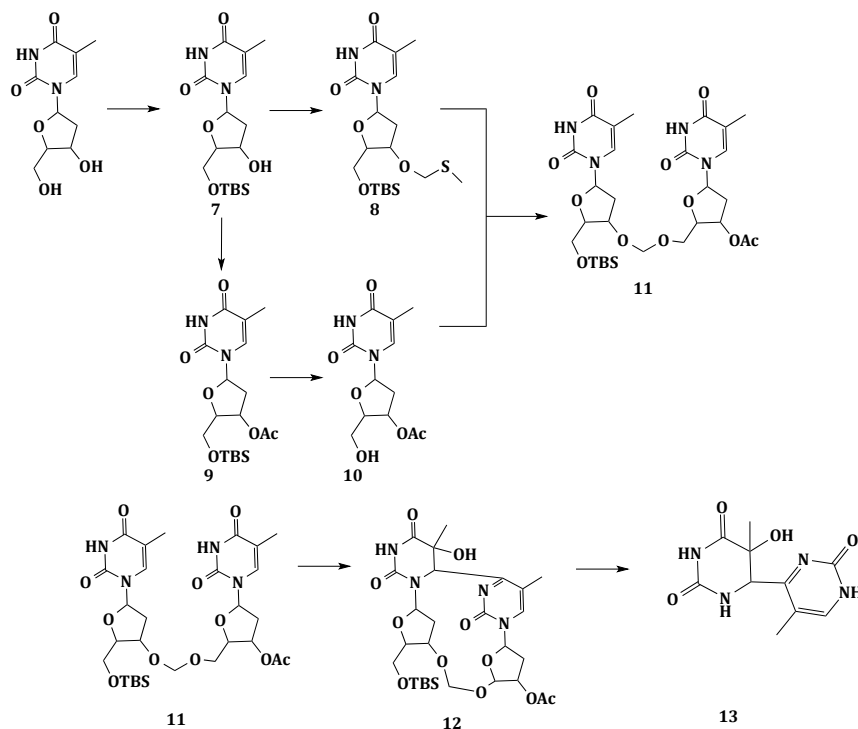
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.51 (m, 3H), 6.16 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.04-4.01 (m, 1H), 4.01 (dd,  $J = 12.0, 3.0$  Hz, 1H), 3.77 (dd,  $J = 12.0, 3.0$  Hz, 1H), 2.60-2.50 (m, 1H), 2.22-2.12 (m, 1H), 2.13 (s, 3H).  $^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  168.7, 156.9, 144.1, 115.6, 89.6, 89.1, 71.2, 62.2, 42.6, 14.2. **HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$  227.1032, encontrada 227.1032. La caracterización de P<sub>yo</sub> concuerda con los datos publicados previamente.<sup>26-27</sup>

### Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto 6





### 6.5.10.7 Esquema sintético de 6,4PP

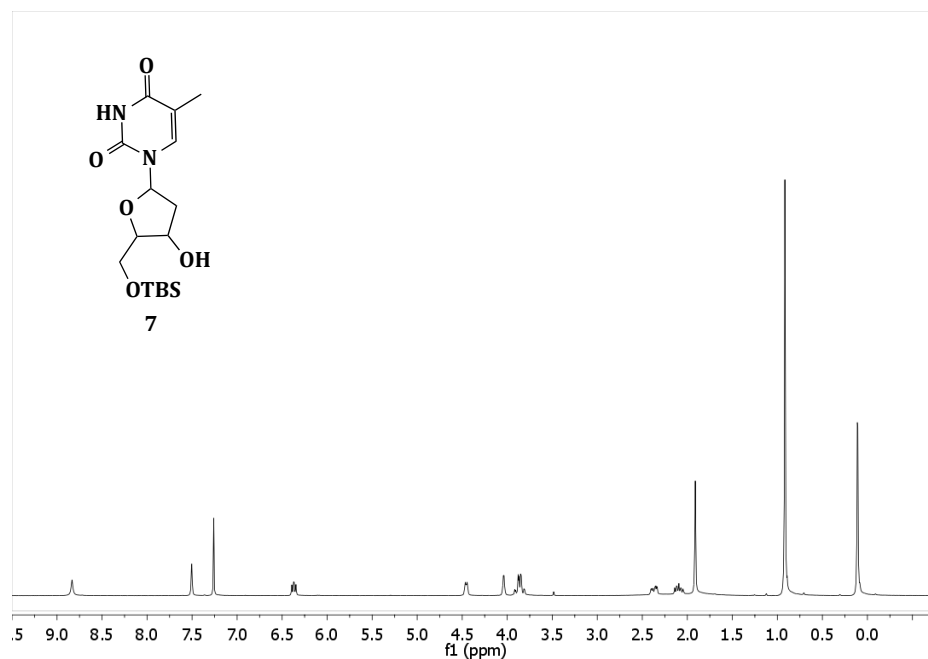


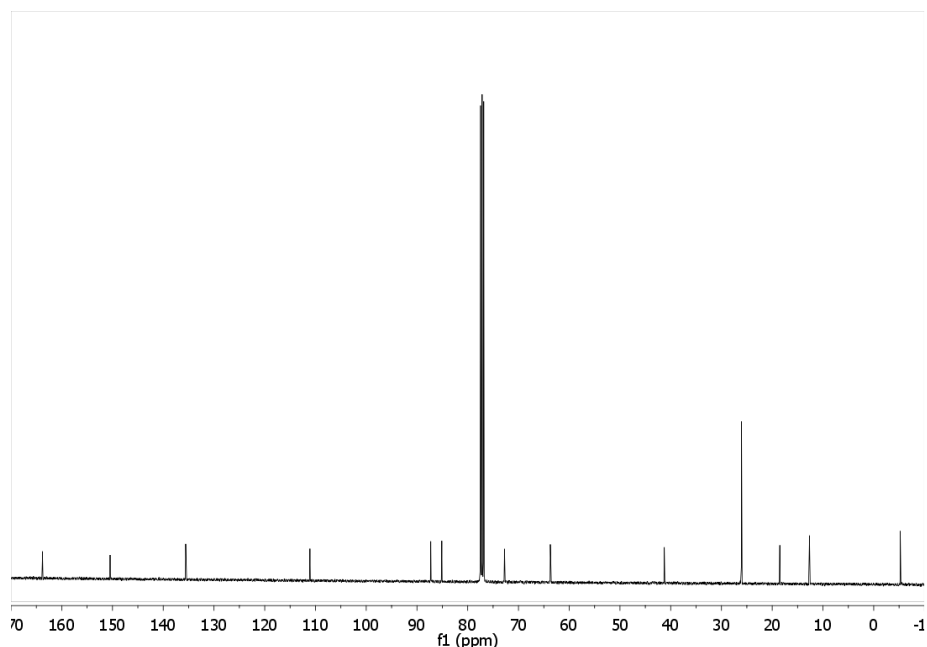
### 6.5.10.8 Síntesis de 5'-O-(*tert*-butildimetilsil)timidina 7

A una disolución de timidina (5.0 g, 20.8 mmol) en DMF (40 mL) a 0°C se añadieron imidazol (2.1 g, 31.0 mmol) y *tert*-butildimetilclorosilano (TBDMSCl, 3.7 g, 24.8 mmol). La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 24 h. Se añadió agua (200 mL) y éter (170 mL). La fase acuosa separada se extrajo con éter (3 x 170 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl (15 mL) y se secaron con MgSO<sub>4</sub>. Tras filtrar y concentrar a vacío, el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía de sílice usando Hexano: AcOEt: MeOH 1:1:0.1 como disolvente. El compuesto 7 fue obtenido como un polvo blanco. Rendimiento 90 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.11 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 1.91 (s, 3H), 2.13-2.04 (m, 1H), 2.40-2.33 (m, 1H), 3.91-3.80 (m, 2H), 4.04-4.03 (m, 1H), 4.45 – 4.44 (m, 1H), 6.37 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.83 (s, 1H). **<sup>13</sup>C RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.8, 150.5, 135.7, 111.1, 87.3, 85.1, 72.8, 63.7, 41.2, 26.1, 18.5, 12.7, -5.2 y -5.3. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: calculada para C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>NaSi 379.1676 encontrada 379.1665.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 7





