

PRODUCCIÓN DE OXÍGENO SINGLETE

Como se detalló en el *Capítulo 2* existen muchas moléculas orgánicas que pueden actuar como sensibilizadores y producir oxígeno singlete al iluminar soluciones acuosas aireadas. El sensibilizador en su estado basal es un singlete y al absorber un fotón pasa a un estado singlete excitado, que luego puede formar un triplete excitado por cruzamiento intersistemas. Este triplete puede reaccionar con el triplete basal del oxígeno y formar oxígeno singlete [Foote *et al.*, 1995; Turro, 1991]. Por ello, y por la baja energía necesaria, el oxígeno molecular es un buen *quencher* de estados tripletes de moléculas orgánicas.

Es evidente que, debido a la amplia distribución de las pterinas en los sistemas biológicos, a su presencia en zonas expuestas a la luz solar, y, en particular, a su acumulación en la piel de los seres humanos afectados de enfermedades tales como vitiligo, es interesante investigar la capacidad de esta familia de compuestos para producir oxígeno singlete. En este capítulo se presentan resultados de un estudio realizado sobre este punto

***Quenching* de oxígeno singlete por pterinas en solución acuosa.**

Tal como se detalló en la parte experimental (*Capítulo 7*), el método empleado para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia requiere del conocimiento de la constante de *quenching* total (k_T) del sensibilizador estudiado. Es decir es necesario conocer la cantidad de oxígeno singlete generado que se desactiva

con el propio sensibilizador. Se realizó este estudio para todos los compuestos de los cuales se quiere determinar el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete. Las medidas se realizaron en soluciones aireadas en medio alcalino (pD=10) y empleando rosa de bengala como sensibilizador. La irradiación se realizó a 547 nm, longitud a la cual ninguna pterina absorbe luz.

Este estudio es interesante desde el punto de vista del mecanismo de las reacciones de fotooxidación de las pterinas, en particular para el ácido fólico. En efecto, en estudios previos de estas reacciones se sugirió que el oxígeno singlete podría actuar como intermediario activado en la fotooxidación del ácido fólico, tanto en medio ácido como en medio alcalino, sin embargo, no se presentó evidencia directa en este sentido [Thomas *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002].

Se realizó un estudio del *quenching* de oxígeno singlete por seis pterinas: pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, biopterina, neopterina y ácido fólico. En la Figura 11.1 se muestra, a modo de ejemplo, las señales obtenidas en un experimento típico. Se mantiene la concentración de sensibilizador (rosa de bengala) constante y se varía la concentración del *quencher* (una pterina, en este caso). Puede observarse que al aumentar la concentración de la pterina, la señal de oxígeno singlete disminuye. Esto significa que el oxígeno singlete es desactivado por la presencia de la pterina.

Se realizaron las gráficas de Stern-Volmer de la emisión infrarroja del oxígeno singlete según la Ecuación 12 que se describió en el *Capítulo 7*. Estas gráficas son lineales en el rango de concentraciones utilizadas (Figura 11.2). Los valores de k_T se calcularon de las pendientes de las curvas, tomando el valor de 62 μs para el tiempo de vida del oxígeno singlete (τ_Δ) en D_2O . La Tabla 11.1 muestra estos resultados.

Los valores de k_T para pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, neopterina, y biopterina son bastante similares (toman valores entre $1.4 - 2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), mientras que la del ácido fólico es un orden de magnitud mayor. Este comportamiento especial del ácido fólico puede ser debido a la relativamente eficiente reacción entre el oxígeno singlete y este compuesto. Puede inferirse esta hipótesis de los resultados mencionados anteriormente sobre la fotoquímica del ácido fólico y 6-formilpterina en solución acuosa:

se ha sugerido que el oxígeno singlete es un intermediario en la fotooxidación auto-sensibilizada del ácido fólico, mientras que no está involucrado en el caso de la 6 formilpterina.

