

ANÁLISE GLOBAL DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ULTRARRÁPIDA DE BASES ANÁLOGAS ÀS DE DNA/RNA

Vanessa Gorete da Silva¹; Igor Ferreira Curvelo²; Alécia Carla Silva Gomes³; Danielle Cristina Teles Ferreira⁴.

1 Bolsista (IFMG), Engenharia Elétrica - IFMG Campus Formiga-MG; vanessa.silva.ifmg@gmail.com

2 Bolsista (IFMG), Licenciatura em Física - IFMG Campus Ouro Preto-MG; igor.f.curvelo@gmail.com

3 Voluntária (IFMG), Licenciatura em Física - IFMG Campus Ouro Preto-MG; aleciacarlasilva@gmail.com

4 Orientadora, Pesquisadora do IFMG - Campus Ouro Preto-MG; danielle.teles@ifmg.edu.br

RESUMO

As Tiobases são resultado da substituição de átomos de oxigênio por átomos de enxofre nas bases canônicas que compõem o DNA/RNA. Ao serem excitadas ópticamente por luz UV, as tiobases detêm ampla capacidade de popular o estado tripleto por um longo período, produzindo oxigênio singleto, espécie eletronicamente excitada de O₂ e altamente fototóxica. Devido às suas peculiares propriedades de cruzamento intersistêmico rápido, deslocamento no espectro de absorção para o vermelho em relação às bases canônicas e a efetiva população do estado tripleto, suas empregabilidades são múltiplas, como: no tratamentos contra o câncer de pele e outros tumores superficiais, terapia fotodinâmica e em fármacos destinados ao tratamento de doenças autoimunes. O trabalho aqui apresentado visa relatar os resultados parciais referente as constantes de tempo obtidas a partir da análise dos dados de espectroscopia ultrarrápida no UV da amostra 6-Tioguanina (6TG) em solução aquosa com a polarização em ângulo mágico (54,7°) entre o feixe de bombeio e de prova, coletados pela coordenadora do projeto durante seu doutorado e compará-lo com resultados da literatura para a mesma amostra, mas com polarização paralela. Para a coleta dos dados foi utilizado a técnica de espectroscopia *Pump e Probe* com resolução de 20 fs na faixa do UV, os dados foram coletados no laboratório de pesquisa do departamento de Física da *Universidade Politecnico di Milano* em Milão, Itália. Para a análise dos dados realizada neste projeto foi utilizado um programa gratuito (Glotaran 1.5.1), que possibilitou a extração de informações das constantes de tempo associadas às vias de decaimento energético. As constantes de tempo encontradas foram: $\tau_1 = 59$ fs e $\tau_2 = 500$ fs e um estado com tempo longo (fora da janela temporal analisada). Ao comparar os valores de tempo obtidos com os valores da literatura, cuja a única diferença era entre medidas de espectroscopia é a polarização de bombeio e prova, concluímos que a polarização da amostra não tem influência no tempo de relaxamento da biomolécula.

Palavras-chave: DNA/RNA. Tiobases. Decaimento energético.

INTRODUÇÃO:

A manutenção da vida terrestre está intrinsecamente ligada à fotoestabilidade de ácidos nucleicos, particularmente os que compõem as nucleobases, visto que sua capacidade de repopular o estado fundamental após excitação por luz ultravioleta é responsável por evitar lesões fotoinduzidas (FRANCÉS-MONERRIS et al., 2018). Entretanto, a modificação de bases canônicas tem fomentado o estudo no que diz respeito à resposta das mesmas diante de modificações em sua estrutura química, possibilitando assim o estudo e avaliações de suas possíveis aplicações em diferentes áreas. Além disso, os efeitos de uma mera substituição de um átomo em uma molécula são importantes modelos de estudos. Constituídas basicamente por Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio e Oxigênio, as nucleobases são fortemente sensíveis às mudanças em sua estrutura química. Sendo assim, a concepção das Tiobases, bases análogas às de DNA/RNA, se dá a partir da substituição de um átomo de Oxigênio por um átomo de

Enxofre, modificando drasticamente as propriedades dessas biomoléculas quando comparadas às suas análogas canônicas (BARBATTI et al., 2015).

