



Universidad de Chile.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica.
Laboratorio de Cinética y Fotoquímica.

**Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete
y flavonoides. Efecto del medio.**

Memoria para optar al título de Química.

Catalina Paz Sandoval Altamirano.

**Patrocinador de Memoria
Else Lemp Miranda.**

**Director de Memoria
Else Lemp Miranda.**

Santiago- Chile

2012

*"Hay que hacer de la vida un sueño
y del sueño una realidad"*

Pierre Curie.

A mis padres, Patricio y Mónica

Agradecimientos

A la Profe Else, por todas las enseñanzas entregadas en estos años.

Al Profe Antonio, por introducirme al mundo de la fotoquímica y por la ayuda otorgada.

A los integrantes del laboratorio de Cinética y Fotoquímica, por hacer ameno el trabajo; Silvana, Pablito, Renzo, Kenna, Profe Julio y Christian.

Al Profe Germán, por las conversaciones y consejos. A Javier, por hacer siempre ameno un momento desagradable, con su humor diferente.

A mis compañeros de generación; Jesús, Silvana, Nato, Nico Luis, Vivi y Pedro. Por los gratos momentos compartidos en las banquitas.

A Pato, Monito, Kenna y Pame, por aguantar mis tonteras y por su compañía.

A Ricardo, por ser tan especial, por estar ahí en un periodo importante de mi vida.

A mis compañeros de viernes, sábados y tardes; Kary, Perrin, Gonzalo, Naty, Yasser, Alejandro, Pablito, Renzo, Pancha y Pelao por ser más que compañeros de parranda.

Por último, agradecer a mi familia, especialmente a mis padres por su esfuerzo y dedicación, por ser siempre mi pilar, por construir una familia gigante que me apoyó en cada decisión que tomé. A mis hermanas; Maca, Moni y Pola por aguantar los altibajos de esta etapa y por ser compañeras de vida. A Cristian, mi cómplice, quien llegó al final de este proceso y quizás el más difícil, por aguantar todas las reacciones producto de esta tesis.

Índice

Índice.....	ii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabla.....	vii
Abreviaciones.....	viii
Resumen.....	ix
Summary.....	xi
1. Introducción.....	1
1.1. Oxígeno molecular singulete.....	2
1.2. Flavonoides.....	9
1.2.1. Actividad antioxidante.....	13
1.2.2. Capacidad quelante de flavonoides.....	14
1.2.3. Actividad pro-oxidante.....	15
1.2.4. Reacción de flavonoles con oxígeno molecular singulete.....	16
1.3. Relaciones lineales de energía libre de solvatación.....	18
1.4. Objetivo.....	20
2. Materiales.....	21
3. Instrumentación.....	22
3.1. Espectroscopia de absorción UV-vis.....	22
3.2. Detección de la luminiscencia infrarroja del $O_2(^1\Delta_g)$	22
4. Metodología.....	24
4.1. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química entre oxígeno molecular singulete y flavonoles.....	24
4.2. Estudio espectroscópico y reactividad con oxígeno molecular singulete de la reacción entre flavonoles y cationes divalentes.....	25
4.3. Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA.....	26
4.4. Tratamiento estadístico de las constantes de velocidad de reacción química en mezclas acuosas.....	27

5. Resultados y discusión.....	29
5.1. Evaluación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA en mezclas acuosas.....	29
5.2. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química entre flavonoles y $O_2(^1\Delta_g)$ en mezclas acuosas (k_r).....	32
5.3. Efecto de la presencia de iones divalentes. Cambio en la reactividad de los flavonoles con $O_2(^1\Delta_g)$	39
5.3.1. Estudio espectroscópico de la interacción de flavonoles con iones divalente.....	39
5.3.2. Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete con flavonoles en presencia de iones divalente.....	49
6. Conclusiones.....	59
7. Bibliografía.....	61

Índice de Figuras

Figura 1	Curva de energía potencial de los estados electrónicos del oxígeno molecular.	2
Figura 2	Representación del último nivel ocupado de los estados singletes y triplete del oxígeno molecular.	3
Figura 3	Esquema de oxidación fotosensibilizada Tipo I y Tipo II.	5
Figura 4	Esquema de absorción de luz de un fotosensibilizador en presencia de oxígeno molecular.	6
Figura 5	Estructura química de la rosa de bengala.	7
Figura 6	Estructura química de los flavonoles estudiados.	10
Figura 7	Estructura química general de flavonoides indicando grupos cromóforos.	12
Figura 8	Espectro de absorción UV-vis de flavonoles en metanol.	12
Figura 9	Mecanismo para la reacción entre flavonol y oxígeno molecular singlete. Los flavonoles corresponden 3-HF (R=H) y Q (R=OH).	17
Figura 10	Mecanismo propuesto para la reacción entre 3-HF y oxígeno molecular singlete.	18
Figura 11	Sistema de fotólisis de pulso para la detección de la emisión infrarroja del oxígeno molecular singlete.	23
Figura 12	Gráfico de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA en mezclas acuosas de metanol.	30
Figura 13	Relación lineal entre logaritmo de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA y el parámetro π^*	31
Figura 14	(A) Variación en la absorción durante el tiempo de fotólisis estacionaria de quercitina en presencia de rosa de bengala como sensibilizador, en metanol como solvente. (B) Tratamiento cinético de pseudo primer orden del consumo de quercitina en el tiempo.	33

Figura 15	Relación de la constante de velocidad de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y flavonoles con el porcentaje de agua en metanol pH 5,1.	36
Figura 16	Gráfico de la constante de velocidad de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y flavonoles, 3-HF y Quer, versus el porcentaje de agua en metanol a pH=7,8	36
Figura 17	Gráfico de la constante de velocidad de reacción química del $^1\text{O}_2$ con flavonol, versus porcentaje de agua a diferentes pH en metanol.	37
Figura 18	Espectro de absorción UV-vis de Quer a diferente razones molares [Cu]/[Quer], en metanol.	39
Figura 19	Determinación de la relación estequiométrica de la reacción entre Quer y Cu en metanol, absorbancia medida a 438nm.....	40
Figura 20	Estabilidad del aducto Quer-Cu en metanol a diferentes razones molares. (A) [Cu]/[Quer]=2,0. (B) [Cu]/[Quer]=1,0. (C)[Cu]/[Quer]=0,5.	41
Figura 21	Espectro de absorción de la Quer en presencia de Mg utilizando diferente razones molares en metanol.	42
Figura 22	Estabilidad del aducto Q-Mg en el tiempo para dos razones molares en metanol.	43
Figura 23	Espectro de absorción de la Quer en ausencia y presencia de Ca utilizando diferente razones molares en metanol.	44
Figura 24	Estabilidad del aducto Quer-Ca en el tiempo para diferentes razones [Ca]/[Quer] en metanol.	44
Figura 25	Espectro de absorción de la 3-HF en ausencia y presencia de Mg a diferente razones molares en metanol.	46
Figura 26	Estabilidad del aducto 3-HF-Mg en el tiempo para dos razones molares en metanol.....	46
Figura 27	Espectro de absorción de la 3-HF en ausencia y presencia de Ca utilizando diferente razones molares en metanol.	47
Figura 28	Estabilidad del aducto 3-HF-Ca en el tiempo para diferentes razones [Ca]/[3-HF] en metanol.....	48

Figura 29	Disminución de la absorción durante la foto-oxidación de Quer en presencia de Cu(II). Sens: RB, solvente: metanol, [Cu]/[Quer]=0,5.	50
Figura 30	Ajuste para tratamiento de pseudo-primer orden para la foto-oxidación de Quer en presencia de Cu(II), en metanol.	51
Figura 31	Representación del ajuste de un polinomio de grado dos y de su pendiente inicial para la reacción de Quer con oxígeno molecular singulete a diferentes concentraciones de Mg.	52
Figura 32	Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de Quer con $^1\text{O}_2$ en presencia de Ca(II) a diferentes razones molares [Ca]/[Quer].	54
Figura 33	Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de 3-HF con $^1\text{O}_2$ en presencia de Mg(II) a diferentes razones molares [Ca]/[3-HF].	56
Figura 34	Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de 3-HF con $^1\text{O}_2$ en presencia de Ca(II) a distintas razones molares [Ca]/[3-HF].	57