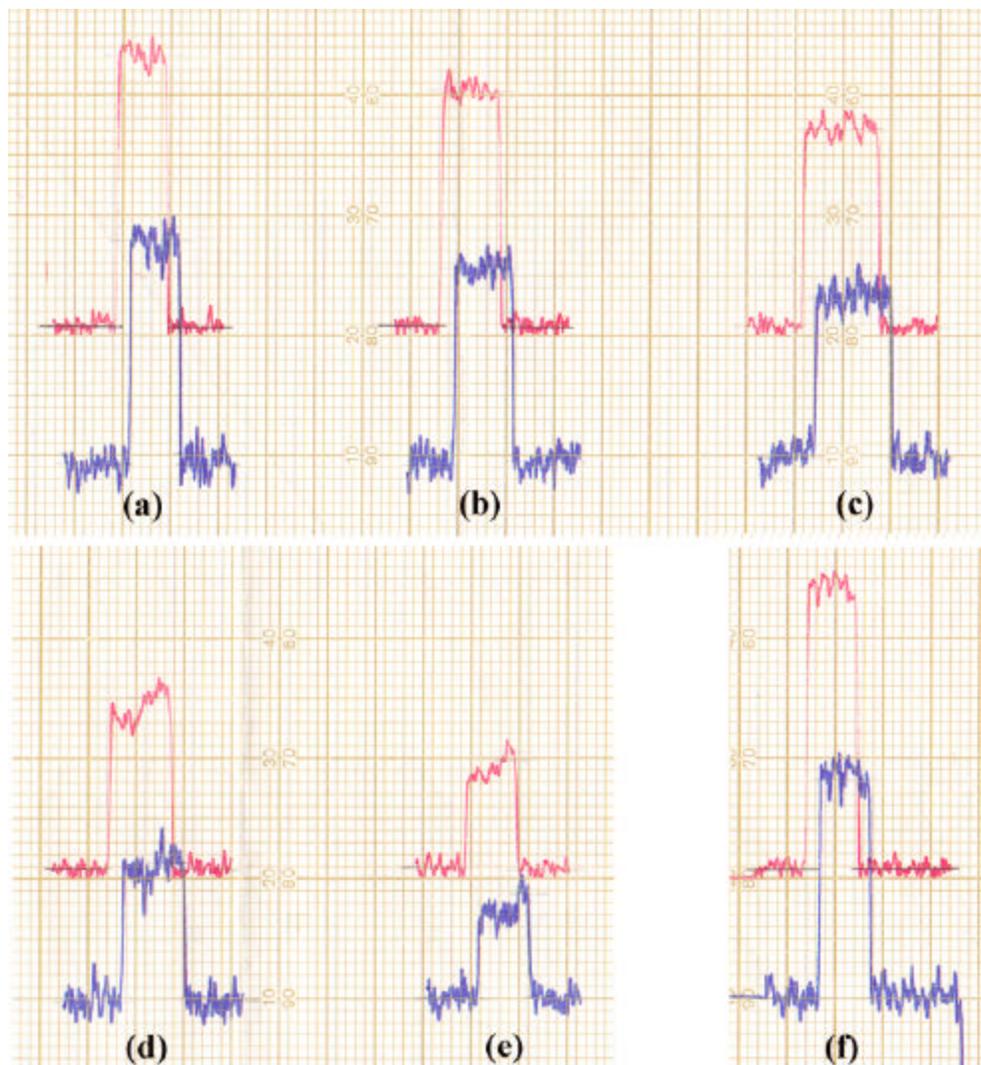


Figura 11.1: *Quenching* de 1O_2 por ácido fólico. Soluciones de rosa de bengala ($A^{547} = 1.46$) y diferentes concentraciones de ácido fólico: (a) 0 mM, (b) 0.09 mM, (c) 0.16 mM, (d) 0.32 mM, (e) 0.65 mM (f) 0mM.