#### 6.5.10.9 Síntesis de 3'-O-metiltiometil-5'-O-(tert-butildimetilsilil)timidina **8**

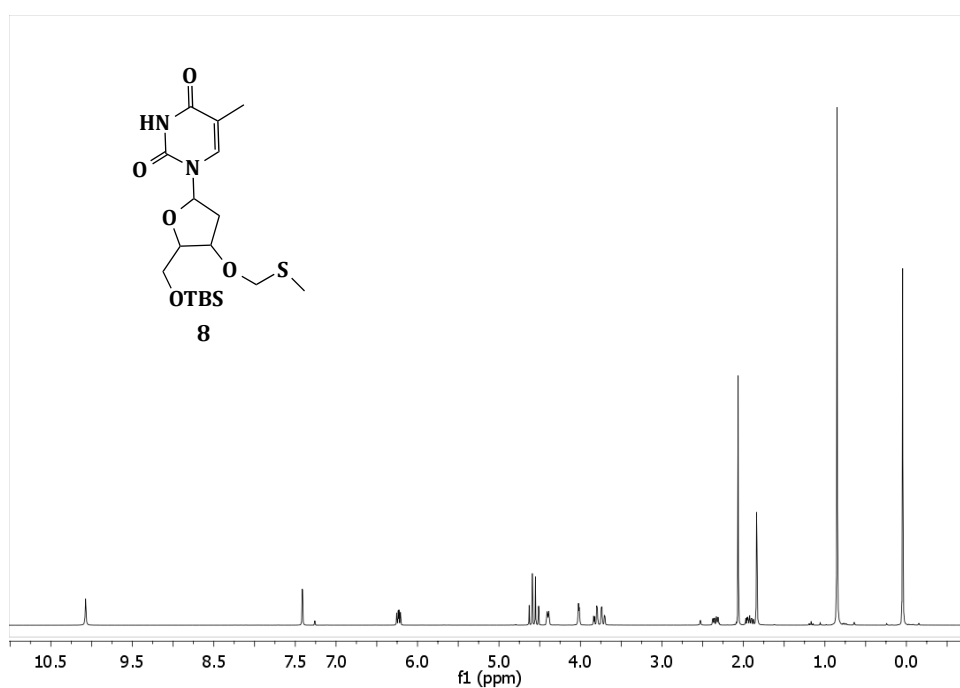
A una disolución del compuesto **7** (2.20 g, 6.25 mmol) en DMSO (13 mL), se añadieron anhídrido acético (9.4 mL) y ácido acético (3 mL). La disolución se mantuvo en agitación durante 72 h. Luego, se añadió una disolución fría de NaHCO<sub>3</sub> saturada (100 mL) y la mezcla se agitó durante 1h. La disolución acuosa se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 100 mL) y las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (3 x 100 mL) y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo obtenido se purificó con cromatografía de sílice usando la mezcla AcOEt:Hexano 1:1 como disolvente. El compuesto **8** fue obtenido como un aceite amarillo. Rendimiento 75 %

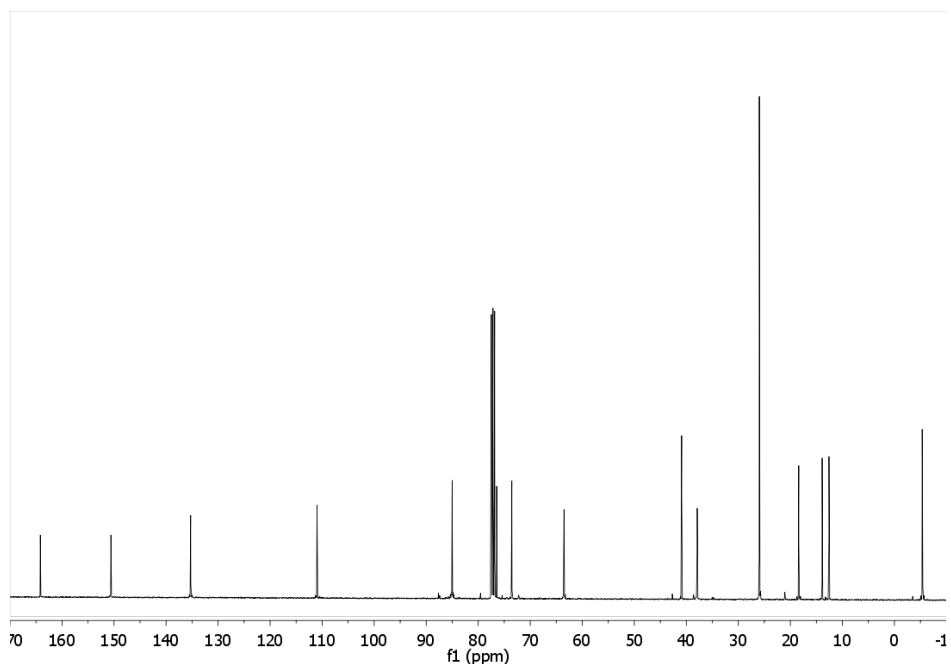
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.05 (s, 6H). 0.85 (s, 9H), 1.84 (s, 3H), 1.97 – 1.88 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.38 – 2.29 (m, 1H), 3.77 (ddd, J = 3,12,15 Hz, 2H), 4.03-4.01 (m, 1H), 4.41- 4.38(m, 1H), 4.57 (dd, J =12, 24 Hz, 2H), 6.26-6.21 (m, 1H), 7.41 (d, J =

Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2-pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Troya

1.2 Hz, 1H), 10.07 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.2, 150.6, 135.3, 111.0, 85.0, 85.0, 76.5, 73.5, 63.5, 40.9, 37.9, 26.0, 18.4, 13.9, 12.6, -5.3 y -5.4. HRMS ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaSiS}$  439.1697 encontrada 439.1699.

### Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del compuesto 8





#### 6.5.10.10 Síntesis de 3'-O-acetil-5'-O-(tert-butildimetilsilil)timidina **9**

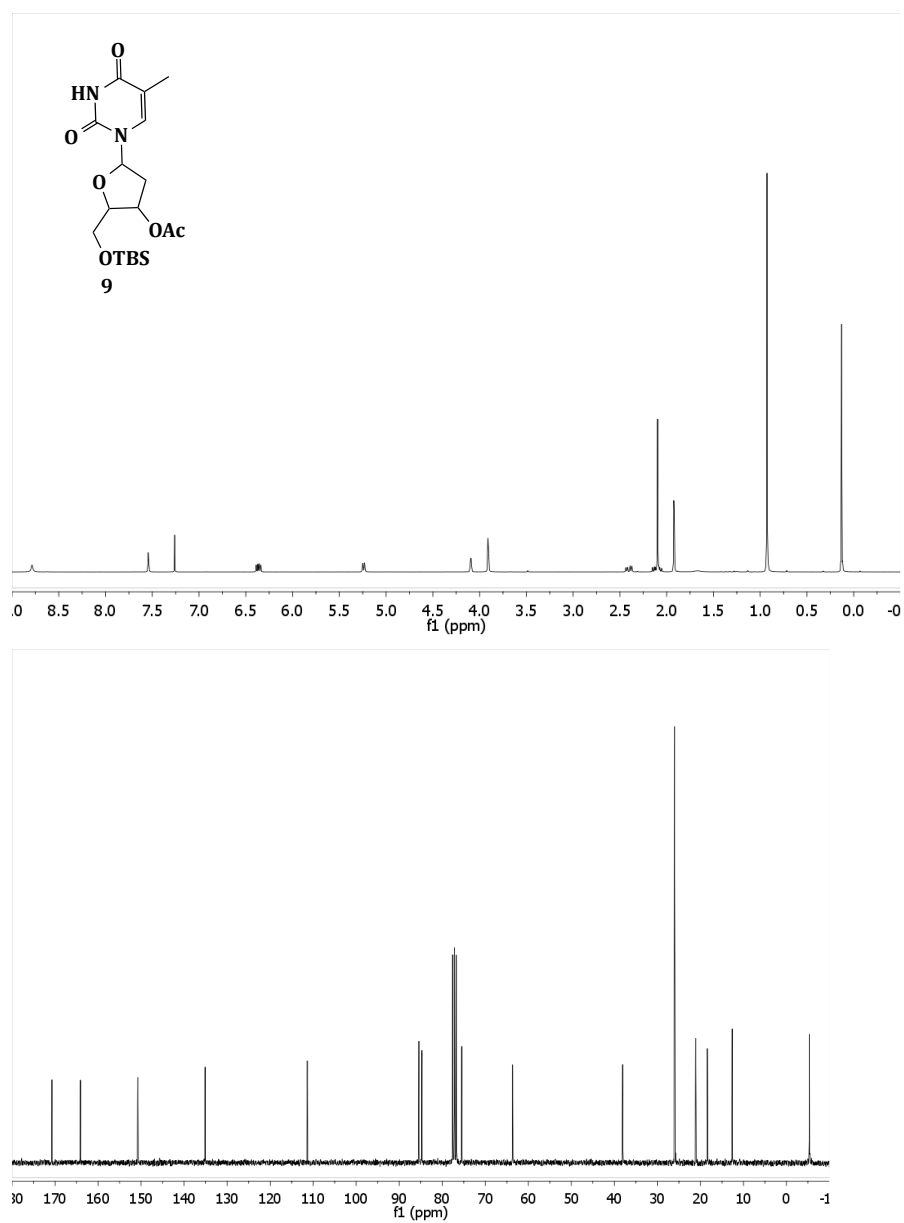
A una disolución del compuesto **8** (4.00 g, 11.1 mmol) en piridina (50 mL) se añadió anhídrido acético (2.20 mL, 22.2 mmol). La disolución se mantuvo en agitación durante 18 h. Luego, se paró añadiendo MeOH (5 mL), el residuo se concentró a vacío y se purificó mediante cromatografía de sílice usando AcOEt:Hexano 1:1 como disolvente. El compuesto **9** se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento 95 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.13 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 1.92 (s, 3H), 2.15 – 2.05 (m+s, 4H), 2.44-2.37 (m, 1H), 3.90 (d, J = 3Hz, 2H), 4.07-4.10 (m, 1H), 5.24 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.36 (dd, J = 6, 9 Hz, 1H), 7.54 (m, 1H), 8.79 (s, 1H). **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.6, 164.0, 150.4, 135.4, 111.5, 85.4, 84.8, 77.2, 75.5, 63.7, 38.1, 26.1,