Índice de Tabla

Tabla 1	pK _a de los diferentes sustituyentes hidroxilos para los flavonoles a estudiar	11
Tabla 2	Valores de los coeficientes de las ecuaciones de correlación, LSER, para las diferentes mezclas acuosas metanol-agua.....	28
Tabla 3	Constante de velocidad de desactivación total de O ₂ (¹ Δ _g) por 9,10-DMA en mezclas acuosas de MeOH.....	29
Tabla 4	Valores de constante de velocidad de reacción química entre O ₂ (¹ Δ _g) y flavonoles, k _r ^{Fla} , en metanol.....	33
Tabla 5	Valores de constante de reacción química entre O ₂ (¹ Δ _g) y flavonol, k _r ^F , en mezclas acuosas de metanol en tampón acetato pH=5,1.....	35
Tabla 6	Valores de constante de reacción química entre O ₂ (¹ Δ _g) y flavonoles (Quer y 3-HF), k _r ^{Fla} , flavonoles en mezclas acuosas metanol-buffer Tris 7,8.....	37
Tabla 7	Constante de velocidad de reacción química para Quer y Quer-Cu, a dos longitudes de onda, en metanol y para una relación molar [Cu]/[Quer]=0,5.	51
Tabla 8	Dependencia de la constante de velocidad de la reacción entre O ₂ (¹ Δ _g) y Quer con la concentración de Mg presente en el medio.	53
Tabla 9	Dependencia de la constante de velocidad de reacción con la concentración de Ca presente en el medio para la reacción de Quer con ¹ O ₂	54
Tabla 10	Dependencia de la constante de velocidad de reacción con la concentración de Mg presente en el medio para la reacción de 3-HF con ¹ O ₂	55
Tabla 11	Dependencia de la constante de velocidad de reacción química para la 3-HF con ¹ O ₂ dependiente de la concentración de Ca presente en el medio.	57

Abreviaciones

k_r^{Fla} : contante de velocidad de reacción química para los diferentes flavonoles con oxígeno molecular singulete.

Flav: flavonoles.

3-HF: 3-hidroxi flavona.

Quer: Quercitina.

Miric: Miricetina.

Kaemp: Kaempferol.

Fise: Fisetina.

9,10-DMA: 9,10-Dimetilantraceno

Resumen

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen vegetal, que han despertado gran interés debido a sus efectos potencialmente benéficos para la salud humana, por ejemplo, se ha reportado que tienen actividad antiviral, anti-alérgica, anti-inflamatoria, antitumoral y antioxidante. Los flavonoides se pueden clasificar en seis clases, según los grupos funcionales que posean. Una de estas clases corresponde a los flavonoles que poseen dos anillos aromáticos ligados mediante un anillo pirano, sustituidos por un grupo carbonilo y uno o más grupos hidroxilos, la 3-Hidroxiavona (3-HF) es la estructura base de los flavonoles.

En esta memoria se evaluó la capacidad antioxidante de cinco flavonoles, mediante su reactividad frente al oxígeno molecular singulete, a través de la determinación de la constante de velocidad de reacción química. Se determinó además, la influencia de la cantidad relativa de agua en la mezcla metanólica, el pH del medio y la presencia de cationes divalentes, sobre la constante de velocidad de reacción química de flavonoles con oxígeno molecular singulete.

La reactividad entre el flavonol (3-HF, Kaemp, Miric, Quer, Fise) y oxígeno molecular singulete es dependiente de la sustitución de los anillos aromáticos, especialmente de la sustitución que posee el anillo B de la molécula. Se observó que la constante de velocidad de reacción entre los flavonoles, Quer y 3-HF, y oxígeno molecular singulete, es fuertemente influenciada por el pH del medio debido a la desprotonación de los grupos hidroxilos presentes en la molécula. Además se determinó que la constante de velocidad de reacción química aumenta con el incremento en la cantidad de agua en el medio.

Por otra parte, la reactividad de los flavonoles, Quer y 3-HF, con oxígeno molecular singulete es modificada en presencia de cationes divalentes. El aducto formado entre el flavonol y catión presenta una mayor reactividad que el flavonol libre. El tipo de catión y su tamaño, influenciaría directamente en el tipo

de complejo formado, evidenciándose en los cambios en los espectros de absorción y posteriormente en los cambios de reactividad del flavonol frente al oxígeno molecular singulete.

Summary

Study of the reactivity of singlet molecular oxygen with flavonoids. Effect of the medium.

Flavonoids are polyphenolic compounds of vegetal origin. In the last years, they have generated great interest because of their potentially beneficial action for human health (flavonoids have antiviral, anti-allergic, anti-inflammatory, antitumor and antioxidant activities). Flavonoids can be classified in six different classes, according to the functional groups present in the molecular structure. One of these families is the flavonols family, which have two aromatic rings linked by a pyran ring with a hydroxyl group and a carbonyl group in the positions 3 and 4 respectively. 3-Hydroxyflavone (3-HF) corresponds to the basic structure of the flavonols family.

In this thesis, we evaluated the antioxidant capacity of five flavonols, determining their chemical reactivity with singlet molecular oxygen, by measuring their chemical reaction rate constants. The influence on the chemical reaction rate constant of the medium (by varying the proportion of water in methanol-water mixtures), of pH and of the presence of divalent cations was also studied.

Our results show that the reactivity between the flavonol (3-Hydroxyflavone, Kaempferol, Miricetin, Quercetin, Fisetin) and singlet molecular oxygen is dependent on the substitution of the aromatic rings, particularly when substitution on ring B is present. The reaction rate constant between the flavonols, 3-HF or Quer, and singlet molecular oxygen was observed to be strongly influenced by the pH of the medium. Deprotonation of hydroxyl substituents in the molecule increases the reactivity. We also found that the chemical reaction rate constant increases with increasing the water proportion in the solvent. Additionally, the reactivity of flavonols (3-HF and Quer) with singlet molecular oxygen is modified in the presence of divalent cations. The association

compound formed between the flavonol and the cation shows a greater reactivity than the free flavonol. Properties of the association complex depend directly on the type of cation and its radius.

1. Introducción

El oxígeno molecular, O_2 , es indispensable para muchos procesos que ocurren sobre la tierra. Su presencia es clave tanto en la mantención, como en los mecanismos por los cuales la vida se extingue y la materia se destruye¹. Por ejemplo, el oxígeno es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria en organismos aerobios. Aunque, es indispensable para estos organismos, altas concentraciones o bajo ciertas condiciones puede llegar a ser tóxico.

El término especies reactivas de oxígeno (ROS) es utilizado para describir especies que son más reactivas que el oxígeno molecular. Algunas veces, se refieren también a AOS (especies de oxígeno activas) y ROI (intermediarios reactivos de oxígeno) y corresponden a especies moleculares en forma reducida del oxígeno. En esta clasificación se encuentran moléculas como anión superóxido O_2^- , radical perhidroxilo HO_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidroxilo OH^\cdot y oxígeno singulete 1O_2 . Todas estas moléculas son tóxicas, y el grado de destrucción dependerá de su reactividad. En organismos vivos, altas concentraciones pueden resultar en una oxidación no controlada de diversas estructuras celulares, incluyendo DNA, proteínas y membranas lipídicas, originando la destrucción de la estructura celular. Para contrarrestar los efectos de la presencia de ROS en los organismos vivos existen moléculas antioxidantes, capaces de retardar o prevenir la oxidación. Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su solubilidad en agua (hidrofílicos) o en el medio lipídico (hidrofóbicos).

1.1. Oxígeno molecular singulete

El oxígeno molecular singulete se descubrió en el año 1924, no obstante, el interés en esta especie comenzó después de 1963 cuando Khan y Kasha concluyeron que la quimioluminiscencia roja observada de la reacción de hipoclorito-oxígeno correspondía a la generación de oxígeno molecular singulete².

El oxígeno molecular singulete $O_2 (^1\Delta_g)$ es el estado excitado de menor energía del oxígeno molecular, es una especie electrofílica sumamente reactiva. Los electrones desapareados del oxígeno molecular presentan la posibilidad de distribuirse dando lugar a cuatro configuraciones electrónicas: un triplete ($^3\Sigma_g^-$) estado de máxima multiplicidad y menor energía que corresponde al estado basal, dos estados singuletes ($^1\Delta_x$ y $^1\Delta_y$) que poseen la misma energía y que en conjunto se denominan $^1\Delta_g$, y por último un estado singulete $^1\Sigma_g^+$ que es el de mayor energía. En el gráfico de la Figura 1, se muestran los niveles energéticos de los estados singuletes y triplete del oxígeno molecular singulete.