Devido às suas características específicas as Tiobases são aplicáveis a diferentes áreas. Por exemplo, a biomolécula 6 - Tioguanina (6TG) - amostra cujo os dados analisados são descritos neste resumo - comumente utilizada no tratamento de diversas condições clínicas (TIDD E PATERSON, 1974) e também utilizada em Terapia Fotodinâmica (REELFS; KARRAN; YOUNG, 2012). Tal terapia tem se mostrado promissora para o tratamento do câncer e outras doenças a partir da combinação de um fármaco fotossensibilizante, uma fonte de luz com comprimento de onda adequado ao espectro de absorção da droga associada ao tratamento e Oxigênio (MACHADO, 2000).

Neste sentido, compreender o mecanismo de desativação dessas moléculas torna-se imprescindível para avanços relativos às suas diversas aplicações, tais quais em nanotecnologia (WOJCIECHOWSKI; LEUMANN, 2011), fotoquimioterapia (PRIDGEON et al., 2011), fotocrosslinking (FAVRE, 1998), uso farmacológico (PÉRIGAUD; GOSSELIN; IMBACH, 1992), além de se caracterizar como um bom modelo de estudos das influências da substituição de um único átomo em uma molécula (ASHWOOD; POLLUM; CRESPO-HERNÁNDEZ, 2019).

O estudo das tiobases pela técnica de *Pump e Probe* tem sido extensivamente estudada na literatura. Para citar alguns exemplos: a origem da eficiente população do estado tripleto na amostra 2-Tiocitosina foi desvendada utilizando tal técnica (MAI et al., 2016), bem como a influência da posição do enxofre nas derivativos da uracila (POLLUM et al., 2015), o mecanismo de decaimento da 4-Tiotimidina (MARTINEZ-FERNANDEZ et al., 2017) e a presença de um estado intermediário escuro nas vias de decaimento da 4-tiouracila bem como oscilações coerentes que facilitam o mecanismo de desativação (BORREGO-VARILLAS, et al., 2018). Foi observado também utilizando a técnica de transmissão transiente no UV com alta resolução temporal que dependendo do comprimento de onda de excitação da amostra de uracila duplamente substituída com enxofre (2,4-Ditiouracil), que várias vias de desativação do estado fotoexcitado podem ser ativadas e o mecanismo de desativação se excitado o enxofre da posição 4 se compara com o mecanismo de desativação da 4-Tiouracila e se excitado o enxofre na posição 2 o mecanismo de desativação se compara com o da 2-Tiouracila (TELES-FERREIRA, et al., 2020).

Neste trabalho vamos nos concentrar nos efeitos da polarização nas constantes de tempo associadas ao decaimento da amostra 6-Tioguanina e comparando essas constantes de tempo com valores previamente obtidos na literatura.

METODOLOGIA:

A amostra, cujo os dados analisados estão descritos na seção Resultados e Discussões, foi adquirida pela empresa *Sigma-Aldrich* (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemanha*). A amostra, 98% pura foi preparada em solução de PBS (*phosphate buffered saline*), onde 0,15 g de fosfato monossódico e 0,27 g de fosfato dissódico foram dissolvidos em 200 mL de água ultrapura, a fim de obter-se um pH de 7,4 e 16 mM de concentração. Os dados aqui estudados foram coletados pela coordenadora do projeto durante o seu doutorado.

A técnica de *Pump e Probe*

Para a coleta deles foi desenvolvida a montagem experimental *in loco* (laboratório de pesquisa do departamento de Física da *Universidade Politecnico di Milano*, sediada em Milão, Itália) que aplicava a técnica *Pump e Probe*. A montagem se iniciava com o laser de Ti:safira pulsado (800 nm, 100 fs e 1 kHz), cujo feixe é dividido em duas linhas: a de bombeio e de prova. O feixe de bombeio (do inglês: *pump*), passa por um amplificador paramétrico não colinear (NOPA) na região visível que é sintonizável de 500 nm a 700 nm e produz pulsos de 10 fs devido ao uso de um par de Espelhos Compressores para compensação de dispersão com pelo menos 5 saltos em cada espelho. Os pulsos de bombeio vindo do NOPA e um pulso no infravermelho sofrem a soma de frequência em um cristal de BBO produzindo pulsos de banda larga centrados em 330 nm. A polarização entre o feixe de bombeio e prova é em ângulo mágico (54,7°). Já o feixe de prova (do inglês: *probe*) vem do laser fundamental, passar por um estágio de atraso e em seguida por um cristal Ca₂F que mediante processos não lineares de altas ordens gera a um feixe de luz com vários comprimentos de onda. O primeiro feixe que chega na amostra é o feixe de bombeamento, com função de modificar as propriedades ópticas da amostra. Após um intervalo de tempo τ , o feixe de prova atinge a amostra, interagindo com o material (VARDENY; TAUC, 1981). Tal procedimento permite a extração das constantes de tempo relativas a cada etapa do processo de desativação da molécula. É possível monitorar a evolução do sistema a partir da detecção do feixe de prova variando o tempo de atraso entre os pulsos (CERULLO; DE SILVESTRI, 2003).