Capítulo 6: Fotosensibilización del ADN por el cromóforo 5-metil-2-pirimidona. El fotoproducto (6,4) como posible caballo de Troya

21.1, 18.3, 12.6, -5.3, -5.4. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: calculada para C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaSi 421.1777 encontrada 421.1771.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 9

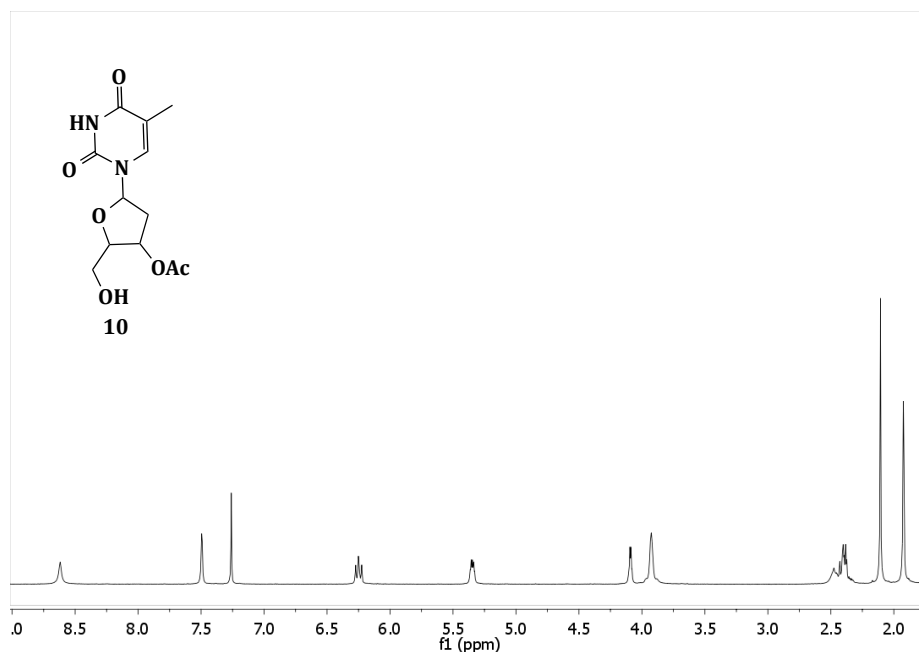


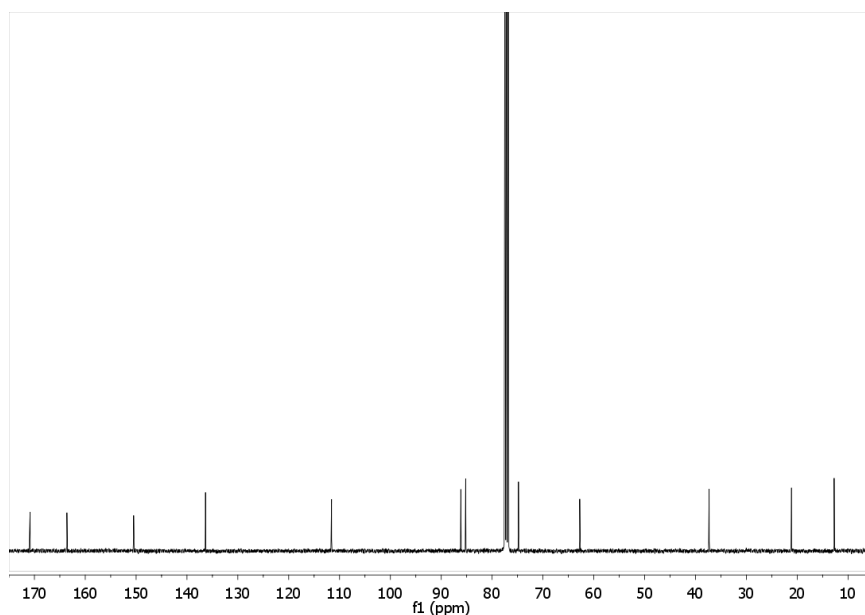
#### 6.5.10.11 Síntesis de 3'-O-acetil-timidina **10**

A una disolución de **9** (7.54 g, 18.94 mmol) en THF anhidro (40 mL) se añadieron ácido acético (0.7 mL) y fluoruro de *tert*-butilamonio (24.7 mL, 24.7 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Tras concentrar el disolvente a vacío, el residuo se purificó con cromatografía de sílice utilizando la mezcla Hexano:AcOEt:MeOH 1:1:0.1 para obtener **10** como sólido blanco. Rendimiento 90 %.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.92 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.43-2.37 (m, 2H), 3.93 (s, 2H), 4.11-4.08 (m, 1H), 5.36-5.33 (m, 1H), 6.27-6.22 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.62 (s, 1H). **<sup>13</sup>C RMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.8, 163.6, 150.6, 136.4, 111.6, 86.0, 85.0, 74.8, 63.1, 37.7, 21.2 y 12.9. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: calculada para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> Na 207.0904 encontrada 207.0906.

#### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **10**





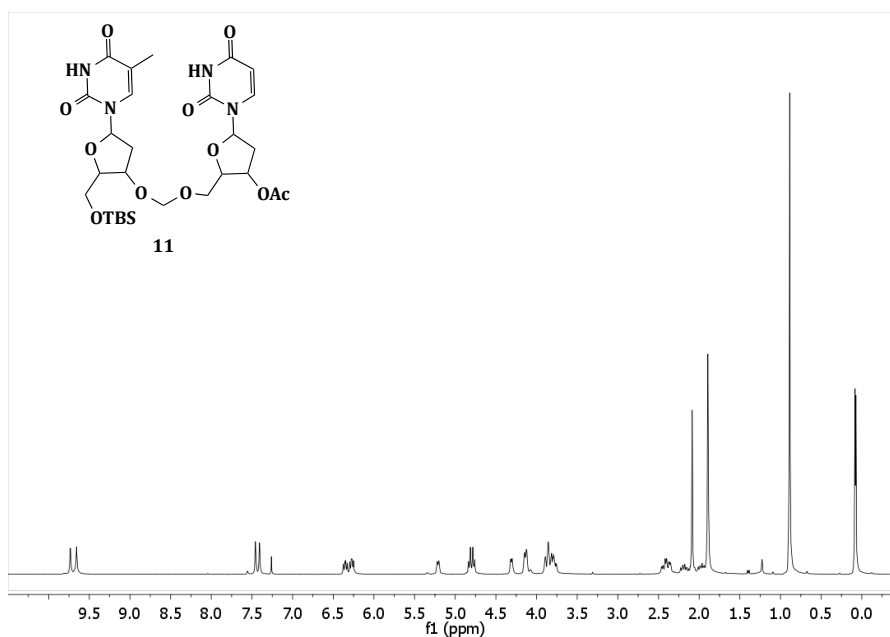
#### 6.5.10.12 Síntesis del dímero 5'A-O- (tert-butildimetilsilil)-3'B-acetil- unión formacetal, timidina **11**

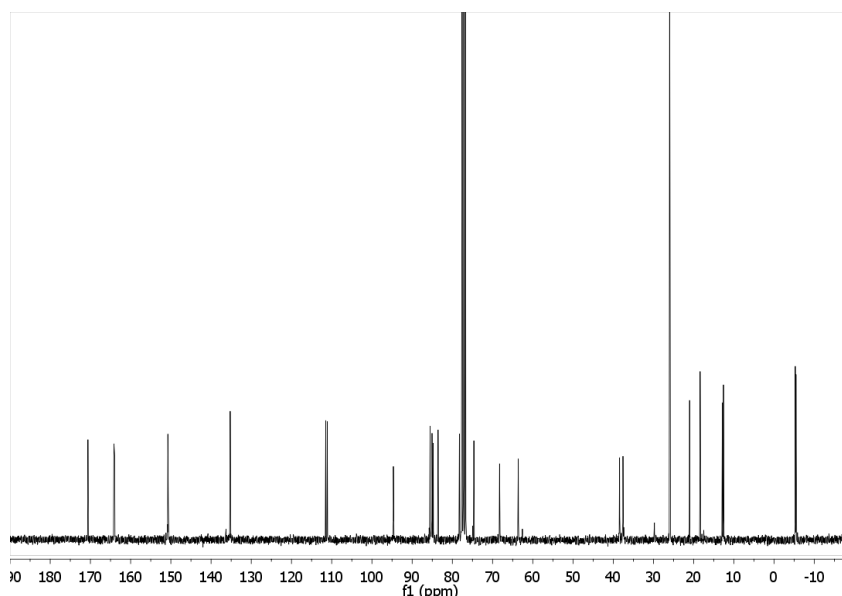
Los compuestos **8** (1.37 g, 3.42 mmol) y **10** (0.75 g, 2.63 mmol) se disolvieron en THF anhidro (3 x 28 mL). El disolvente se evaporó a sequedad para eliminar las trazas de agua. El aceite obtenido se disolvió en THF anhidro (28 mL) y se agitó durante 1 h con tamiz molecular (4 A, 0.14 g) a 0° C bajo N<sub>2</sub>. Luego se añadió una disolución de N-yodosuccinimida (0.78 g, 3.45 mmol) y ácido trifluorometanosulfónico (0.05 mL) en THF anhidro (14 mL). La mezcla se agitó durante 5 min a temperatura ambiente y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL). La disolución se filtró, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL) y se lavó una vez con una disolución 1 M de tiosulfato (20 mL), una con NaHCO<sub>3</sub> y finalmente con agua (20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de sílice usando Hexano:AcOEt:MeOH 1:1:0.1 como disolvente para obtener el compuesto **11** como un aceite amarillo. Rendimiento 55 %.



**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.08 (d, J = 3 Hz, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.89 (s, 6H), 2.01-1.94 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.23-2.13 (m, 1H), 2.46-2.35 (m, 2H), 3.89 – 3.75 (m, 4H), 4.15 (m, 2H), 4.31 (d, J = 6 Hz, 1H), 4.80 (dd, J = 9, 18 Hz, 2H), 5.20-5.22 (m, 1H), 6.30-6.25 (m, 1H), 6.38-6.32 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.73 (s, 1H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.6, 164.0, 150.7, 135.3, 111.5, 111.1, 94.7, 85.5, 85.1, 84.8, 83.5, 78.2, 74.6, 68.3, 63.6, 38.4, 37.6, 26.0, 21.0, 18.4, 12.9, 12.6, -5.3 y 5.4. **HRMS (M+Na<sup>+</sup>)**: calculada para C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>NaS 675.2679 encontrada 675.2674.

### Espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 11





#### 6.5.10.14 Síntesis del compuesto **13**

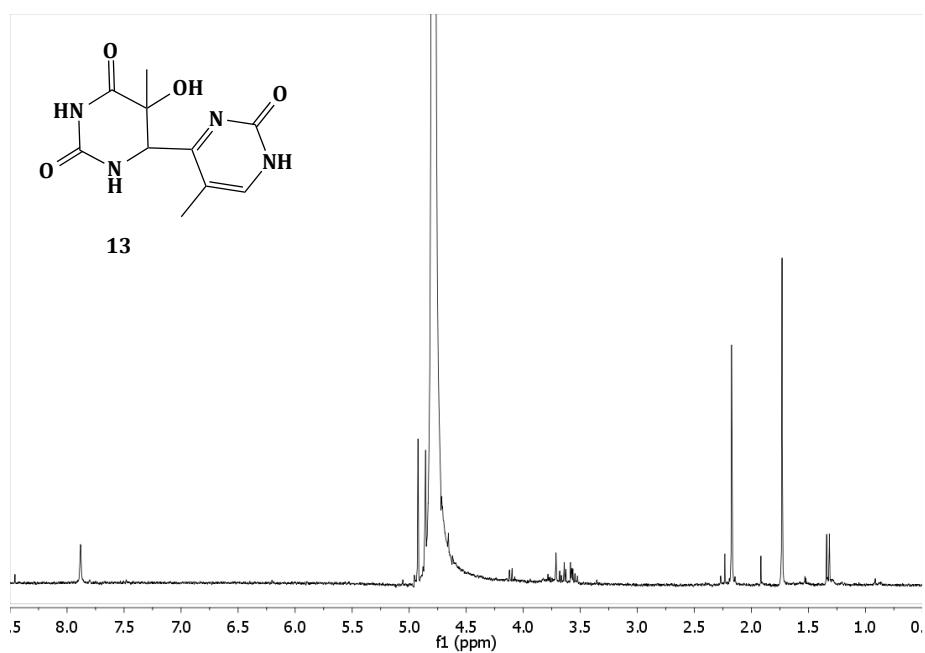
6,4PP fue sintetizado según procedimientos anteriores descritos.<sup>9</sup> El compuesto **11** (150 mg, 0.3 mmol) se disolvió en un mezcla ACN:H<sub>2</sub>O (280 ml, 77 % de H<sub>2</sub>O) y se dispuso en un balón de cuarzo con purga continua de N<sub>2</sub>. Luego se irradió durante 5 h en un fotorreactor (Rayonet) con lámparas de  $\lambda_{\text{máx}} = 254$  nm. Tras la irradiación el disolvente se evaporó y el crudo se disolvió nuevamente con metanol. El compuesto **12** se obtuvo mediante purificación con HPLC usando una columna mediterránea C18. El gradiente de elución consistió inicialmente en agua que contiene un 20% de ACN que tras 16 minutos pasó a ser del 30%. El flujo fue de 2 mL/min. (rendimiento 7%). El compuesto deseado, con un tiempo de retención de 16.5 min fue recolectado, concentrado e hidrolizado con HF/piridina mediante el siguiente procedimiento: Al compuesto **12** (0.01 g, 0.018 mmol), se añadió HF/piridina (10.1 mL). La disolución fue calentada a 37 °C durante 3h. Luego

la neutralización fue realizada añadiendo 50 mL de H<sub>2</sub>O y 30 g de CaCO<sub>3</sub> y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La disolución fue filtrada y el disolvente evaporado a vacío. El crudo de reacción fue purificado por segunda vez mediante HPLC (columna mediterránea) utilizando H<sub>2</sub>O como eluyente. El compuesto 6,4 PP fue obtenido con un rendimiento del 16%.