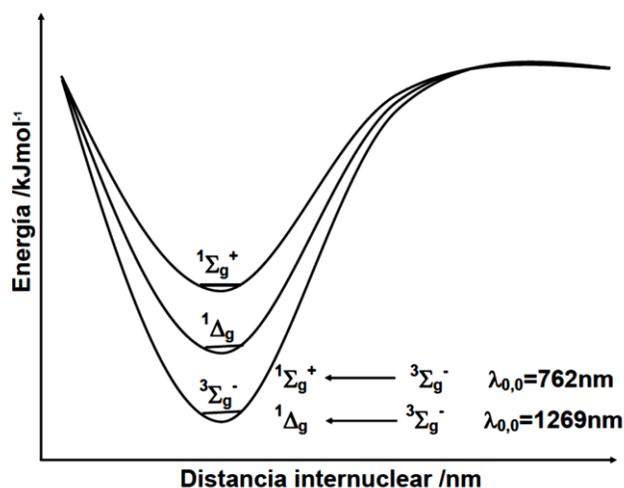


Figura 1.- Curva de energía potencial de los estados electrónicos del oxígeno molecular.

Los estados Σ basal y excitado, tienen momento angular cero y presentan simetría cilíndrica respecto al eje molecular. Al presentar distribuciones electrónicas análogas, en la aproximación de orden cero la reactividad del oxígeno en estos dos estados será de carácter dirradicálico y muy similar, en procesos independientes de la naturaleza del espín y sin considerar el exceso de energía de la especie excitada. Cuando el oxígeno se encuentra en el primer estado singulete sus electrones se encuentran apareados, como se muestra en la Figura 2, mostrando carácter diamagnético, por esta razón la reactividad del oxígeno molecular singulete será muy diferente a la del oxígeno en estado basal.

State	Orbital Assignment	
$^1\Sigma_g^+$	\uparrow_{π}	\downarrow_{π}
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow_{\pi}$	\circ_{π}
$^3\Sigma_g^-$	\uparrow_{π}	\uparrow_{π}

Figura 2.- Representación del último nivel ocupado de los estados singuletes y triplete del oxígeno molecular.

Las transiciones entre los diferentes estados electrónicos del oxígeno no son muy probables, dando excelentes ejemplos de reglas de selección basados en cambios de spin y momento orbital angular de simetría y paridad¹. La transición del estado excitado, $^1\Delta_g$, al estado basal, $^3\Sigma_g^-$, es prohibida por espín, así el estado $^1\Delta_g$ posee un tiempo de vida relativamente largo. El segundo estado excitado de mayor energía, $^1\Sigma_g^+$, posee un tiempo de vida corto debido a que las transiciones al estado excitado de menor energía son permitidas por spin. Los tiempos de vida radiativos de los estados $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$ en fases condensadas, se encuentran entre 10^{-6} - 10^{-3} y 10^{-11} - 10^{-9} segundos respectivamente³.

Existen diversos métodos para la generación de oxígeno molecular singlete, los que se pueden clasificar en dos grandes grupos, dependiendo de si la generación ocurre a través de una reacción química o mediante procesos físicos. En el primer caso, se encuentra, por ejemplo, la descomposición de endoperóxidos, en la cual algunos endoperóxidos aromáticos sobre cierta temperatura sufren la extrusión de una molécula de oxígeno en su primer estado singlete excitado.

El método más utilizado en la generación de oxígeno molecular singlete, mediante un proceso físico, es la fotosensibilización. En este proceso un sensibilizador absorbe un fotón de luz de una cierta longitud de onda, generándose su estado singlete excitado, que evoluciona a un estado excitado triplete, de tiempo de vida más largo. El estado triplete puede transferir su energía por intercambio electrónico a una molécula de oxígeno en estado basal, generándose oxígeno molecular singlete y el sensibilizador en estado basal. La evolución del estado singlete excitado del sensibilizador al estado triplete excitado puede ser promovida por oxígeno molecular en estado basal, este proceso generaría oxígeno molecular singlete y sensibilizador excitado en estado triplete, disponible para la transferencia de energía al oxígeno molecular basal, generándose otra molécula de oxígeno molecular singlete.

La generación de especies reactivas de oxígeno utilizando el método de fotosensibilización puede ocurrir a través de dos procesos, Tipo I y Tipo II (Figura 3.). Algunos sensibilizadores pueden generar especies reactivas mediante estos dos procesos, sin embargo, otros sólo generan a través de una de las dos vías. El mecanismo tipo I involucra abstracción de un átomo de hidrógeno o transferencia de electrón entre el estado excitado del sensibilizador y un substrato, produciendo radicales libres. Estos radicales libres pueden reaccionar con oxígeno y formar alguna especie reactiva de oxígeno, por ejemplo, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, radical perhidroxilo, etc. En el

mecanismo tipo II, el oxígeno singulete es generado vía un proceso de transferencia de energía durante la colisión del sensibilizador excitado singulete o triplete con oxígeno triplete basal⁴.

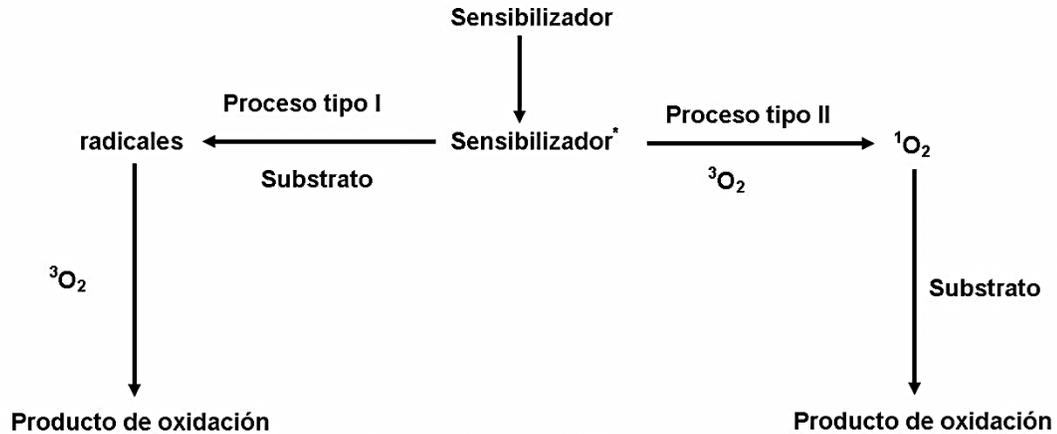
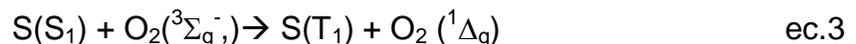
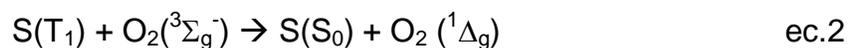


Figura 3.- Esquema de oxidación fotosensibilizada Tipo I y Tipo II.

Los procesos involucrados en la fotosensibilización tipo II se muestran a continuación.



La reacción de la ec.1 corresponde a la excitación del sensibilizador, una molécula orgánica en estado basal, $S(S_0)$, absorbe luz generando un estado excitado singulete $S(S_1)$, el cual, mediante cruce entre sistemas, genera sensibilizador en estado triplete, $S(T_1)$. Desde este estado triplete el sensibilizador tiene la capacidad de transferir su energía al oxígeno molecular en estado basal, generando así oxígeno molecular singulete, ec.2. Algunos sensibilizadores pueden generar oxígeno molecular singulete desde su estado singulete excitado. Los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno

molecular singulete, bajo ciertas condiciones, pueden ser mayor que la unidad debido a que la generación puede ocurrir mediante los estados triplete y singulete excitado del sensibilizador. La generación fotosensibilizada de $O_2 (^1\Delta_g)$ tiene relevancia en áreas de foto-oxidación, terapia fotodinámica (PDT) de cáncer, tratamientos de purificación de agua y ciencia de los polímeros³. En la Figura 4, se presenta un esquema de la generación de los estados excitados del sensibilizador y de las especies reactivas del oxígeno, la línea azul representa absorción de un fotón, la línea roja corresponde a fluorescencia y las líneas verdes involucran reacciones químicas.