A análise dos dados coletados a partir deste experimento foi realizada utilizando o programa de código aberto Glotaran 1.5.1.

A Análise Global de Dados

O conjunto de dados referentes à 6-Tioguanina foram submetidos a uma análise global (VAN STOKKUM; LARSEN; VAN GRONDELLE, 2004) utilizando o programa de código aberto Glotaran 1.5.1, que possibilita a extração de informações de uma extensa quantidade de dados a partir de uma análise baseada em um modelo.

Desta forma, a análise global de dados possibilita a extração das constantes de tempo relacionadas à dinâmica do conjunto analisado. Para tal, todo o mapa de Espectroscopia de Transmissão Transitória é ajustado simultaneamente a partir de um ajuste com funções exponenciais $A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$, considerando as contribuições espectrais associadas a cada constante de tempo e a cada comprimento de onda do feixe de prova. A fim de encontrar o número de vetores independentes substancialmente diferentes do ruído faz-se uma decomposição singular, e assim obtém-se as componentes dominantes e componentes residuais correlatas aos artefatos coerentes (VAN STOKKUM, 2005).

O espectro resolvido no tempo é expresso por $\Psi(\lambda, t)$ e depende dos comprimentos de onda do *probe* e atraso entre *Pump* e *Probe*. Tal relação é expressa pela Relação 1:

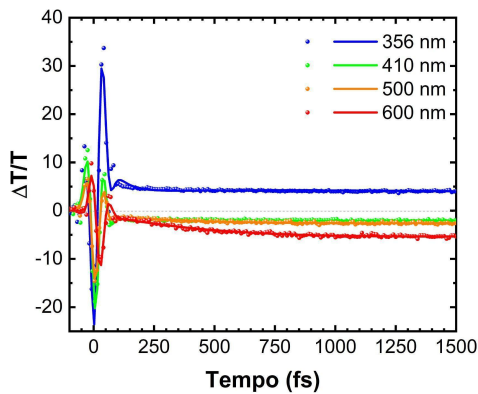
$$\Psi(\lambda, t) \propto \sum_{l=1}^{n_{comp}} (e^{k_l t} \otimes IRF(t)) EAS_l(\lambda) \quad (1)$$

onde, k_i representa a taxa de decaimento para cada componente; $IRF(t)$ está relacionada a função de resposta instrumental, e $EAS_i(\lambda)$ são as amplitudes dos decaimentos exponenciais (VAN STOKKUM, 2005).

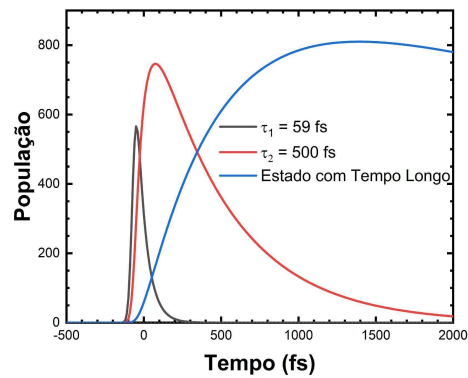
RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Um modelo com três constantes de tempo de decaimento foi utilizado para execução da análise realizada. Os valores referentes obtidos foram de: 59 fs; 500 fs e um estado com tempo longo fora do intervalo de tempo medido. Foi considerada a dispersão devido a propagação de comprimentos de ondas diferentes com diferentes velocidades (*chirp*), com ordem polinomial 3, cujos valores são 101,144; -53,8996; 21,3999. O comprimento de onda central é de 525 nm. Foram obtidos os Parâmetros IRF do tipo Gaussiano, com posição com valor inicial 354,581. A largura do pulso obtida foi 20,0666. Para ajuste do Artefato Coerente do tipo Sequencial, foram usadas 5 taxas de decaimento, com os seguintes valores: 0,181619; 0,216102; 0,181651; 2,62091; 0,164370. Foram realizadas 3 iterações e erro padrão residual final 0,000516242. Os resultados obtidos para a dinâmica, o espectro de evolução associado ao decaimento (DAS), o espectro de evolução associada (ESA), a normalização do espectro de evolução associado ao decaimento (normDAS) e normalização do espectro de evolução associado (normESA), estão apresentados a seguir.