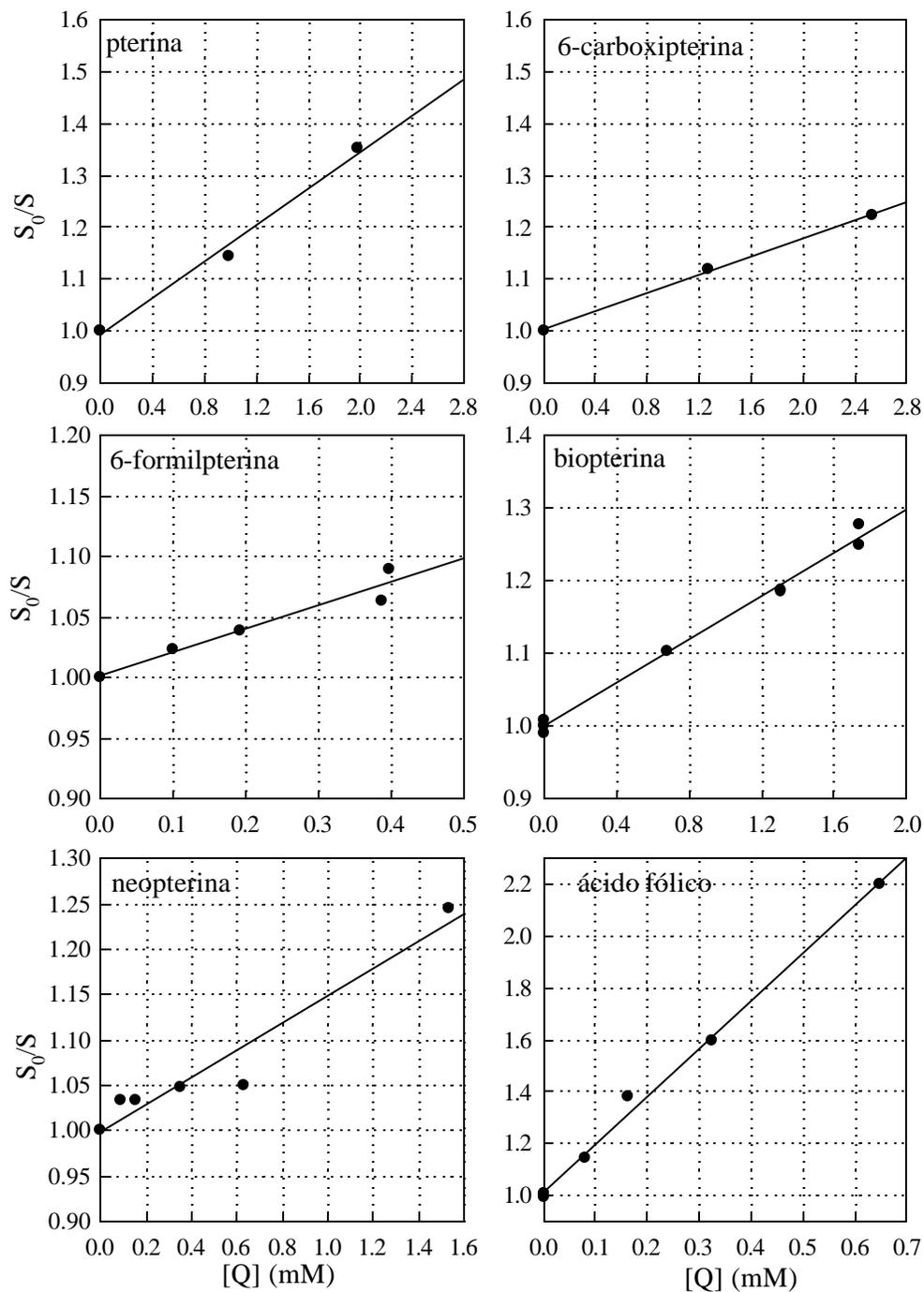


Figura 11.2: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de la emisión infrarroja del $^1\text{O}_2$ por pterina, 6-formilpterina, 6carboxipterina, biopterina y neopterina y ácido fólico.

Compuesto	K_{SV} (mM ⁻¹)	k_T^a (M ⁻¹ s ⁻¹)
pterina	1.80 10 ⁴	2.9x10 ⁶
6-carboxipterina	0.87 10 ⁴	1.4x10 ⁶
6-formilpterina	0.87 10 ⁴	1.4x10 ⁶
ácido fólico	1.86 10 ⁻³	3.0x10 ⁷
biopterina	1.49 10 ⁴	2.4x10 ⁶
neopterina	1.41 10 ⁴	2.3x10 ⁶

Tabla 11.1: Valores de pendientes de las gráficas de Stern-Volmer (K_{SV}) y de constantes de velocidad de *quenching* total de ¹O₂ (k_T), en soluciones aireadas de derivados pterínicos.

Pueden hacerse, en este punto, algunas especulaciones sobre estas diferencias en la reactividad frente al oxígeno singlete. Es bien sabido que las aminas reaccionan con el oxígeno singlete mediante un mecanismo que involucra transferencia de electrones [Darmanyan *et al.*, 1998]. Similarmente, podría existir una transferencia de electrones del nitrógeno unido al grupo metileno en la molécula de ácido fólico al oxígeno singlete, conduciendo a la oxidación de la amina (-CH₂-NH-) a una imina (-CH=N-). La hidrólisis posterior podría inducir la ruptura y oxidación de la molécula para dar 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Esta serie de reacciones se muestra en la Figura 11.3.