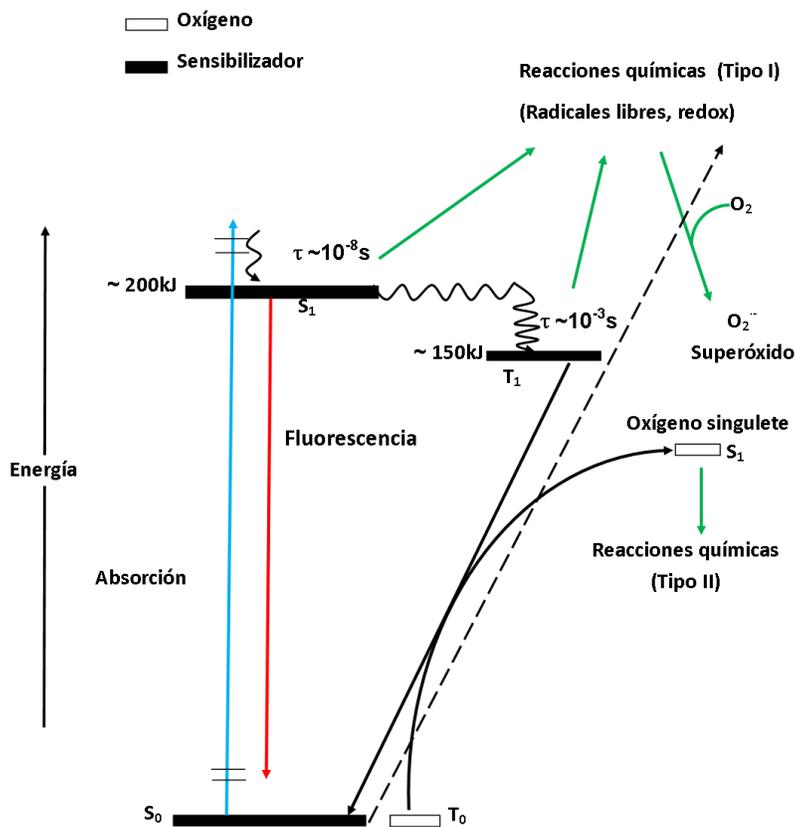


Figura 4.- Esquema de absorción de luz de un fotosensibilizador en presencia de oxígeno molecular.

En este trabajo el sensibilizador utilizado fue rosa de bengala, de la familia de los xantenos. Los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno

molecular singulete son 0,76 en metanol y 0,75 en agua. Su estructura molecular se muestra en la Figura 5.

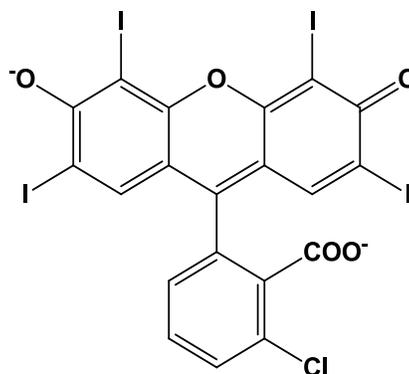


Figura 5.- Estructura química de la rosa de bengala.

Para la elección de un sensibilizador adecuado hay que tener en cuenta los siguientes aspectos; que posea un alto coeficiente de extinción en la longitud de onda de excitación, un elevado rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete, una alta constante de cruce entre sistema y por último, no ser reactivo en el medio de trabajo.

La desactivación del oxígeno molecular singulete puede ocurrir por tres vías:

- a) Desactivación radiativa: $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g) + h\nu_{1270}$, cuya constante de velocidad se denota $k_{\Delta P}$. El valor de esta constante de velocidad es fuertemente influenciada por el medio. En fase condensada es aproximadamente 800 veces mayor que en fase gas, debido a que las interacciones del $O_2(^1\Delta_g)$ con el solvente definen el rendimiento cuántico de fosforescencia⁵.
- b) Desactivación no radiativa por interacción con el solvente: $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$, con una constante de velocidad denotada por $k_{\Delta d}$. El proceso de desactivación

del $O_2(^1\Delta_g)$ involucra la transferencia de energía electrónica a los niveles vibracionales del solvente por medio de un mecanismo dipolo-dipolo⁶. La mayor probabilidad de resonancia ocurre cuando mayor es la energía del modo vibracional de más alta frecuencia del solvente, es decir, cuanto más cercanos se encuentren estos modos vibracionales a la transición vibrónica del $O_2(^1\Delta_g)$. De esta forma, mayor será la probabilidad de la transición y menor será el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$ ⁷. Algunas características del solvente que influyen en el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ son el número de enlaces C-H y O-H, como también la presencia de átomos de halógeno y deuterio⁸.

- c) Desactivación por interacciones con compuestos desactivantes presentes en el medio.

Las reacciones de oxígeno molecular singlete son generalmente procesos no controlados por difusión, y las reacciones en un sistema biológico son determinadas tanto por la concentración estacionaria del $O_2(^1\Delta_g)$ en el sitio de reacción como por el valor de la constante de velocidad de reacción bimolecular⁹.

El oxígeno molecular singlete puede ser desactivado por moléculas orgánicas e inorgánicas, y este proceso de desactivación puede ser físico (constante de velocidad k_q) o químico, que mediante rupturas o generación de enlaces dan origen a nuevos productos (constante de velocidad k_r).



1.2. Flavonoides

Los flavonoides corresponden a una serie de metabolitos secundarios de las plantas, responsables del crecimiento y defensa de estas. Los flavonoides, son constituyentes importantes de la dieta humana, y se encuentran en frutas y vegetales¹⁰.

Se sintetizan en todas las plantas y también en algunas algas, que aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable en función de la especie y en la respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran a su destino final en las vacuolas celulares. La biosíntesis de los flavonoides se realiza a través de la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico. Uno de los productos de la vía del ácido shikímico es la fenilalanina, de la cual se deriva la mayoría de los fenoles, la vía del ácido malónico utiliza como sustrato Acetil-CoA y es importante fuente de fenoles en bacterias y hongos, y aunque existe en plantas superiores no es muy utilizada¹¹.

Los flavonoides presentan diversos beneficios para la salud, son antialérgicos, tienen acción antiviral, protectores cardiovasculares, presentan actividad antiinflamatoria, y son buenos atrapadores de radicales libres, entre otros¹².

Estos compuestos son derivados de benzo- γ -pirona y pueden ser agrupados por las diferentes sustituciones y el grado de saturación de los anillos de la benzo- γ -pirona, representando una amplia y diversa familia de compuestos¹³.

Los flavonoles corresponden a un tipo de flavonoides, este grupo tiene como compuesto base a la 3-hidroxi flavona (3-HF). La estructura química de los flavonoles a estudiar en esta memoria se muestran en la Figura 6.

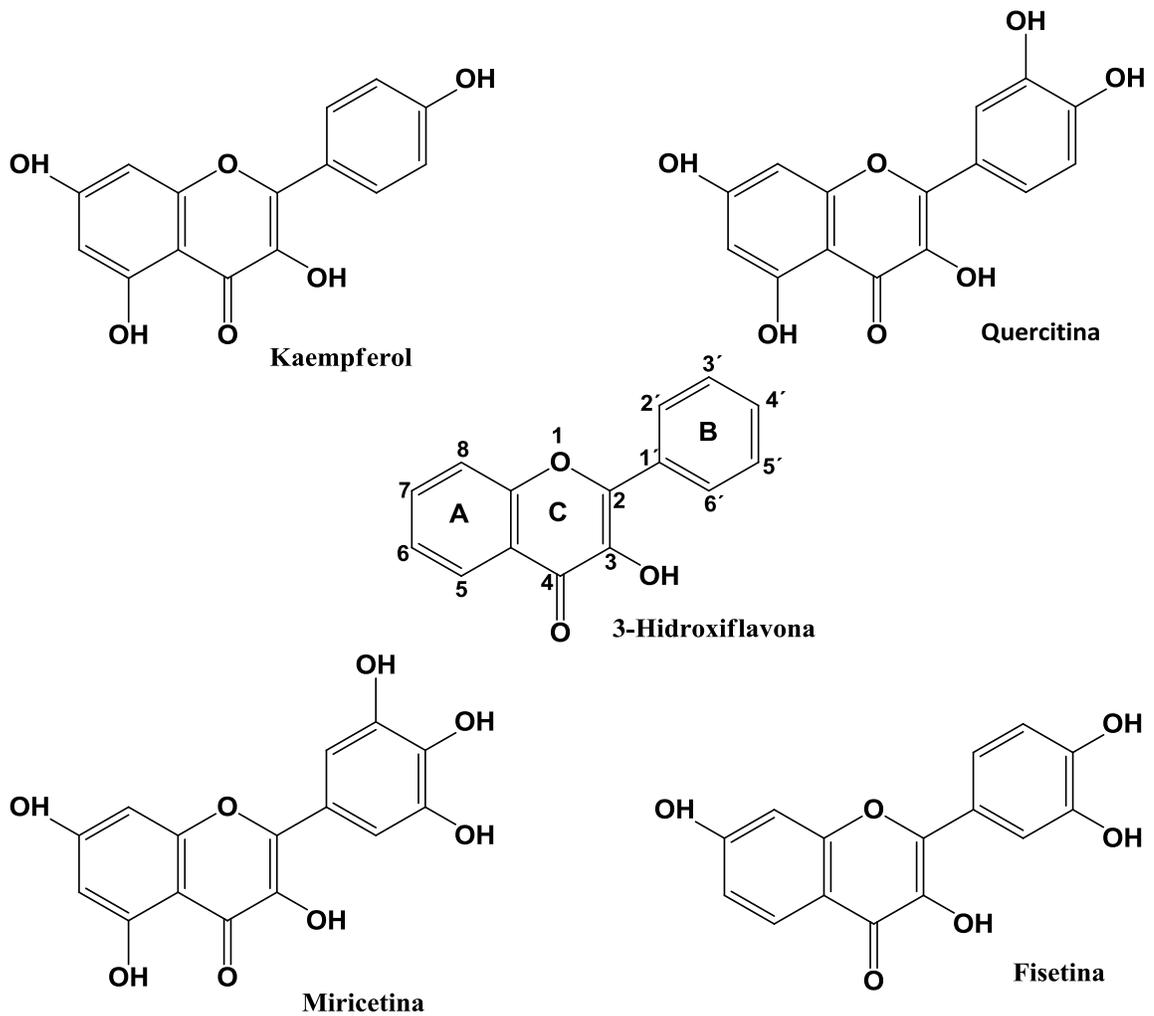


Figura 6.- Estructura química de los flavonoles estudiados.