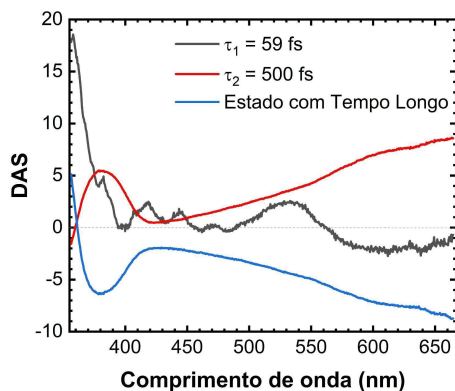
a)



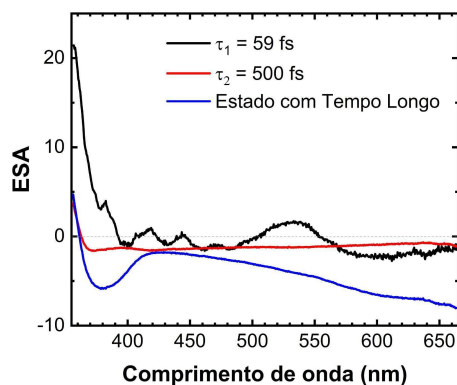
b)



c)



d)



e)

f)

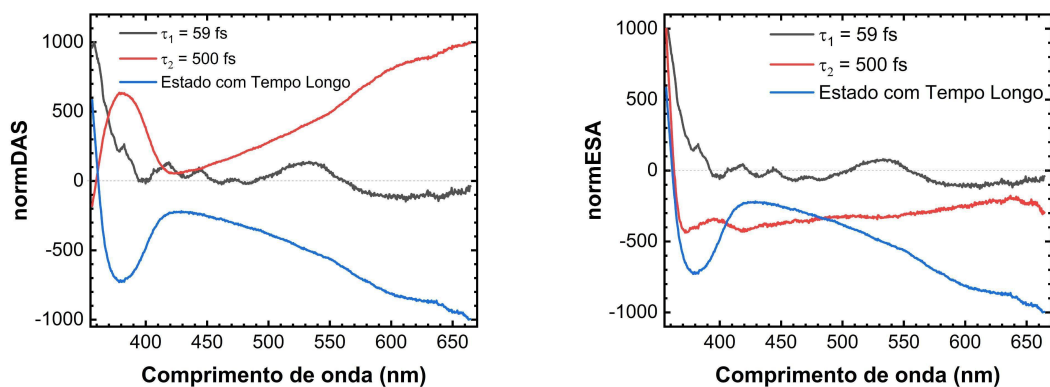


Figura 1. (a) A dinâmica para selecionados os comprimentos de onda. A janela temporal apresentada foi de -100 fs até 1500 fs, (b) Evolução da população para cada constante de tempo, (c) Espectro de evolução associado ao decaimento (DAS) obtido depois da análise dos dados de transmissão transiente, (d) Espectro de evolução associado (ESA) obtido depois da análise dos dados de transmissão transiente, (e) Normalização espectro de evolução associado ao decaimento (normDAS), (f) Normalização espectro de evolução associado (normESA).

As curvas de cor preta apresentado nas figuras de b até f estão associadas ao decaimento ultrarrápido do estado foto excitado $S_2\pi\pi^*$. Ele ocorre em 59 fs e o pico observado em 375 fs nas figuras 1d e 1f em tempos menores que 100 fs também foram observados em outros trabalhos (TELES-FERREIRA, et al., 2022) e atribuídos a esse estado. Para tempos maiores que 200 fs observamos a formação de bandas de absorção fotoinduzidas que estão associadas a população do estado tripleto (curvas vermelhas e azuis).

