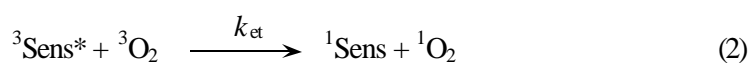
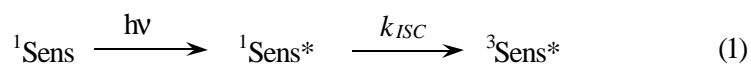


OXÍGENO SINGLETE

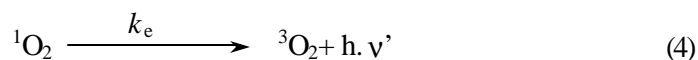
Como se detalló en el *Capítulo 3*, el oxígeno singlete es un estado electrónicamente excitado del oxígeno y es un agente fuertemente oxidante. La generación fotoquímica de esta especie consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente sensibilizador, al oxígeno [Foote, 1991]. Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el oxígeno queda en su estado excitado singlete. Como parte de este trabajo se investigó la capacidad de las pterinas excitadas para generar oxígeno singlete.

Aunque anteriormente ya se explicó la generación fotosensibilizada de oxígeno singlete, se plantea nuevamente en el presente Capítulo a fines de describir el método experimental utilizado para la determinación de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}).

El posible sensibilizador ($^1\text{Sens}$) es, en este caso, una molécula de pterina. Éste absorbe luz UV-A y se genera un estado excitado singlete ($^1\text{Sens}^*$), el cual, mediante un cruzamiento intersistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete ($^3\text{Sens}^*$) de mayor tiempo de vida (Ecuación 1). Este estado triplete del sensibilizador es el que tiene la capacidad de transferir su energía hacia el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) disuelto en el medio (Ecuación 2).



La desactivación del oxígeno singlete puede ocurrir en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz) (Ecuaciones 3 y 4). En presencia de otra sustancia capaz de actuar como *quencher* (Q), deben considerarse el *quenching* químico o físico (Ecuaciones 5 y 6). Cabe aclarar que el rendimiento cuántico de fosforescencia es casi siempre despreciable respecto al rendimiento cuántico de desactivación por el solvente.



Método de detección de oxígeno singlete.

El fundamento de la técnica empleada consiste en la medida de la luminiscencia del oxígeno singlete a 1270 nm, producido durante la irradiación continua de una solución de la sustancia que se quiere investigar [Krasnovsky, 1979; Kahn, 1980].

Como se describió anteriormente, el reemplazo del agua común por agua deuterada, o agua pesada (D₂O), disminuye la velocidad de desactivación del estado singlete aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. El resultado es un tiempo de vida mucho mayor en D₂O que en H₂O (de 3 a 4 ns en H₂O a 62 ns en D₂O [Foote y Clennan, 1995; Martínez *et al*, 2000]). Los estudios se realizan en soluciones preparadas en agua deuterada, D₂O (Euriso-top, CAE, Saclay, France de 99.9 % de pureza isotópica), como solvente, en el cual se obtienen señales mayores que usando agua común, aumentando así la sensibilidad del método significativamente [Hurst y Schuster, 1983; Schmidt, 1989; Rodgers, 1983].

El pD ($-\log [D^+]$) fue medido con un pH-meter Schott CG 843P en combinación con un electrodo Blue Line 0.14 pH (Schott). Los valores de pD se calcularon aplicando la siguiente corrección a cada medida:

$$pD = pH + 0,4$$

donde pH es el valor leído en el pH-meter [Salomaa *et al*, 1964]. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes (microlitros), con micropipeta, de soluciones concentradas de hidróxido de sodio deuterado, NaOD (CEA) y de ácido clorhídrico deuterado, DCI (Aldrich, 99.5%). Las soluciones a estudiar se prepararon de modo tal que la absorbancia a la longitud de onda de excitación fue siempre mayor a 0.6.