Tabla 1.- pK_a de los diferentes sustituyentes hidroxilos para los flavonoles a estudiar.

Flavonol	pK _a					
	R ₇	R ₅	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	OH
3-HF	--	--	--	--	--	10,34 (8,19)
Quer	7,19 (6,40)	11,56 (7,79)	-- (12,82)	9,36 (9,88)	-- --	-- (9,19)
Miric	-- (7,61)	-- (9,76)	-- (6,38)	-- (14,71)	-- (11,34)	-- (8,97)
Kaemp	7,05 (6,41)	11,04 (10,03)	--	9,04 (9,26)	--	-- (7,89)
Fise	7,36 (6,30)	--	13,85 (12,82)	9,71 (9,54)	--	12,11 (8,01)

Una característica importante de los flavonoles es su pK_a, dependiente de la presencia y ubicación de los diferentes grupos hidroxilos en los anillos. En la Tabla 1 se muestran los valores de los pK_a reportados en la bibliografía¹⁴ y los calculados con un programa computacional (ChemAxon, entre paréntesis). Debido a que la velocidad total de reacción entre oxígeno molecular singulete y flavonoides aumenta hasta en 3 ordenes de magnitud cuando se trabaja en medio altamente básico¹⁵, el pH del medio es un factor importante para la determinación de la constante de velocidad de reacción química.

El espectro de absorción UV-vis de los flavonoles presenta dos bandas correspondientes a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. En la Figura 7 se muestra la estructura química de los flavonoles (R=H, OH), indicando los grupos cromóforos correspondientes a cada banda de absorción.

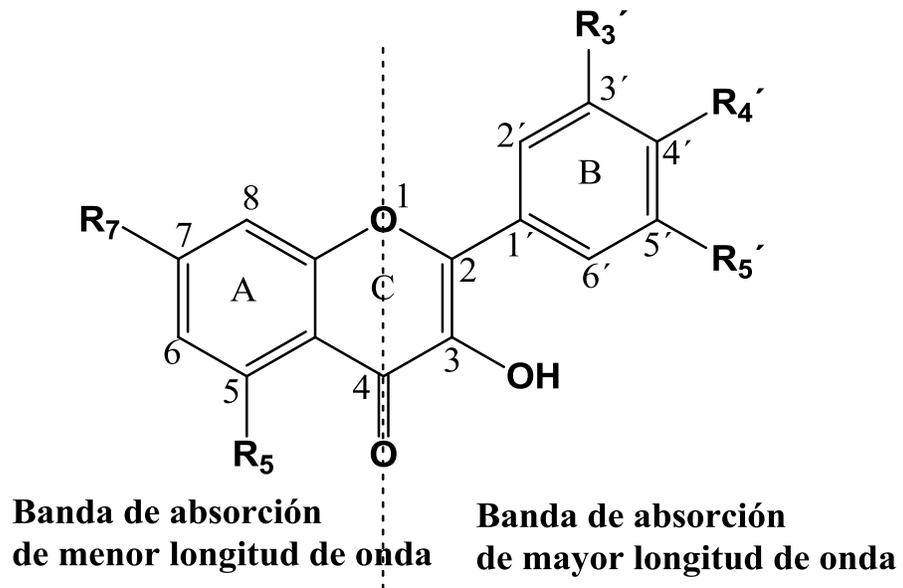


Figura 7.- Estructura química general de flavonoides indicando grupos cromóforos.

En la Figura 8 se muestra los espectros de absorción de los diferentes flavonoles estudiados en esta memoria, utilizando metanol como solvente.

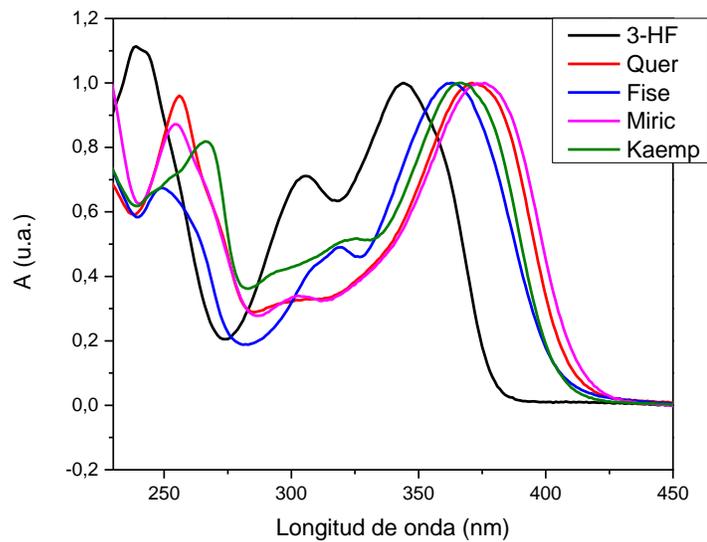


Figura 8.- Espectro de absorción UV-vis de flavonoles en metanol.

1.2.1. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los distintos tipos de flavonoides es ampliamente conocida. Se ha propuesto que la capacidad antioxidante de los flavonoides es mayor incluso que al de las vitaminas C y E^{12b}.

Se ha descrito que los flavonoides pueden prevenir lesiones causadas por radicales libres a través de los siguientes mecanismos^{12b}:

- 1) Atrapadores directos de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- 2) Activación de enzimas antioxidantes.
- 3) Capacidad de quelar metales.
- 4) Reducción de radicales α -tocoferilos.
- 5) Inhibición de oxidasas.
- 6) Mitigación del estrés oxidativo causado por óxido nítrico.
- 7) Incremento de los niveles de ácido úrico.
- 8) Incremento de la capacidad antioxidante de antioxidantes de bajo peso molecular.

Los mecanismos 1 y 3 se estudiaron en esta memoria; el mecanismo 1) evaluando la reactividad de los distintos flavonoles frente a $O_2 (^1\Delta_g)$ en mezclas acuosas de metanol y el mecanismo 3) donde se evalúa el poder quelante de los flavonoles y el cambio de reactividad de los flavonoles quelados frente al $O_2 (^1\Delta_g)$.

Las características estructurales de los flavonoides que los hacen eficientes atrapadores de radicales libres se detallan a continuación^{12b}:

- 1) Una estructura tipo catecol en el anillo B, que involucra una importante deslocalización electrónica.
- 2) Presencia de un doble enlace conjugado con una función 4-oxo en el anillo C, que favorece la deslocalización electrónica del anillo B.

- 3) La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (anillos A y C) posibilita la formación de puente de hidrógeno con el grupo oxo.

Considerando las tres características previamente mencionadas, los flavonoides con mayor actividad antioxidante corresponden a los flavonoles¹⁶.

1.2.2. Capacidad quelante de flavonoides

Los flavonoides han sido estudiados por su proceso de quelación con cationes divalentes, principalmente de metales de transición¹⁷. Al igual que las ROS, los iones metálicos, los cuales poseen actividad redox como co-factores para varias enzimas son citotóxicos. Generalmente, la quelación de flavonoides con cationes metálicos previene la generación de radicales libres y sus subsiguientes reacciones¹⁸.

Los sitios propuestos de unión de metales en flavonoides corresponden al grupo catecol en el anillo B, a los grupos 3-hidroxil y 4-oxo en el anillo heterocíclico, y a los grupos 4-oxo y 5-hidroxil entre el anillo heterocíclico y el anillo A. El sitio primario para la reacción de quelación corresponde a 3-hidroxil y 4-oxo del anillo C, aunque en algunos casos un segundo catión puede interaccionar con la estructura catecol del anillo B. La asociación de un tercer catión al aducto mediante los grupos 5-hidroxil-4-oxo de los anillos A y C es muy improbable, debido al impedimento estérico que resulta de la interacción primaria.¹⁸⁻¹⁹

A partir de la diferencia en el espectro de absorción del flavonol libre y del flavonol en presencia de iones divalentes, se puede estimar con qué parte del flavonol está interaccionando el metal, mediante la variación (forma e intensidad) de las bandas correspondientes a los diferentes grupos cromóforos (Figura 7).