Os espectros presentes na figura 1c e 1d e a suas normalizações nas figuras 1e e 1f foram obtidos por um ajuste global dos dados usando um modelo cinético sequencial. O melhor ajuste foi obtido com duas constantes de tempo, $\tau_1 = 59$ fs e $\tau_2 = 500$ fs e um Estado com tempo longo. Ao comparar os valores de tempo obtidos no ajuste com os valores obtidos no artigo “*Ultrafast Excited-State Decay Mechanisms of 6-Thioguanine Followed by Sub-20 fs UV Transient Absorption Spectroscopy*”, observamos que a polarização da amostra não influencia no tempo de relaxamento da biomolécula, pois a biomolécula estudada no artigo foi preparada sob as mesmas circunstâncias que a aqui estudada, porém está polarizada paralelamente. As constantes de tempo obtidas para τ_1 e τ_2 pelos autores do artigo foram 81 fs e 522 fs respectivamente. É possível observar que o valor obtido para resultados τ_2 está dentro do do erro estimado, 48 fs. Para τ_1 o tempo excede em 2 fs, uma vez que o erro estimado é de 30 fs, no entanto, o valor está dentro de uma margem aceitável levando em consideração a largura de 20 fs do feixe de bombeio.

Ao ser excitada opticamente por luz UVA, a 6-Tioguanina, preenche inicialmente o estado $S_2\pi\pi^*$, que decai posteriormente para o estado $S_1n\pi^*$, em um tempo de 59 fs (ver figura 2). O estado S_1 tem dois mínimos: um de natureza $n\pi^*$ e outro de natureza $\pi\pi^*$. A partir do estado $S_1(n\pi^*)$ existe uma população eficiente dos estados tripletos: $T_1(^3\pi\pi^*)$ e $T_2(^3n\pi^*)$, isoenergéticos, possibilitando o intercâmbio de população. A passagem do Estado S_1 para qualquer um dos estados Tripletos, ocorre em um intervalo de tempo de 500 fs. A

principal via de relaxamento da 6TG segue a seguinte ordem $S_2(\pi\pi^*) \rightarrow S_1(n\pi^*) \rightarrow T_1(^3\pi\pi^*) / T_2(^3n\pi^*) \rightarrow T_1(\pi\pi^*)$, no entanto existe uma contribuição menor no caminho $S_2(\pi\pi^*) \rightarrow S_1(\pi\pi^*) \rightarrow S_0$ ou $S_2(\pi\pi^*) \rightarrow T_2(^3n\pi^*) \rightarrow T_1(^3\pi\pi^*)$. A figura 2 resume estas descrições.

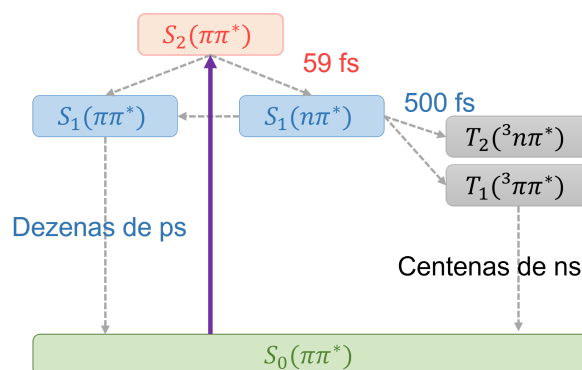


Figura 2. Mecanismo de decaimento da 6-Tioguanina em polarização em ângulo mágico

CONCLUSÕES:

Analisados os resultados obtidos pelo artigo “*Ultrafast Excited-State Decay Mechanisms of 6-Thioguanine Followed by Sub-20 fs UV Transient Absorption Spectroscopy*” e os resultados alcançados neste estudo, observa-se haver uma concordância no que tange ao mecanismo de decaimento energético da biomolécula 6-Tioguanina, visto que os resultados alcançados para a amostra analisada neste estudo possuem valores de 59 fs para τ_1 , 500 fs para τ_2 e um estado com tempo longo, diferenciando-se em 22 fs para τ_1 e τ_2 com relação aos valores obtidos pelo artigo analisado.

Portanto, a compreensão do estado de fotoexcitação e relaxação de energia em biomoléculas análogas às de DNA/RNA possibilita o entendimento da estrutura energética destas, fornecendo um bom modelo para o estudo das mudanças de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, bem como a percepção das influências sofridas em uma molécula em que há a substituição de um átomo. Com os resultados obtidos é possível observar que a polarização da molécula não interfere em seu tempo de relaxamento energético, uma vez que os tempos não variam significativamente de uma polarização para a outra. Além disso, os valores obtidos estão de acordo com outros já relatados na literatura (TELES-FERREIRA. et al., 2022).

