

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 ciclobutànics (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, amb un rendiment quàntic 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 bifeníl com acceptor. Els temps de vida de triplet van ser 70 ns, 1.1 μ s i 2.3 μ 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 B3LYP/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 superior triplet $n\pi^*$ 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 (~ 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 de formació de fotoproucte 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 fotoproucte (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 fotoinduïdes 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 pot ser un fotosensibilitzador d'ADN, i que aproximadament el 20 % dels danys que produeix 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.