El equipo cuenta con una lámpara de excitación Xe/Hg Osram de 1kW. El haz de luz pasa a través de un filtro de agua y un monocromador ISA Jobin-Yvon B204, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. La mencionada celda, de 1x1 cm, es de cuarzo y puede contener aproximadamente 3,5 ml de solución.

La luz emitida es colectada por un espejo. El haz pasa primero a través de un chopper calibrado a 11 Hz; luego pasa por un filtro tipo cut-off de 1000 nm y por un filtro de interferencia de 1271 nm, para incidir, finalmente, en un fotodiodo de Germanio ubicado en ángulo recto respecto al haz incidente. Este dispositivo de detección trabaja a -78 °C, por consiguiente, consta de un sistema de refrigeración que emplea una mezcla de CO₂ sólido y alcohol isopropílico para alcanzar dicha temperatura. El detector de Germanio está conectado a dos amplificadores (lock-in) los cuales envían, cada uno, una señal a un registrador Y-t y a un osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz.

La longitud de onda de excitación se elige teniendo en cuenta los máximos de absorción de los sensibilizadores a estudiar y el espectro de emisión de la lámpara de excitación. Para las pterinas se utilizó, en todos los casos, luz de longitud de onda de 367 nm. La potencia de la luz incidente (F_0 , mW) se midió por medio de una termopila (Laser instrumentation, model 154).

Todas las medidas realizadas en el equipo de detección de oxígeno singlete utilizado en el presente trabajo se realizaron en el *Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe*, en el marco de un convenio de colaboración entre dicho Instituto y nuestros laboratorios (SECyT-BMFB).

Cada medida se realizó registrando, primero, una línea de base sin irradiación, luego se iluminó la muestra y, por último, se realizó nuevamente una línea de base sin irradiación. Sistemáticamente se registraron señales durante nueve minutos totales repartidos en tres minutos para cada una de las tres etapas de la medida: se controla la línea de base tres minutos, se irradia durante tres minutos y se vuelve a controlar la línea de base tres minutos más. Además se tomaron los espectros de absorción antes y después de la irradiación en un espectrofotómetro Cary 5 (Varian). Este control se realizó para determinar si durante la iluminación de la muestra se producía transformación química de la misma. Cada señal es amplificada y registrada. Se obtienen dos registros de cada señal, debido a que, como se mencionó anteriormente, el equipo cuenta con dos amplificadores (Figura 7.1, corresponde a dos registros, rojo y azul, de la misma señal).

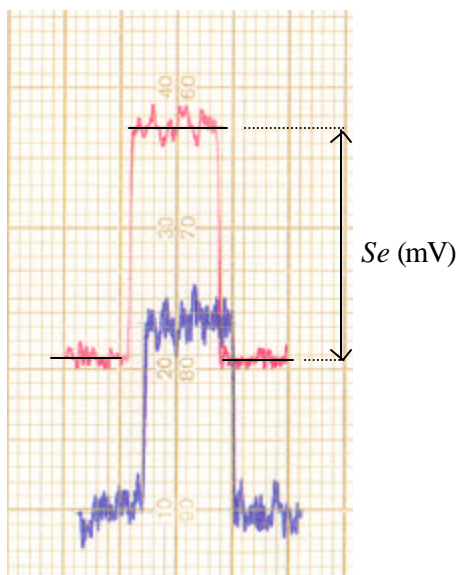


Figura 7.1: Registros de una señal de oxígeno singlete.

Dado un conjunto de condiciones experimentales (longitud de onda de excitación, absorbancia de la solución a analizar a dicha longitud de onda, solvente, etc.) la diferencia entre el voltaje proveniente del detector, en presencia y ausencia de luz, es proporcional a la concentración de estado estacionario de oxígeno singlete presente en la solución durante la irradiación. La obtención de este parámetro, que en adelante se llamará señal (Se) se muestra esquemáticamente en la Figura 7.1.

La magnitud de esta diferencia se compara con la correspondiente a una referencia para determinar el *rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete* (Φ_{Δ}) de una sustancia a un determinado pD.

Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.

El *rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete* (Φ_{Δ}) puede definirse como la fracción de moléculas de oxígeno singlete producidas por cada cuanto de luz absorbido por el sensibilizador.

Bajo condiciones de irradiación continua y teniendo en cuenta las ecuaciones 1 a 6 planteadas anteriormente puede escribirse la siguiente expresión para la concentración de estado estacionario de oxígeno singlete:

$$[{}^1\text{O}_2] = \frac{\Phi_{\Delta} \cdot I_A}{k_d + (k_q + k_r) [\text{Sens}]} \quad (7)$$

donde $\Phi_{\Delta} \cdot I_A$ (I_A es la luz absorbida por el sensibilizador) es la velocidad de generación de oxígeno singlete (Ecuaciones 1 y 2) y k_e fue despreciada por ser mucho menor que k_d . Por otra parte, en esta expresión se considera una posible desactivación del oxígeno singlete por interacción con el propio sensibilizador. Por lo tanto, Q de las Ecuaciones 4 y 5 se reemplazó por Sens .

Como ya se dijo, la señal obtenida para cada sustancia es proporcional a la cantidad de oxígeno singlete que se genera. Esta señal está relacionada con las

características del equipo, el sensibilizador y el medio acorde a la siguiente ecuación:

$$Se = C k_e (1/n^2) [^1O_2] = C k_e (1/n^2) P_o (1-10^{-A}) \Phi_{\Delta}^S \frac{1}{k_d + (k_q + k_r) [\text{Sens}]}$$

donde C es un factor de proporcionalidad que incluye la geometría y factores electrónicos del sistema de detección; P_o es la tasa de fotones incidentes; A la absorbancia del sensibilizador a la longitud de onda de excitación (así el producto $P_o (1-10^{-A})$ representa la tasa de fotones absorbidos por el sensibilizador, es decir I_A); Φ_{Δ}^S es el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por el sensibilizador; k_e es la constante de desactivación radiativa del oxígeno singlete; $(1/k_d)$ el tiempo de vida del oxígeno singlete y n el índice de refracción del medio.

Se utilizaron como referencias sustancias con rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete conocidos (Φ_{Δ}^R). Se prepararon soluciones de las referencias en agua deuterada (D_2O), con una absorbancia y un pD iguales a los de la solución de la sustancia cuyo rendimiento cuántico (Φ_{Δ}^S) se quiere determinar. De acuerdo al pD se utilizaron dos referencias diferentes: para el medio alcalino se eligió rosa de bengala, y para medio ácido fenalenona. La longitud de onda de excitación fue 367 nm para todas las pterinas y la fenalenona ($\Phi_{\Delta}^R = 0.975$, en D_2O) [Oliveros *et al*, 1991]. Para el rosa de bengala se irradió a 547 nm ($\Phi_{\Delta}^R = 0.76$ en D_2O) [Murasecco-Suardi *et al*, 1987; Neckers, 1989]. Los valores de absorbancia se fijaron entre 0.6 y 1.6. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorescencia de 1 cm por 1 cm.

Si las señales luminosas son monitoreadas usando soluciones ópticamente comparables de la muestra y la referencia, la relación entre las señales de la emisión fosforescente del oxígeno singlete de la muestra (Se^S) y la referencia (Se^R) es proporcional a la relación entre los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete. Entonces el cociente entre la magnitud de ambas señales estará dado por la Ecuación (8):

$$\frac{Se^S}{Se^R} = \frac{\Phi_{\Delta}^S}{\Phi_{\Delta}^R} \frac{k_d}{k_d + k_T^S [\text{Sens}]} \frac{P_0^S (1 - 10^{-A_S})}{P_0^R (1 - 10^{-A_R})} \quad (8)$$

donde el superíndice ^S se refiere al sensibilizador en estudio y el superíndice ^R se refiere a la referencia; k_T^S es la constante bimolecular de quenching total de oxígeno singlete por el sensibilizador ($k_T^S = k_q^S + k_r^S$). La desactivación del oxígeno singlete por la referencia no fue considerada porque para las dos referencias utilizadas este fenómeno es despreciable. Los términos k_e , n y C se mantienen constantes en ambas medidas y por lo tanto se anulan al formular el cociente.