Este tipo de mecanismo ha sido propuesto en la literatura para aminas primarias y secundarias [Gollnick y Lindner, 1973]. La ausencia del grupo amino en la estructura química de las otras pterinas, explicaría la menor reactividad con el oxígeno singlete.

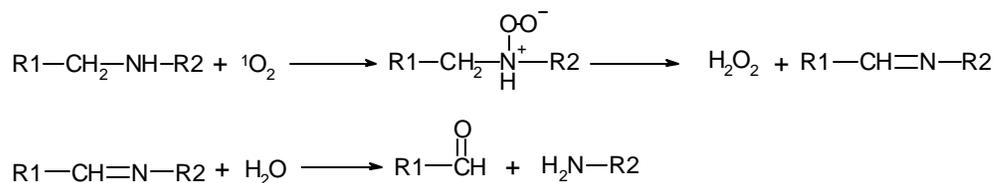


Figura 11.3: Mecanismo propuesto para la fotooxidación del ácido fólico. (R1 representa la porción pterínica y R2 el residuo de ácido *p*-aminobenzoilglutámico de la molécula de ácido fólico)

Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete por pterinas .

Se determinaron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de los seis componentes mencionados en la sección anterior en soluciones equilibradas con aire preparadas en D₂O, monitoreando la emisión de luz infrarroja del oxígeno singlete. Las pterinas se excitaron con luz de 367 nm.

Como se mostró en el *Capítulo 9* todas las pterinas estudiadas, excepto el ácido fólico, tienen rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) relativamente altos. Por ello es necesario investigar posibles colas de emisión fluorescente de las pterinas en el infrarrojo cercano. Debido a esto se realizaron experimentos, a modo de controles, en soluciones saturadas en argón. En estas condiciones, como no hay oxígeno en el medio, si se detectara emisión de luz infrarroja, esta no provendría del oxígeno singlete sino de la sustancia en estudio. Los controles se realizaron en medio ácido (pD=5.5) y medio alcalino (pD=10.0). No se detectó luminiscencia a 1270 nm bajo esas condiciones para ninguno de los compuestos estudiados.

Las determinaciones de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se realizaron para las formas ácidas (pD=5.0-6.0) y para las formas alcalinas (pD=10-11) de los seis compuestos pterínicos estudiados. Además se realizaron algunas determinaciones a valores de pD intermedios y en soluciones fuertemente

alcalinas (pD>12). Como sensibilizadores de referencia se utilizó 1H-fenalen-1-ona ($\lambda_{\text{exc}} = 367 \text{ nm}$) y rosa de bengala ($\lambda_{\text{exc}} = 547 \text{ nm}$) para los experimentos en medio ácido y alcalino, respectivamente.

Se detectó significativa emisión de oxígeno singlete para cada pterina, tanto en medio ácido como alcalino, excepto para el ácido fólico con el cual se observa una muy pequeña emisión del oxígeno singlete en medio ácido, y es apenas detectada en medio alcalino. Los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete de las seis pterinas en medio alcalino se calcularon con la siguiente ecuación, deducida en el *Capítulo 7*:

$$\frac{S_e^S}{S_e^R} = \frac{P_0^S}{P_0^R} \frac{\Phi_{\Delta}^S}{\Phi_{\Delta}^R} \frac{k_d}{k_d + k_T^{\text{Sens}} [\text{Sens}]} = \frac{P_0^S}{P_0^R} \frac{\Phi_{\Delta}^{\text{app}}}{\Phi_{\Delta}^R}$$

Como se explicó en dicho Capítulo para el cálculo de los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete debe conocerse la constante de *quenching* del oxígeno singlete (k_T^{Sens}) del sensibilizador utilizado (Tabla 11.1). Bajo las condiciones aquí utilizadas para la determinación de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en medio alcalino, k_d resulta mucho mayor que el producto $k_T^{\text{Sens}}[\text{Sens}]$ para todos los compuestos ($k_d/(k_T^{\text{Sens}}[\text{Sens}]) \approx 35$), excepto para ácido fólico ($k_d/(k_T^{\text{Sens}}[\text{Sens}]) \approx 5$). De esta manera, se pudieron calcular los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete para las formas alcalinas de las seis pterinas. Estos resultados se exponen en la Tabla 11.2. k_T^{Sens} no fue medida en medio ácido, por ello los valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) que se listan en la Tabla 11.2 para las formas ácidas son rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete aparentes ($\Phi_{\Delta}^{\text{app}}$). Sin embargo, se puede asumir que los valores de k_T^{Sens} no cambian drásticamente con el pH, o pueden ser menores como se observa para otros compuestos [García, 1994; Luiz *et al.*, 1995]. Por ello puede considerarse a los $\Phi_{\Delta}^{\text{app}}$ como valores de Φ_{Δ} reales.