Espera-se ao final deste projeto de pesquisa que através da Análise Global de Dados novas constantes de tempo relevantes para outras amostras analisadas sejam obtidas, a fim de sugerir os possíveis mecanismos de desativação energética de diferentes biomoléculas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ASHWOOD, Brennan; POLLUM, Marvin; CRESPO-HERNÁNDEZ, Carlos E. Photochemical and photodynamical properties of sulfur-substituted nucleic acid bases. **Photochemistry and photobiology**, v. 95, n. 1, p. 33-58, 2019.

BARBATTI, Mario; BORIN, Antonio Carlos; ULLRICH, Susanne. Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids I Nucleobases in the Gas Phase and in Solvents Preface. 2015.

BORREGO-VARILLAS, Rocío et al. Observation of the sub-100 femtosecond population of a dark state in a thio base mediating intersystem crossing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 47, p. 16087-16093, 2018.

CERULLO, Giulio; DE SILVESTRI, Sandro. Ultrafast optical parametric amplifiers. **Review of scientific instruments**, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2003.

FAVRE, Alain et al. Thionucleobases as intrinsic photoaffinity probes of nucleic acid structure and nucleic acid-protein interactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 42, n. 2, p. 109-124, 1998.

FRANCÉS-MONERRIS, Antonio et al. Dynamics of the excited-state hydrogen transfer in a (dG):(dC) homopolymer: intrinsic photostability of DNA. **Chemical science**, v. 9, n. 41, p. 7902-7911, 2018.

MACHADO, Antonio Eduardo da Hora. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, Lara et al. Decoding the molecular basis for the population mechanism of the triplet phototoxic precursors in UVA light-activated pyrimidine anticancer drugs. **Chemistry—A European Journal**, v. 23, n. 11, p. 2619-2627, 2017.

POLLUM, Marvin; JOCKUSCH, Steffen; CRESPO-HERNÁNDEZ, Carlos E. Increase in the photoreactivity of uracil derivatives by doubling thionation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 41, p. 27851-27861, 2015.

PÉRIGAUD, C. G. J. L.; GOSSELIN, G.; IMBACH, J. L. Nucleoside analogues as chemotherapeutic agents: a review. **Nucleosides & nucleotides**, v. 11, n. 2-4, p. 903-945, 1992.

PRIDGEON, S. W. et al. Thiothymidine combined with UVA as a potential novel therapy for bladder cancer. **British journal of cancer**, v. 104, n. 12, p. 1869-1876, 2011.

REELFS, Olivier; KARRAN, Peter; YOUNG, Antony R. 4-Thiothymidine sensitization of DNA to UVA offers potential for a novel photochemotherapy. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 11, n. 1, p. 148-154, 2012.

TELES-FERREIRA, Danielle C. et al. Ultrafast Excited-State Decay Mechanisms of 6-Thioguanine Followed by Sub-20 fs UV Transient Absorption Spectroscopy. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1200, 2022.

TELES-FERREIRA, Danielle Cristina et al. A unified experimental/theoretical description of the ultrafast photophysics of single and double thionated uracils. **Chemistry—A European Journal**, v. 26, n. 1, p. 336-343, 2020.

TIDD, David M.; PATERSON, Alan RP. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. **Cancer Research**, v. 34, n. 4, p. 738-746, 1974.

VAN STOKKUM, I. H. M. Global and target analysis of time-resolved spectra, Lecture notes for the Troisième Cycle de la Physique en Suisse Romande. Tech. rep., Department of Physics and Astronomy, **Faculty of Sciences**, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.nat.vu.nl/ivo/lecturenotes.pdf>, 2005.

VAN STOKKUM, Ivo HM; LARSEN, Delmar S.; VAN GRONDELLE, Rienk. Global and target analysis of time-resolved spectra. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1657, n. 2-3, p. 82-104, 2004.

VARDENY, Z.; TAUC, J. Picosecond coherence coupling in the pump and probe technique. **Optics Communications**, v. 39, n. 6, p. 396-400, 1981.

WOJCIECHOWSKI, Filip; LEUMANN, Christian J. Alternative DNA base-pairs: from efforts to expand the genetic code to potential material applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 12, p. 5669-5679, 2011.