Por razones estéricas los complejos frecuentemente no incluyen más de dos flavonoides por catión metálico, sin embargo, se ha propuesto que la

estequiometría entre Quer y aluminio además de ser 1:1, puede ser; 1:2, 2:1 y 1:3. Esto demuestra que el grado de formación del complejo depende de la razón de Aluminio-ligando y del solvente empleado; en general, en metanol se favorece la formación de complejos 1:2^{17h}.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ocurre por dos tipos de mecanismos: transferencia de un átomo de hidrógeno controlada por la entalpía de disociación del enlace fenol (BDE) y/o por donación electrónica, por lo que los fenoles con valores bajo de BDE y potencial de ionización (PI) pueden interactuar a través de ambos mecanismos.

En presencia de iones se ha observado un aumento en la capacidad antioxidante. Cálculos realizados con teoría del funcional de la densidad (DFT), muestran una disminución en el PI cuando la Quer se encuentra enlazada a iones Cr(III), por lo que el aumento en la actividad antioxidante cuando la Quer se encuentra enlazada a Cr(III) respecto a la Quer libre se debe a la combinación de ambos mecanismos mencionados anteriormente^{17c}.

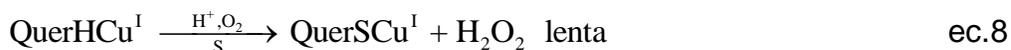
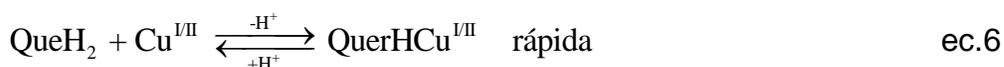
1.2.3. Actividad pro-oxidante

La actividad pro-oxidante de los flavonoides, al igual que la actividad antioxidante, tiene relación directa con el número de grupos hidroxilos presentes en la molécula. Además, tiene mayor relevancia cuando estos grupos se encuentran en el anillo B de la molécula^{12b}.

No es posible, la detección de la actividad pro-oxidante de la serie de flavonoides mono- y di-hidroxi sustituido. Sin embargo, cuando poseen múltiples grupos hidroxilos especialmente en el anillo B, aumenta considerablemente la producción de radicales hidroxilos durante una reacción tipo Fenton. Los flavonoides son capaces de reducir Cu (II) a Cu (I), permitiendo así la generación de nuevos radicales libres de flavonoides, observando posiblemente el efecto

pro-oxidante de éstos. Es posible, que la actividad pro-oxidante mostrada por los flavonoides pueda ser otra herramienta en sus funciones beneficiosas^{12b}.

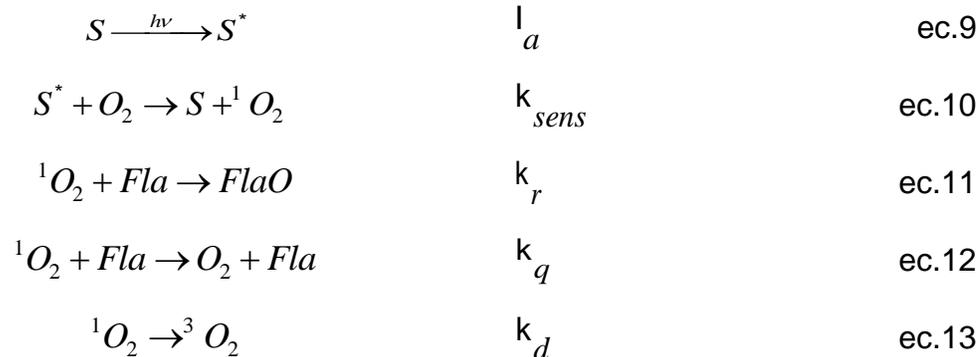
Se ha reportado que los flavonoles pueden reducir iones metálicos lo cual produciría consumo del flavonol debido a una auto-oxidación^{17e}. El mecanismo propuesto en literatura para la reducción de los iones metálicos se muestra en las ec.6-8, donde QuerS corresponde al producto de oxidación.



La fuente de radicales fenoxilos puede provenir de una auto-oxidación, así se ha encontrado que la velocidad de auto-oxidación de la quercitina y miricetina es fuertemente dependiente del pH. La auto-oxidación de la quercitina aumenta considerablemente cuando se añade iones hierro a la solución^{12b, 20}.

1.2.4. Reacción de flavonoles con oxígeno molecular singulete

El proceso de foto-oxidación sensibilizada de flavonoides puede ser descrito en términos de varias etapas simples que incluyen el proceso de excitación del sensibilizador (ec.9), transferencia de energía desde el sensibilizador al oxígeno para la generación de oxígeno molecular singulete (ec.10), desactivación física y reacción química del oxígeno molecular singulete con flavonoides (ec. 11-12) y desactivación del oxígeno excitado por el solvente (ec.13).



El mecanismo propuesto por Matsuura²¹ y Studer²² para la reacción entre los flavonoles, 3-HF y Q, y oxígeno molecular singlete se muestra en las Figuras 9 y 10.

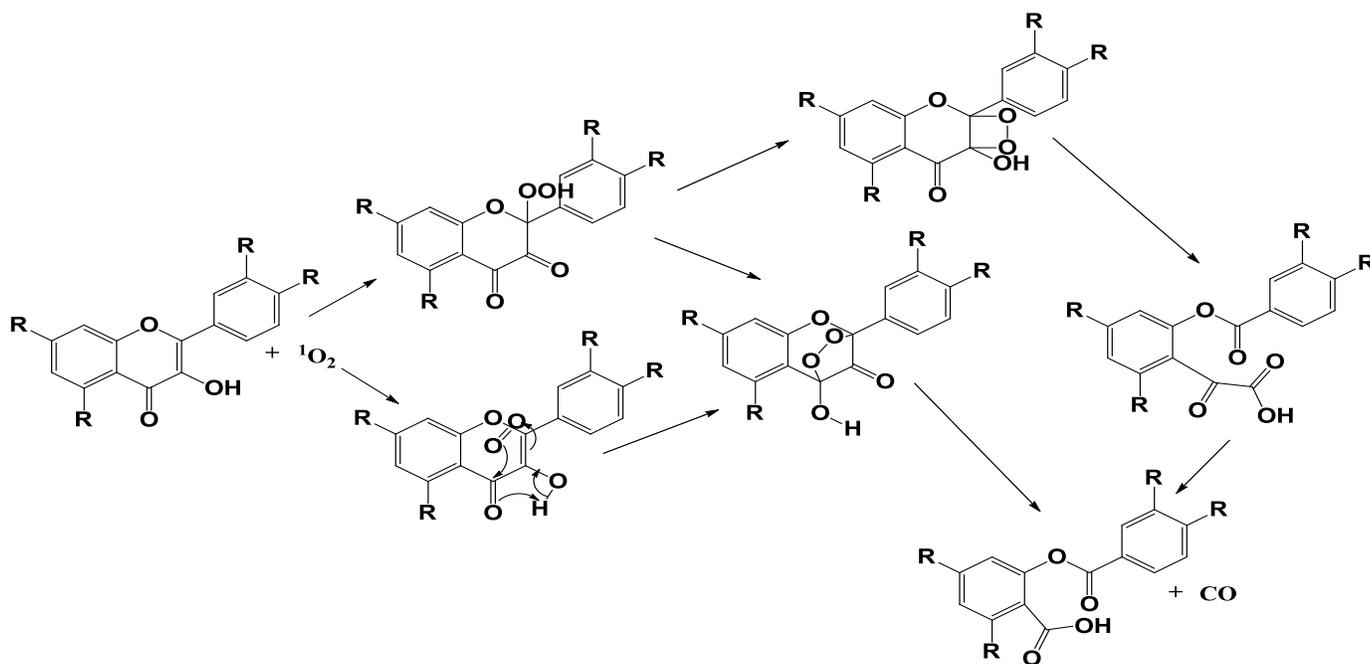


Figura 9.- Mecanismo para la reacción entre flavonol y oxígeno molecular singlete. Los flavonoles corresponden a 3-HF (R=H) y Q (R=OH).