Compuesto	F_D^{app} pD=5.5	F_D pD=10.5	F_D pD=12.6
pterina	0.18±0.02	0.30±0.02	0.08±0.02
6-carboxipterina	0.27±0.03	0.37±0.02	0.09±0.02
6-formilpterina	0.45±0.05	0.47±0.2	0.26±0.02
ácido fólico	≤0.02	≤0.02	<0.02
biopterina	0.34±0.01	0.40±0.03	0.08±0.02
neopterina	0.23±0.01	0.34±0.04	0.08±0.02

Tabla 11.2: Rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 a diferentes pH.

Una de las observaciones más notables que surge de analizar la Tabla 11.2 se refiere a la gran diferencia en los valores de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete del ácido fólico y el resto de las pterinas. Similarmente se encontró la misma diferencia al analizar el conjunto de rendimientos cuánticos de fluorescencia en el *Capítulo 9*: el ácido fólico presenta valores de rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menores que el resto de los compuestos estudiados. En dicho Capítulo se mencionaron varias hipótesis que podían justificar tales diferencias. Una de ellas planteaba un más eficiente cruzamiento intersistemas para el ácido fólico respecto de las otras pterinas. Si este fuera el caso, se debería esperar un mayor rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete debido a una mayor proporción de estados tripletes, excepto que dichos estados tripletes no puedan transferir su energía al oxígeno por razones energéticas. La segunda hipótesis planteada en el *Capítulo 9* parece tener mayor sentido considerando los resultados que se presentan en este Capítulo: si el estado singlete excitado se desactiva rápidamente al estado singlete basal por una vía

no radiativa tanto el rendimiento cuántico de fluorescencia como el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete deberían ser muy bajos.

Asumiendo esta hipótesis, la pregunta que surge inmediatamente se refiere a por qué el ácido fólico presenta tal vía de desactivación no radiativa y el resto de las pterinas no. Puede arriesgarse una explicación para esta cuestión comparando la estructura molecular del ácido fólico con la de los demás compuestos estudiados. El sustituyente de la posición 6 del ácido fólico es mucho más grande que los demás y presenta muchas posibilidades de movimiento. Esta característica podría introducir a los estados electrónicos gran cantidad de estados vibrorrotacionales, lo cual podría favorecer la desactivación por procesos no radiativos.

Puede observarse en la Tabla 11.2 que la capacidad de producción oxígeno singlete de cada pterina tiene diferencias con el pD. Las formas alcalinas tienen mayores rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete que las correspondientes formas ácidas, excepto para el ácido fólico que posee valores tan bajos que resultan imposibles de comparar. En realidad, dentro del error experimental, la 6-formilpterina posee valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete equivalentes, para ambas formas ácido-base. Para los cuatro compuestos restantes es interesante analizar este punto teniendo en cuenta los resultados de fluorescencia presentados en el *Capítulo 9*. En dicho Capítulo se mostró que los valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia de las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas, mientras que las constantes de velocidad intrínseca (k_F^0) son equivalentes, considerando el error experimental. Se sugirió, entonces, que en las formas alcalinas debe ser más eficiente la desactivación de los estados excitados singletes (S_1) por otra u otras vías diferentes a la emisión fluorescente. El análisis de los valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete obtenidos permite sugerir que en las formas alcalinas el cruzamiento intersistemas podría ser mayor que en las ácidas, justificando de esta forma, mayores rendimientos cuánticos de producción de

oxígeno singlete en las formas alcalinas y mayores rendimientos cuánticos de fluorescencia en las formas ácidas.

Se investigó la producción de oxígeno singlete en soluciones fuertemente alcalinas. Para ello se determinaron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete de los seis compuestos estudiados a un valor de pD igual a 12.6 en soluciones aireadas. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 11.2. Puede apreciarse claramente que los valores obtenidos en estas condiciones son notablemente menores que los obtenidos a pD = 10.5. Una vez más resulta interesante relacionar estos resultados con el estudio de la fluorescencia de las pterinas. En el *Capítulo 9* se mostró que a pH superiores a 11, la fluorescencia de las pterinas por excitación a 350 nm se desactiva muy eficientemente por iones hidroxilo (HO⁻) y que este *quenching* es un proceso dinámico. Puede deducirse, entonces, que la desactivación del estado excitado singlete (S₁) por hidroxilo reduce la eficiencia del cruzamiento intersistemas (Φ_{ISC}) y, consecuentemente, el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.