**<sup>1</sup>H RMN** (300 Hz, D<sub>2</sub>O): δ 7.88 (s, 1H), 4.92 (s, 1H), 2.77 (s, 3H), 1.73 (s, 3H).

**HRMS (M+H<sup>+</sup>)**: calculada para C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 253.0935 , encontrada 253.0937.

### Espectro <sup>1</sup>H del compuesto 13



## 6.6 Referencias

1. *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II. DNA fragments and phenomenological aspects. Physiological Aspects of UV-Excitation of DNA.* Ed. Springer, Richa; Rajeswar. P. S.; Häder, D -P; **2015**.
2. Byrne, S.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2014**, *13*, 840.
3. Mitchell, D. L.; Nairn, R. S.; *Photochem. Photobiol.*; **1989**, *49*, 805.
4. You, Y.-H.; Lee, D.-H.; Yoon, J.-H.; Nakajima, S.; Yasui, A.; Pfeifer, G. P.; *J. Biol. Chem.*; **2001**, *276*, 44688.
5. Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *Chem. Sci.*; **2011**, *2*, 1219.
6. Cadet, J.; Mouret, S.; Ravanat, J.-L.; Douki, T.; *Photochem. Photobiol.*; **2012**, *88*, 1048.
7. Cuquerella, M.C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cadet J.; Miranda, M.A.; *Acc. Chem. Res.*; **2012**, *45*, 1558.
8. Pfeifer, G. P.; Besaratinia, A.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **2012**, *11*, 90.
9. Douki, T.; Voituriez, L.; Cadet, J.; *Chem. Res. Toxicol.*; **1995**, *8*, 244.
10. Vendrell-Criado, V.; Rodríguez-Muñiz, G. M.; Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; *Ang. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6476.
11. Blais, J.; Douki, T.; Vigny, P.; Cadet, J., *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 402.
12. Fingerhut, B. P.; Herzog, T. T.; Ryseck, G.; Haiser, K.; Graupner, F. F.; Heil, K.; Gilch, P.; Schreiner, W. J.; Carell, T.; de Vivie-Riedle, R.; Zinth, W.; *New J Phys.*; **2012**, *14*, 1.
13. Rodríguez-Muñiz, G. M.; Marin, M. L.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; *Chem. Eur. J.*; **2012**, *18*, 8024.

14. *Handbook of photochemistry. Third edition*, Editorial Tailor & Francis, Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; **2006**.
15. Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2006**, *128*, 6318.
16. Douki, T.; Court, M.; Cadet, J.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; **2000**, *54*, 145.
17. Lion, Y.; Delmelle, M.; Van de Vorst, A.; *Nature*; **1976**; *263*, 442.
18. Motten, A. G.; Buettner, G. R.; Chignell, C. F.; *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 9.
19. Samuni, A.; Goldstein, S.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C.; Neta, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8719.
20. Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Bosca, F.; Miranda, M. A.; *J. Phys. Chem. B.*; **2007**, *111*; 7409.
21. *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology; Ed. CRC 2nd edition, Horspool*; Chapter 140. Mitchell, D. L., **2004**.
22. Butenandt, P.; Ekre M. A.; Carell, T.; *Chem. Eur. J.*; **1998**, *4*, 642.
23. Kundu, L. M.; Burgdorft, L.T.; Kleiner, O.; Batschauer, A.; Carell, T.; *ChemBioChem.*; **2002**, *3*, 1053.
24. Nardi, G.; Lhiaubet-Vallet, V.; Leandro-Garcia, P.; Miranda, M. A., *Chem. Res. Toxicol.*; **2011**, *24*, 1779.
25. Carmichael, I.; Hug, G. L.; *J. Phys. Ref. Data.*; **1986**, *15*, 1.
26. Whightman, R.; Holy, A.; *Collect. Czech. Chem. Commun.*; **1973**, *38*, 1381.

27. Gildea, B.; McLaughlin, L. W.; *Nucleic Acids Res.*; **1989**, *17*, 2261.

## 6.7 Anexo

A continuación se presentan las figuras que no aparecen en el apartado de resultados.

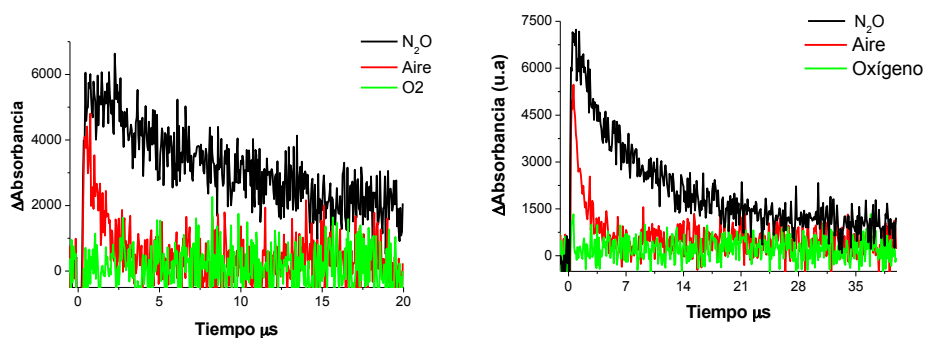


Fig. 6.20: Señal de láser registrada a 420 nm en atmósfera de N<sub>2</sub>O, aire y O<sub>2</sub> de: izquierda) Pyo, derecha) 6,4PP.

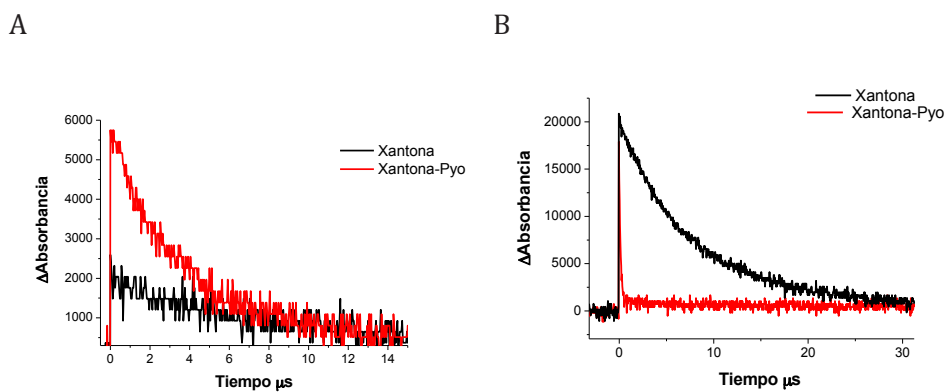


Fig. 6.21: A) Trazas cinéticas registradas tras excitar con el láser ( $\lambda_{exc} = 355$  nm) xantona en ausencia y presencia de Pyo A) a 420 nm y B) 610 nm.

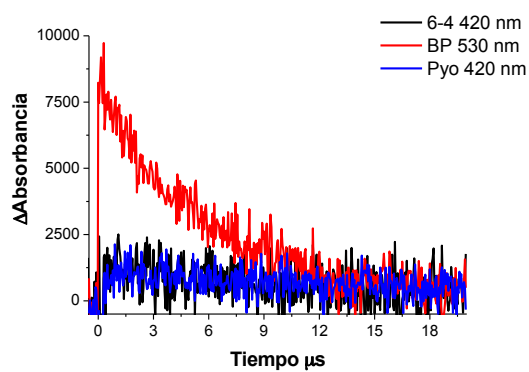


Fig. 6.22: Experimento láser para calcular el  $\phi_T$  de Pyo y 6,4 comparándolo con BP ( $\lambda_{exc} = 266$  nm).

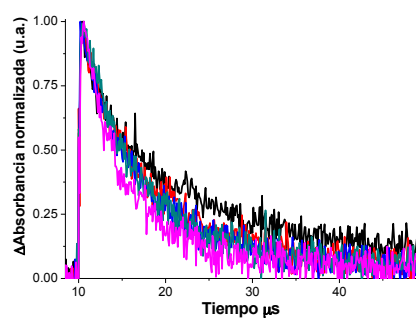


Fig. 6.23: Señales registradas a 420 nm de Pyo con distintas cantidades de timidina (1.3 mM- 7.9 mM)







## **Capítulo 7: Instrumentación**



## 7.1 Medidas espectroscópicas

### 7.1.1 Medidas de absorción

Los espectros de absorción ultravioleta-visible se realizaron con dos espectrómetros de haz simple o doble (Varian UV-Vis modelo Cary 300 Scans).