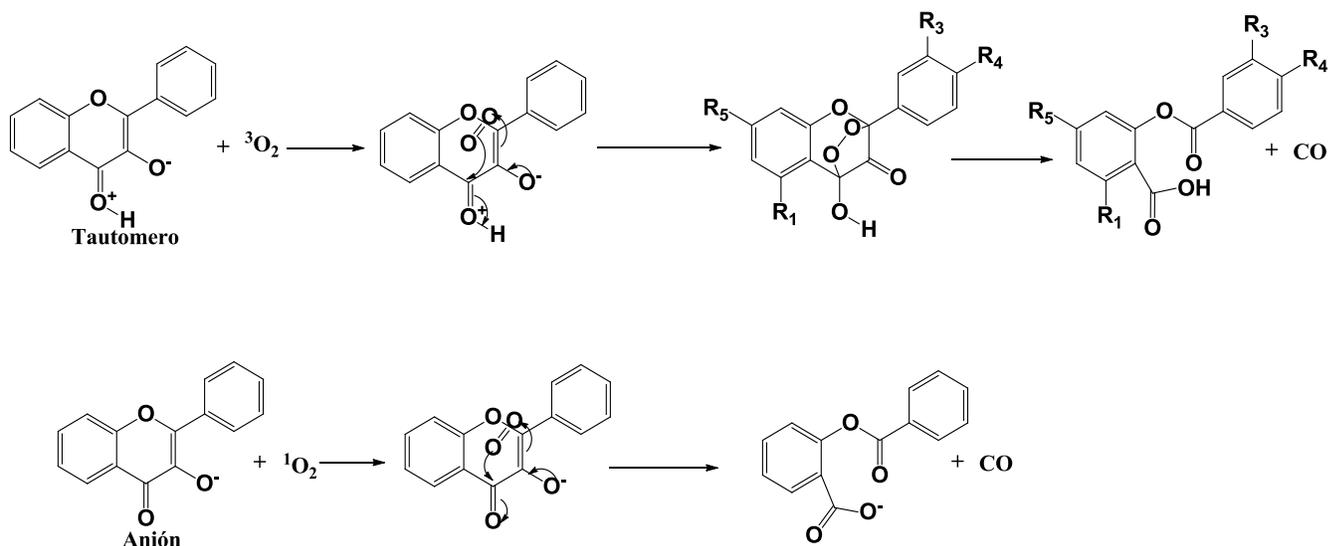


Figura 10.- Mecanismo propuesto para la reacción entre 3-HF y oxígeno molecular singulete.

1.3. Relaciones lineales de energía libre de solvatación

El efecto del medio sobre la constante de velocidad reacción refleja la contribución de las propiedades microscópicas del solvente en las interacciones a nivel molecular de las especies que participan en la reacción. Así, el efecto del solvente sobre la constante de velocidad de reacción puede relacionarse con la estabilización de los reactivos, el complejo de encuentro o estado de transición, específicamente, en la etapa que controla la velocidad de reacción. Si los reactivos presentan una mayor separación de carga, relativa al complejo de encuentro, serán más estabilizados en presencia de un solvente más polar, por lo tanto, aumentará la energía de activación, disminuyendo la velocidad de reacción. Por otra parte, si es mayor la separación de carga del complejo de encuentro, su estabilización en solventes polares será mayor que la de los reactivos, lo que hace predecible un aumento en la velocidad de reacción.

Debido a la complejidad de las interacciones soluto-solvente se han utilizado las relaciones lineales de energía libre de solvatación, LSER, mediante el uso de ecuaciones multiparamétricas, lo que permite relacionar datos cinéticos con parámetros empíricos que describen las propiedades microscópicas del solvente. Estas ecuaciones permiten reconocer la naturaleza de las interacciones entre las especies involucradas en una reacción. El modelo más utilizado de LSER y el empleado en este trabajo corresponde al propuesto por Taft, Abraham, Abboud y Kamlet²³, (ec.14).

$$\log k = \log k_0 + s\pi^* + a\alpha + b\beta + h\delta_H \quad \text{ec. 14}$$

El término π^* corresponde al parámetro de dipolaridad- polarizabilidad del solvente y es una medida de la capacidad del solvente para estabilizar cargas o dipolos.

La capacidad del solvente para donar protones en enlaces de hidrógeno soluto-solvente, denominado parámetro de acidez o HBD (hydrogen bond donation), es designada por α . Por otra parte, el parámetro de basicidad o HBA (hydrogen bond acceptor), β , mide la capacidad del solvente para aceptar protones del soluto o ceder un par de electrones para la formación de un enlace de hidrógeno soluto-solvente.

El término δ_H , conocido como el parámetro de solubilidad de Hildebrand o densidad de la energía cohesiva del solvente, se define como la raíz cuadrada del cociente entre la energía molar de vaporización del gas, a presión cero, y el volumen molar de éste. Este parámetro refleja el costo energético de interrumpir la interacción solvente-solvente para crear un espacio para el complejo de encuentro²⁴.

Los parámetros π , α , β , se conocen como parámetros solvatocrómicos del solvente debido a que se basan en los desplazamientos solvatocrómicos de las

bandas de absorción de diversas pruebas moleculares, las cuales son particularmente sensibles a las propiedades específicas del solvente^{15, 25}.

1.4. Objetivo

Realizar un estudio de la reactividad entre el oxígeno molecular singulete y flavonoides derivados de la 3-hidroxiavona, como quercitina, kaempferol, miricetina y fisetina en mezclas acuosas de metanol, y en presencia de iones divalentes.

Determinar las constantes de velocidad reactiva para los diferentes flavonoles nombrados anteriormente y la constante de velocidad de desactivación total de 9,10-DMA, utilizado como actinómetro, en las diferentes mezclas acuosas de metanol. A partir de estos valores realizar la estimación de la relación lineal de energía libre de solvatación (LSER).

2. Materiales

- 3-hidroxi flavona y quercitina p.a. (Aldrich).
- Miricetina, fisetina, kaempferol (Shaanxi Sciphar Hi-Tech industry Co. Ltda.).
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. Ácido acético p.a., acetato de sodio anhídrido p.a. (Merck).
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka).
- Trizma base 99,9% (Sigma)
- Metanol grado HPLC (Merck).
- Metanol perdeuterado y agua deuterada (Sigma Aldrich).
- Agua Mili-Q (purificada a través de Millipore).

Todos los reactivos y solventes se utilizaron tal como se recibieron.

3. Instrumentación

3.1. Espectroscopia de absorción UV-vis

Los espectros de absorción ultravioleta-visible se efectuaron en espectrofotómetros Unicam UV-2 y UV-4 conectados a computadores y controlados por software Vision.

3.2. Detección de la luminiscencia infrarroja del $O_2(^1\Delta_g)$

Para evaluar las constantes de velocidad de desactivación total, $k_T^{9,10-DMA}$, se utilizó un sistema resuelto en el tiempo para la detección de la emisión infrarroja del $O_2(^1\Delta_g)$ de baja intensidad.

Como fuente de excitación pulsada fue empleado un láser de Nd:YAG Q-Switched (Quantel, Modelo Brilliant) que posee dos dobladores de frecuencia. El doblador utilizado, permite generar pulsos de excitación correspondientes al segundo armónico, de longitud de onda de 532nm y una potencia máxima de 100mJ. La radiación emitida por $O_2(^1\Delta_g)$ atraviesa un filtro de interferencia Spectrogon de (1270 ± 1) nm y es colectada por un diodo de germanio del detector de radiación infrarroja North Coast (Modelo EO-817P), el cual es enfriado con nitrógeno líquido. Este detector se caracteriza por ser de alta sensibilidad y tiempo de respuesta corto. La señal generada por el detector es adquirida por un osciloscopio Hewlett-Packard (Modelo 5454OA) de 1Gsa/s y 500MHz. El decaimiento digitalizado por el osciloscopio es transferido a un computador, donde la señal es procesada con un programa computacional escrito en lenguaje G de LabView desarrollado en el laboratorio, la disposición de los diferentes elementos se muestra en la Figura 11.