Debido a la diferencia entre la intensidad de la luz incidente (P_0) a las longitudes de onda de excitación de la muestra y la referencia (I^S y I^R), a causa del espectro de emisión de la lámpara, es necesario introducir el factor de corrección P_0^S / P_0^R . Este factor pueden escribirse como $F_0^S \cdot I^S / P_0^R \cdot I^R$. La potencia de la luz incidente, F_0 , se mide con una termopila Laser Instrumentation modelo 154. El otro factor que está presente en la ecuación (8), $[(1 - 10^{-A_S}) / (1 - 10^{-A_R})]$, se origina en la diferente cantidad de fotones absorbidos por la muestra y por la referencia. Sin embargo, como se trabajó en condiciones tales que la absorbancia de ambas soluciones fue igual para cada experimento, este factor puede eliminarse.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y despejando Φ_{Δ}^S de la Ecuación (8), se obtiene

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \frac{F_0^R \cdot I^R}{F_0^X \cdot I^X} \frac{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])}{k_d} \quad (9)$$

En aquellos casos en los cuales la referencia y la muestra se excitan a la misma longitud de onda, la Ecuación (9) se reduce a:

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \frac{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])}{k_d} \quad (10)$$

En el presente trabajo de tesis, como ya se mencionó, se utilizaron dos referencias según el pD. En las medidas realizadas en medio ácido se empleó fenalenona como referencia y, en este caso, la muestra y la referencia se excitaron a 367 nm. Para los cálculos se empleó la Ecuación (10). En medio alcalino, en cambio, se utilizó rosa de bengala como referencia, y, en este caso, la referencia se excitó a 547 nm (debido a que a 367 nm su coeficiente de extinción molar es muy bajo) y la muestra a 367 nm. Por esta razón, no puede eliminarse el factor que corrige la diferencia de intensidad a diferentes longitudes de onda, entonces se utilizó la Ecuación (9).

Esta claro, que para calcular los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}^S) es necesario conocer la constante bimolecular de quenching total de oxígeno singlete (k_T^S). De lo contrario, se determina un rendimiento cuántico aparente (Φ_{Δ}^{ap}) dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \cdot \frac{F_0^R \cdot I^R}{F_0^X \cdot I^X} \quad (11)$$

donde:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^S \cdot \frac{k_d}{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])}$$

Determinación de la constante de velocidad de quenching total de oxígeno singlete.

Las constantes de velocidad de *quenching* total de oxígeno singlete (k_T) se determinaron por análisis de Stern-Volmer del *quenching* de oxígeno singlete [Tournaire *et al*, 1993]. Se utilizó el mismo equipo y las mismas condiciones que para las medidas de producción de oxígeno singlete. El oxígeno singlete fue generado por fotosensibilización, utilizando rosa de bengala (RB) como

sensibilizador. Se irradió con luz de excitación de 547 nm, donde las pterinas no absorben. Se mantuvo constante la concentración de rosa de bengala y se varió la concentración de pterinas. La concentración de rosa de bengala fue tal que el *quenching* de oxígeno singlete por ella misma es despreciable comparado con la desactivación por el solvente.

Se realizó un análisis de Stern-Volmer, en una gráfica de la relación entre las señales en ausencia (S_e^0) y en presencia (S_e) de *quencher* versus la concentración del mismo, de acuerdo a la ecuación:

$$S_e^0 / (S_e) = \Phi_e^0 / \Phi_e = 1 + k_T \tau_\Delta [Q] \quad (12)$$

En el presente trabajo los *quenchers* utilizados fueron pterina, 6-carboxipterina, 6-formilpterina, neopterina, biopterina y ácido fólico.