### 7.1.2 Medidas de emisión

**Fluorescencia:** Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) modelo LPS-220B equipado con una lámpara de xenón de 75 W y un monocromador en un rango de 200-700 nm. Las medidas se registraron después de un ajuste de absorbancia de aproximadamente 0.1 a la longitud de onda de excitación.

**Fosforescencia:** Los espectros de fosforescencia se registraron con un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM/2003) equipado con una lámpara pulsada de xenón. El equipo operó en el modo de tiempo resuelto con un tiempo de retraso de 0.5 ms. Los compuestos se disolvieron en etanol, se dispusieron en tubos de cuarzo (diámetro 0.5 mm) y se enfriaron a 77 K.

## 7.2 Fotólisis de destello láser

Para las medidas se utilizaron tres láseres diferentes. En todos los experimentos se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico .

- **Láser pulsado excímero Xe/HCl** (LEXTRA 50 Lambda Physic Laser Technik):  $\lambda_{\text{exc}} = 308$  nm. El pulso láser fue de 10 ns. El equipo láser consiste en un láser pulsado, una lámpara de xenón (Lo 255 Oriel), un monocromador (modelo Oriel 77200), un sistema fotomultiplicador (Oriel, modelo 70705) y un osciloscopio (TDS-640A Tektronic) la señal de salida del osciloscopio se transfiere a un ordenador personal.
- **Láser pulsado**(Nd:YAG L52137V LOTIS TII).  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm. El diámetro del haz fue de 0.6 cm con una duración de pulso de 10 ns. El aparato consiste en un láser pulsado, un monocromador y un fotomultiplicador. La señal de salida del oscilador se transfiere a un ordenador personal.
- **Láser pulsado** (Nd:YAG).  $\lambda_{\text{exc}} = 266$  nm. La duración del pulso láser fue de 10 ns con una energía de 19 mJ/pulso. El sistema consiste en un láser pulsado, lámpara de xenón, un monocromador Oriel 77200 y un osciloscopio. Las señales del osciloscopio se transfirieron a un ordenador personal.

## 7.3 Experimentos *spin trap* mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Con el fin de registrar las señales EPR, las muestras se disolvieron en agua y se introdujeron en una celda plana (volumen 150  $\mu\text{l}$ , 60 mm de largo). El espectrómetro usado fue el EPR Bruker EMX 10/12 usando los siguientes parámetros: potencia microonda de 20 mW, amplitud de modulación de 1.0 G y una frecuencia de modulación de 100 kHz.

#### 7.4 Análisis UPLC MS/MS

El equipo utilizado fue un UPLC ACQUITY UPLC (Waters Corp) con un sistema de pinchazo de muestras automático y acondicionado a 10 °C. La columna utilizada para el análisis fue una ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm). La temperatura se mantuvo a 40 °C. El espectrómetro Waters ACQUITY™ XevoQToF se conectó a una sistema UPLC vía una interfaz de ionización de electrospray (ESI). La fuente ESI operó de modo ionización positiva con un voltaje capilar de 1.5 kV. La temperatura de la fuente y el sistema de desolvatación se mantuvo a 110 °C y 300 °C, respectivamente. Los flujos del cono y el gas de colisión fueron de 0.2 ml/min. Los datos obtenidos se adquirieron usando el software Masslynx™ (WatCrs corp.). Leucina encefalina se usó como patrón, generando un ión [M+H<sup>+</sup>] (m/z 556.2771) a la concentración de 500 pg/ml y un flujo de 50 µl/min.

#### 7.5 Análisis HPLC

El equipo utilizado para el análisis y separación de las muestras por HPLC consistió en una bomba Varian 9012Q, un inyector Rheodyne y un espectrómetro policromático Varian 9065.





## **Capítulo 8: Conclusiones generales**



La formación de dímeros pirimidínicos en el estado excitado triplete, en concreto ciclobutanos frente a fotoproductos (6,4), se ha investigado a través de los distintos capítulos experimentales de que consta la presente tesis doctoral. De ellos, se extraen las siguientes conclusiones:

- 1) Las propiedades fotofísicas de 2-tiotimina se modulan en función de la sustitución en C5 por un hidrógeno, 2-tiouracilo, o un grupo *tert*butilo, 5-*tert*-butil-2 tiouracilo. Mientras que 2-tiotimina presenta una energía de triplete más baja de la serie, el 2-tiouracilo presenta el tiempo de vida más corto. Los cálculos teóricos al nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM coinciden con los datos experimentales obtenidos de los estados excitados, respaldando la naturaleza  $\pi\pi^*$  de los estados excitados tripletes más bajos.
- 2) Se observan diferencias en la fotoquímica de timina al sustituir el metilo en C5 por un grupo más voluminoso, el *tert*-butilo, durante procesos fotosensibilizados mediante acetona, benzofenona y xantona. En general los procesos son más lentos en presencia del grupo voluminoso, destacando la ausencia de dímeros ciclobutánicos. Los resultados obtenidos en el caso de la benzofenona no muestran diferencias significativas en la regioquímica de los oxetanos en función de la sustitución en C5
- 3) Es posible una fotoquímica diferenciada desde los estados excitados superiores de timina (de carácter  $n\pi^*$ ). Un ejemplo es la reacción de Norrish-Yang tras la fotosensibilización del  $T_2$  de la unidad 5-*tert*butiluracilo mediante un proceso de transferencia de energía de triplete desde el  $T_n$  del cromóforo benzofenona. Los resultados obtenidos confirman la naturaleza bifotónica del proceso.
- 4) La molécula 1- $\beta$ -D (2' deoxiribosil) 5- metil 2- pirimidona, modelo de la lesión 6-4 PP, actúa como agente fotosensibilizador del ADN a través de su estado excitado triplete. También lo hace el propio daño 6,4 PP que puede inducir lesiones en la biomacromolécula, actuando como caballo de Troya y extendiendo la fracción activa de la luz hacia la región UVA.



# **Resúmenes**



## RESUMEN

La radiación ultravioleta está asociada a la formación de ciertas lesiones en el ADN que están en el origen del cáncer piel. Entre las más relevantes se encuentran los daños que se producen en las bases pirimidínicas: dímeros ciclobutánicos (DCBs) y los fotoproductos (6-4) (6-4 PPs). Por ello se han realizado numerosos estudios para entender la fotoquímica implicada en su formación. Sin embargo, a pesar del extenso conocimiento mecanístico alcanzado, aún quedan algunos aspectos que necesitan ser clarificados. El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido esclarecer algunos de los mecanismos de la fotorreacción del ADN, con especial atención a la formación de lesiones bipyrimidínicas

En primer lugar se estableció la influencia de la sustitución en C5 sobre las propiedades fotofísicas de 2-tiopirimidinas a través de estudios experimentales y cálculos teóricos. Para ello se escogieron 2-tiouracilo (TU), 2-tiotimina (TT) y 5-*tert*-butiluracilo (BTU). Los espectros de UV registrados fueron similares para los tres compuestos, presentando un máximo sobre 275 nm y un hombro sobre 290 nm. Las tres 2-tiopirimidinas exhibieron también una intensa de fosforescencia, de 0.7, de cuyos espectros se determinaron las energías de sus estados excitados tripletes: 307, 304 y 294 kJ/mol para TU, BTU y TT, respectivamente. Los espectros de absorción transitoria obtenidos tras excitación láser ( $\lambda_{exc} = 308$  nm) presentaron una banda desde 500 nm a 700 nm, que se asignó a la absorción triplete-triplete mediante un proceso de transferencia de energía usando bifenilo como aceptor. Los tiempos de vida de triplete fueron de 70 ns, 1.1  $\mu$ s y 2.3  $\mu$ s para TU, BTU y TT, respectivamente. A pesar de la similitud estructural de los compuestos, los datos fotofísicos determinados por fosforescencia y fotólisis de destello láser fueron dispares para los tres compuestos, por ello se realizaron cálculos teóricos B3LYP/aug-cc-pVDC/PCM. Los resultados obtenidos concordaron con los experimentales, respaldando la naturaleza  $\pi\pi^*$  de los estados triplete excitados más bajos.