Con el fin de evaluar el comportamiento global del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete con el pD, para algunos compuestos se realizaron más determinaciones a diferentes valores de pD. La Figura 11.4 muestra la variación de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete para pterina y 6-carboxipterina como función del pD en el rango 4 – 13. Para ambos compuestos el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete muestra una pequeña variación dentro del error experimental en el rango 4 a 6.5 y 9 a 11, donde una sólo forma ácido base está presente. Entre estas zonas aparece un rango de pD en el cual se observa una fuerte variación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete. Este rango coincide con la zona en la cual coexisten ambas formas ácido-base. A valores de pD mayores de 11 se observa un rápido descenso del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete al aumentar el pD.

Se realizaron también algunas determinaciones de rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete en soluciones saturadas con oxígeno. Para ello se burbujearon con oxígeno las soluciones a analizar durante 15 minutos, previamente a las medidas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.3.

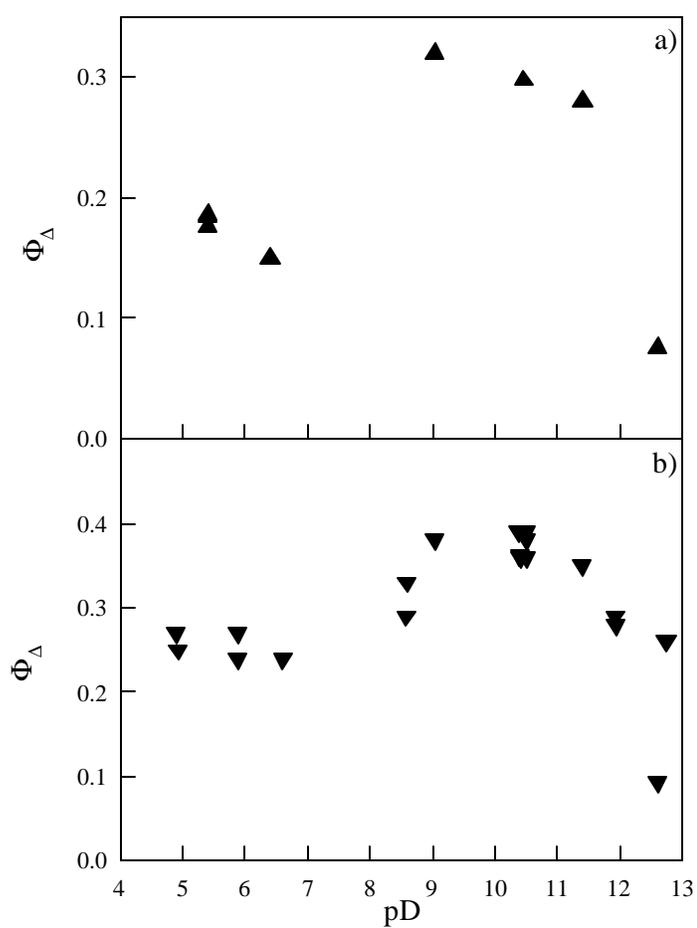


Figura 11.4: Variación de los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (F_D) como función del pD; a) pterina b) 6-carboxypterina ($\lambda_{\text{exc}}=367$ nm).

Comparando los dos conjuntos de datos, puede apreciarse que el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete, en las condiciones experimentales empleadas, es independiente de la concentración de oxígeno para todos los casos analizados. Esto sugiere que los estados excitados tripletes son desactivados completamente por el oxígeno, aún a la concentración correspondiente a soluciones aireadas. Por consiguiente podría considerarse que los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete obtenidos son una buena aproximación a los valores correspondientes a los rendimientos cuánticos de cruzamiento intersistemas (Φ_{ISC}).

	F_D (pD = 5.5)	F_D (pD =10.5)
pterina	0.18±0.02	0.28±0.02
6-formilpterina	0.52±0.02	0.44±0.02
biopterina	0.33±0.02	---
neopterina	0.21±0.02	---

Tabla 11.3: Rendimientos cuánticos de producción de ¹O₂ en soluciones saturadas con oxígeno.