En segundo lugar, se analizó la influencia del impedimento estérico en posición C5 sobre la formación de lesiones bipyrimidínicas. Para ello se com-

paró la reactividad del 5-*tert*-butiluracilacetato de metilo (**1c**) con la de su análogo de timina (**2c**) tras fotosensibilizar con benzofenona, acetona y xantona. En general **1c** reaccionó más lentamente que **2c**. La reacción con benzofenona (BP) dio lugar exclusivamente a oxetanos. En el caso de usar acetona como sensibilizador se obtuvieron dímeros mixtos uracilo-5-*tert*-butiluracilo (**1e-1** y **1e-2**), el derivado acetono (**1e-3**) y un fotoproducto fruto de la deshidrogenación (**1e-4**). En el caso de la xantona solo se observó la formación de un único oxetano (**1f**). Sin embargo, las irradiaciones paralelas llevadas a cabo con **2c**, condujeron a la formación de dímeros ciclobutánicos en todos los casos. Los resultados obtenidos indican que la presencia de un grupo voluminoso en C5 impide la formación de dímeros ciclobutánicos.

A continuación se exploró la fotoquímica de la timina desde su estado excitado triplete superior  $n\pi^*$  a través de la fotorreacción de Norrish-Yang. La estrategia a seguir consistió en poblar dicho estado por transferencia de energía desde un estado excitado triplete superior de un fotosensibilizador adecuado. Para ello se diseñó una diada formada por el compuesto 5-*tert*-butiluracilo enlazado mediante una amida alifática al cromóforo benzofenona (BP). Se eligió la BP como fotosensibilizador debido a que presenta un  $T_n$  con una energía y un tiempo de vida ( $\sim 400$  kJ/mol y 37 ps, respectivamente) adecuados para poder participar en el proceso. Así, se llevó a cabo la excitación multifónica de la diada con un haz de láser a una potencia elevada (láser de Nd:YAG, 355 nm, 40 mJ/pulso) y posteriormente la mezcla de reacción se analizó mediante UPLC-MS/MS. Los resultados evidenciaron la formación de la pirimidona esperada tras tener lugar la reacción de Norrish-Yang con un rendimiento químico del 0.003 %, en concordancia con el resto de procesos que ocurren desde estados excitados superiores.

Finalmente, la demostración de que el proceso analizado es de naturaleza bifotónica se consiguió tras seguir el rendimiento de la reacción en función de la potencia de láser usada.

El último capítulo de la tesis aborda la posibilidad de que el fotoproducto (6-4) una vez formado en el ADN, actúe a su vez como fotosensibilizador endógeno, debido a que esta lesión es capaz de absorber la luz en la región UVB-UVA debido a la presencia en su estructura de 5-metil-2-pirimidona (Pyo). Para ello



se sintetizó el desoxiribonucleósido y se irradió en presencia de ADN. El análisis de los daños fotoinducidos en la biomacromolécula al hacerla migrar a través de un gel de agarosa en presencia y ausencia de T4 endonucleasa V, permitió establecer que Pyo es un fotosensibilizador del ADN, y que aproximadamente el 20 % de los daños son dímeros ciclobutánicos. Además, los estudios fotofísicos llevados a cabo con Pyo confirmaron que puede participar tanto en procesos de transferencia de energía como en procesos oxidativos puesto que su triplete tiene una energía mayor que la de la timina aislada y en el ADN y además genera radicales hidroxilo y oxígeno singlete.

Seguidamente se pasó a considerar el potencial fotosensibilizador del propio daño 6-4 PP, puesto que las propiedades fotoquímicas de la molécula completa podrían diferir del cromóforo aislado. Su irradiación en presencia de ADN reveló que el daño actúa como fotosensibilizador de la misma forma que su cromóforo, a pesar de que sus propiedades fotofísicas no son del todo coincidentes. Así, el último capítulo de la presente tesis ha servido para establecer que el propio daño 6-4 PP puede actuar como caballo de Troya y extender la fracción activa de la radiación UV, provocando la formación de dímeros pirimidínicos y daños oxidativos, convirtiéndolo en un daño potencialmente más peligroso de lo estimado hasta la fecha.

## RESUM

La radiació ultraviolada (UV) està associada amb la formació de lesions en l'ADN que estan en l'origen del càncer de pell. D'entre les més rellevants es troben els danys que es produeixen en les bases pirimidíniques: dímers ciclo-butànics (DCBs) i fotoproductes (6-4) (6-4 PPs). Per això, s'han realitzat nombrosos estudis per entendre la fotoquímica implicada en la seua formació. No obstant, a pesar de l'extens coneixement mecanístic, encara queden alguns aspectes que necessiten ser clarificats. L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral va ser aclarir alguns dels mecanismes de la fotorreacció de l'ADN, amb especial atenció a la formació de lesions bipyrimidíniques

Primer es va establir la influència de la substitució en C5 sobre les propietats fotofísiques de 2-tiopirimidines a través d'estudis experimentals i càlculs teòrics. Per a dur-los a terme, es van triar 2-tiouracil (TU), 2-tiotimina (TT) i 2-*tert*-butiluracil (BTU). Els espectres UV registrats van ser similars per als tres compostos, presentant un màxim sobre 290 nm. Les tres 2-tiopirimidines exhibiren a més, una intensa fosforescència, de 0.7, a partir dels espectres de la qual es van determinar les energies dels seus estats excitats triplets: 307, 304 y 294 kJ/mol per TU, BTU i TT, respectivament. Els espectres d'absorció transitòria obtinguts per excitació làser ( $\lambda_{exc} = 308$  nm) presentaren una banda des de 500 nm a 700 nm, que es va assignar a la absorció triplet-triplet a partir d'un procés de transferència d'energia utilitzant bifenil com acceptor. Els temps de vida de triplet van ser 70 ns, 1.1  $\mu$ s i 2.3  $\mu$ s per a TU, BTU i TT, respectivament. A pesar de la similitud estructural dels compostos, les dades fotofísiques determinades per fosforescència i fotòlisis de flux làser van ser dispars per als tres compostos, per això es van realitzar càlculs teòrics B·LYP/aug-cc-pVDC/PCM. Els resultats obtinguts van concordar amb els experimentals, recolzant la natura  $\pi\pi^*$  dels estats triplet excitats més baixos.

En segon lloc, es va analitzar la influència de l'impediment estèric en posició C5 sobre la formació de lesions bipyrimidíniques. Així es va comparar la reactivitat del 5-*tert*-butiluracilacetat de metil (**1c**) amb el seu anàleg de timina (**2c**) al fotosensibilitzar amb benzofenona (BP), acetona i xantona. En general **1c** va reaccionar més lent que **2c**. La reacció amb BP originà exclusivament

oxetans. En el cas d'usar acetona com a fotosensibilització es van obtenir dímers mixtes uracil-5-*tert*-butiluracil (**1e-1** i **1e-2**), el derivat acetoni (**1e-3**) i un fotoproducte fruit d'una deshidrogenació (**1e-4**). En el cas de la xantona, sols es va observar a formació d'un únic oxetà (**1f**). No obstant, les irradiacions paral·leles dutes a terme amb **2c** van conduir a la formació de dímers ciclobutànics en tots els casos. Els resultats obtinguts indiquen que la presència d'un grup voluminós en C5 impedeix la formació de dímers ciclobutànics.

A continuació, es va explorar la fotoquímica de la timina des del seu estat excitat triplet superior  $n\pi^*$  a través de la fotorreacció de Norrish-Yang. L'estratègia a seguir va consistir a poblar el mencionat estat per transferència d'energia des d'un estat excitat triplet superior d'un fotosensibilitzador adequat. Per dur-ho a terme, es va dissenyar una diada formada pel compost 5-*tert*-butiluracil, susceptible de sofrir un procés de Norrish-Yang, enllaçat per una amida alifàtica al cromòfor BP. Es va triar aquest com a fotosensibilitzador degut a que presenta un  $T_n$  amb una energia i un temps de vida ( $\sim 400$  kJ/mol y 37 ps, respectivament) adequats per poder participar en el procés. Així, es va dur a terme una excitació multifotònica de la diada amb un flux de làser a una potencia elevada (làser de Nd:YAG, 355 nm, 40 mJ/pols) i posteriorment la barreja de reacció es va analitzar amb un UPLC-MS/MS. Els resultats evidencien la formació de la pirimidona esperada al tenir lloc la reacció de Norrish-Yang amb un rendiment químic del 0.003 %, en concordança amb la resta de processos que ocorren des d'estats excitats superiors.

Finalment, la demostració de que el procés analitzat és de natura bifotònica es va aconseguir amb el seguiment de la reacció en funció de la potència de làser utilitzada.

En l'últim capítol de la tesi s'aborda la possibilitat de que el fotoproducte (6-4) una vegada format a l'ADN, actue a la vegada com a fotosensibilitzador endogen, ja que aquesta lesió té la capacitat d'absorbir en la regió UVB-UVA per la presència en la seua estructura de 5-metil-2-pirimidona (Pyo). Així, es va sintetitzar el desoxiribonucleòsid i es va irradiar en presència d'ADN. L'anàlisi de les lesions fotoinduides en la biomacromolècula al fer-la migrar a través d'un gel d'agarosa en presència i absència de T4 endonucleasa V, van permetre establir que Pyo és un fotosensibilitzador de l'ADN, i que aproximadament el

20 % dels danys són dímers ciclobutànics. A més, els estudis fotofísics fets amb Pyo van conformar que pot ser partícep tant en processos de transferència d'energia com en processos oxidatius ja que el seu triplet té una energia major a la de la timina aïllada i en l'ADN i a més genera radicals hidroxil i oxigen singlet.

Seguidament es passà a considerar el potencial fotosensibilitzador del propi dany 6-4 PP, ja que les propietats fotoquímiques de la molècula completa podrien diferir del cromòfor aïllat. La seua irradiació en presència d'ADN va revelar que el dany actua com a fotosensibilitzador de la mateixa manera que el seu cromòfor, a pesar de que les seues propietats fotofísiques no són del tot coincidents. Així, l'últim capítol de la present tesi ha servit per establir que el propi dany 6-4 PP pot actuar com a cavall de Troia i estendre la fracció activa de la radiació UV, provocant la formació de dímers pirimidínics i danys oxidatius, convertint-lo en un dany potencialment més perillós d'allò estimat fins la data.

## SUMMARY

Ultraviolet radiation is associated with the formation of some lesions in DNA structure related with skin cancer origin. The damages obtained in pyrimidine bases are the most relevant: cyclobutane dimers (CPDs) and (6-4) photoproducts (6-4 PPs). Therefore numerous studies had been performed to understand the photochemistry involved in their formation. However, despite extensive mechanistic knowledge achieved, there are still some aspects that need to be clarified. The overall thesis objective was to clarify some of the of DNA photoreaction mechanisms, with special attention to the bipyrimidinic lesions.

First the influence in the substitution on the C5 of 2-thiopirimidines related to the photophysical properties was established by experimental studies and theoretical calculations. For this, 2-thiouracil (TU), 2-thiothymine (TT) and 5-tert-butyluracil (BTU) were chosen. The UV spectra displayed by the three compounds were very similar to each other. They showed a maximum around 275 nm and a shoulder at ca. 290 nm. The three 2-TPyr exhibited a strong phosphorescence emission; from the recorded spectra, triplet excited state energies of ca. 307, 304 and 294 kJ/mol were determined for TU, BTU and TT, respectively. Laser excitation at 308 nm gave rise to a broad transient absorption band from 500 nm to 700 nm, which was in principle assigned to triplet-triplet absorption. This assignment was confirmed by energy transfer experiments using biphenyl as an acceptor. The triplet lifetimes were 70 ns, 1.1  $\mu$ s and 2.3  $\mu$ s, for TU, BTU and TT, respectively. The photophysical data obtained, both in phosphorescence and transient absorption measurements, point to significantly different properties of the TT triplet excited state in spite of the structural similarities. Theoretical calculations at the B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM level agree well with the experimental range of excited state energies and support the  $\pi\pi^*$  nature of the lowest triplet states.

Secondly, the influence of steric hindrance at C5 position about the formation of bipyrimidinic lesions was analyzed. For this, reactivity of 5-tert-butyluracil methyl ester (**1c**) with its analog thymine (**2c**) was compared after BP, xanthone and acetone photosensitizing. Generally **1c** reacts slower than **2c**. Reac-

tion with BP led exclusively oxetanes. In the case of using acetone as sensitizer uracil-5-tert-butyluracil mixed dimers (**1e-1** and **1e-2**), the acetonyl derivative (**1e-3**) and a dehydrogenation photoproduct (**1e-4**) were obtained. In the case of xanthone only one oxetane (**1f**) was observed. However, parallel irradiations performed with **2c**, led the formation of cyclobutane dimers in all cases. The obtained results indicated that the presence of a bulky group in C5 prevents the formation of cyclobutane dimers.

Then, the photochemistry of thymine was explored from its higher triplet excited state  $n\pi^*$  through Norrish-Yang photoreaction. The strategy was to populate that state through triplet energy transfer process from a higher triplet excited state a suitable photosensitizer. This requires a dyad with 5-tert-butyluracil compound bonded through an aliphatic amide to the BP chromophore. It was chosen as a photosensitizer because it has a  $T_n$  with a suitable energy and lifetime to participate in the process ( $\sim 400$  kJ/mol and 37 ps, respectively). Thus the multiphonic excitation of dyad was performed using a laser beam at high power (Nd: YAG, 355 nm, 40 mJ/pulse) and then the reaction mixture was analysed by UPLC-MS/MS. The results showed the formation of the pyrimidine compound expected to take place after the Norrish-Yang reaction with a chemical yield of 0.003%, in line with other processes that occur from higher excited states. Finally, the demonstration that the process has bifotonic nature was obtained after following the reaction yield based on the laser power used.

The last chapter of the thesis deals the possibility that the photoproduct (6-4) once formed in DNA, acts as an endogenous photosensitizer, because this lesion is capable of absorbing light in the UVB-UVA region because the presence in their structure of 5-methyl-2-pyrimidone. The equivalent desoxyribonucleoside (Pyo) was synthesized and irradiated in presence of DNA. Analysis of the damage photoinduced in the biomacromolecule was performed through an agarose gel migration in the presence and absence of T4 endonuclease V, allowed to establish that Pyo is a photosensitizer of DNA, and that approximately 20% of the damage was from cyclobutane dimers. In addition, photophysical studies conducted with Pyo confirmed that it could participate in both

processes energy transfer and oxidative processes since its triplet has a higher energy than isolated thymine and the DNA and it also generates hydroxyl radicals and singlet oxygen.

Then, the potential as 6-4 PP photosensitizer had been considered since the photochemical properties of the whole molecule may differ from the isolated chromophore. Irradiation in the presence of DNA damage found that acts as a photosensitizer in the same way that the chromophore, even though their photophysical properties are not entirely coincident. Thus, the final chapter of this thesis has served to establish that 6-4 PP damage can act as a Trojan horse and extend the active fraction of UV radiation, causing the formation of pyrimidine dimers and oxidative damage, making it potentially more dangerous than estimated so far.





# **Publicaciones**



**1. Photosensitization of DNA by 5-Methyl-2-Pyrimidone Deoxyribonucleoside: (6-4) Photoproduct as a Possible Trojan Horse**

Victoria Vendrell-Criado; Gemma María Rodríguez-Muñiz; M. Consuelo Cuquerella; Virginie Lhiaubet-Vallet; Miguel A. Miranda. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6476-6479.

**2. Two-Photon Chemistry from Upper Triplet States of Thymine**

Victoria Vendrell-Criado; Gemma María Rodríguez-Muñiz; Majima Yamaji; Virginie Lhiaubet-Vallet; M. Consuelo Cuquerella;\* Miguel A. Miranda. \* *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16714–16719.

**3. Photophysical properties of 5-substituted 2-thiopyrimidines**

Victoria Vendrell-Criado; Jose A. Sáez; Virginie Lhiaubet-Vallet; M. Consuelo Cuquerella; Miguel A. Miranda. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 1460-1465.