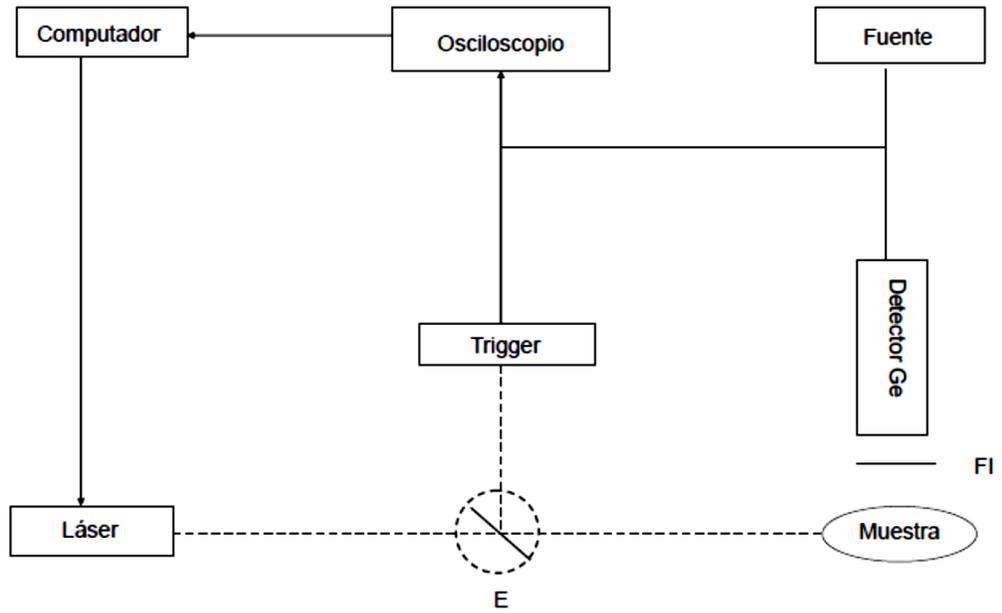


Figura 11.-Sistema de fotólisis de pulso para la detección de la emisión infrarroja del oxígeno molecular singulete; E: espejo; FI Filtro de interferencia.

4. Metodología

4.1. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química entre oxígeno molecular singlete y flavonoles

La determinación de la constante de velocidad de reacción química se realiza en condiciones de irradiación estacionaria. Para la generación de oxígeno molecular singlete se empleó el método de la fotosensibilización, utilizando rosa de bengala como sensibilizador, con absorbancia 1,0 en todos los experimentos. Se empleó un sistema de fotólisis termorregulado a 20°C con un filtro de corte apropiado para excitar sólo el sensibilizador, utilizando una ampolla halógena de 50W como fuente de irradiación. La concentración de flavonoles en cubeta es del orden de 10^{-5} M.

En condiciones de irradiación estacionaria, los datos experimentales obtenidos se ajustan a un tratamiento cinético de pseudo primer orden. La constante experimental obtenida se relaciona con la variación de la concentración de los flavonoles en el tiempo como se muestra en la ec. 15.

$$\ln\left(\frac{[Fla]_0}{[Fla]}\right) = k_r [^1O_2]t = k_{\text{exp}} t \quad \text{ec. 15}$$

Para poder obtener la constante de velocidad de reacción química, o constante reactiva, es necesario conocer la concentración estacionaria de oxígeno molecular singlete, la cual puede ser evaluada por la utilización de un actinómetro de reactividad conocida frente a $O_2(^1\Delta_g)$. La determinación de la concentración estacionaria de oxígeno molecular singlete con un actinómetro requiere que las fotólisis se realicen bajo las mismas condiciones experimentales de concentración de sensibilizador, temperatura, distancia y potencia de la fuente de iluminación.

Cuando se utilizan actinómetros, como el 9,10-dimetilantraceno (9,10-DMA), la determinación de la constante de velocidad de reacción química para los flavonoles se obtiene del producto entre la constante de velocidad de reacción química del 9,10-DMA y la razón de las constantes experimentales entre el flavonol y 9,10-DMA, como se muestra en la ec. 16.

$$\frac{k_{\text{exp}}^{\text{Fla}}}{k_{\text{exp}}^{\text{DMA}}} = \frac{k_r^{\text{Fla}} [\text{O}_2]}{k_r^{\text{DMA}} [\text{O}_2]} \quad \text{ec. 16}$$

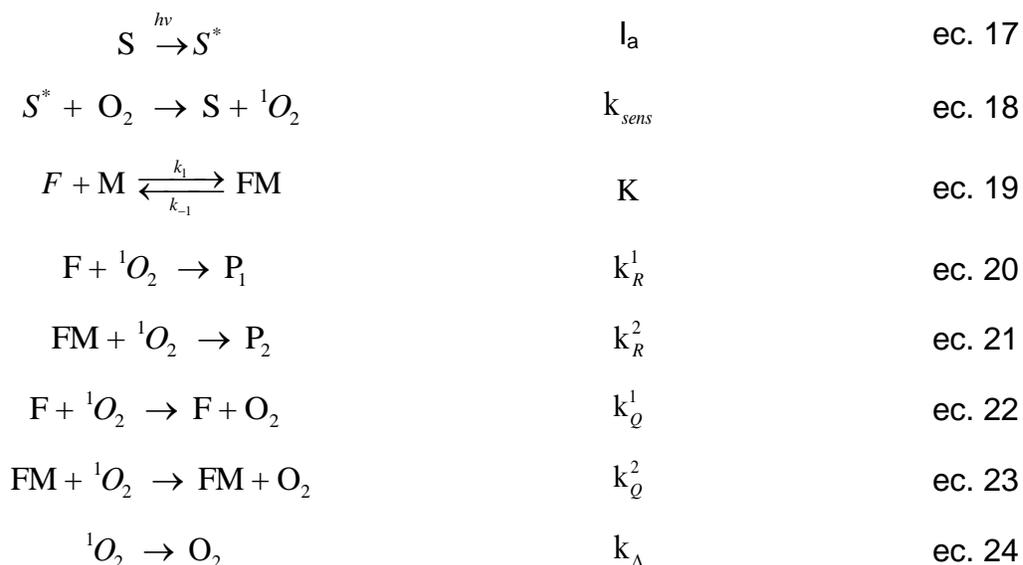
4.2. Estudio espectroscópico y reactividad con oxígeno molecular singlete de la reacción entre flavonoles y cationes divalentes

Se estudió la dependencia de la absorbancia de los flavonoles con el aumento de la concentración de catión divalente en el medio. Esta determinación se realiza en una cubeta de cuarzo que contiene solución del flavonol, se adicionó alícuotas adecuadas de una solución concentrada de catión divalente, a fin de lograr una relación molar definida entre el flavonol y el catión.

Se determinó la relación estequiométrica de la reacción entre cationes divalentes y los flavonoles, utilizando el método de Job's. Este método, denominado de variaciones continuas, consiste en variar progresivamente las cantidades relativas de los reactantes conservando su suma constante. El gráfico de la absorbancia correspondiente al aducto versus la fracción molar del flavonol debería dar un máximo el cual corresponde a la relación estequiométrica de la reacción entre flavonol y catión divalente.

Para obtener las constantes de velocidad de reacción de la foto-oxidación, se realizó un tratamiento de pseudo primer orden observando la disminución de

la absorbancia. Las reacciones involucradas tanto en la interacción flavonol-cación como en la posterior foto-oxidación se muestran en la ecuaciones 17-24.



4.3. Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2({}^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA

La evaluación de la constante de velocidad de desactivación total se realizó mediante el método resuelto en el tiempo. Dado que la intensidad de luminiscencia es proporcional a la concentración de $O_2({}^1\Delta_g)$ presente, la disminución en el tiempo corresponderá a la desactivación de esta especie. Si el decaimiento de la luminiscencia responde a un comportamiento monoexponencial, la pendiente del gráfico del logaritmo natural de la intensidad contra el tiempo corresponderá al tiempo de vida del oxígeno molecular singulete, cuyo inverso es la constante de desactivación del $O_2({}^1\Delta_g)$, k_D . Esta constante depende de la desactivación por el solvente y de la presencia de sustratos reactivos.

$$k_D = k_d + k_{\text{DMA}} [9,10\text{-DMA}] \quad \text{ec. 25}$$

En la ec. 25 se muestra la ecuación tipo Stern-Volmer donde $k_{9,10\text{-DMA}}$ es la constante de velocidad de desactivación total del oxígeno molecular singulete por 9,10-DMA y k_d la constante de desactivación de oxígeno molecular singulete por el solvente.

Como el inverso de k_d corresponde al tiempo de vida del oxígeno molecular singulete en un dado solvente, este valor deberá coincidir con los tiempos evaluados independientemente dicho solvente.

4.4. Tratamiento estadístico de las constantes de velocidad de reacción química en mezclas acuosas

Las ecuaciones obtenidas a partir del tratamiento LSER, “linear solvation energy relationship”, se realizaron a partir de la correlación multiparamétrica entre las constantes de velocidad de desactivación con parámetros empíricos de las mezclas metanol-agua²⁶ los cuales se muestran en la Tabla 2.

Para la obtención de la ecuación de la correlación LSER es necesario observar ciertos criterios estadísticos tales como: i) los coeficientes de los parámetros del solventes incluidos en la ecuación de correlación corresponden aquellos que tienen un nivel de significancia mayor o igual a 0,95; ii) el coeficiente de correlación, R , debe ser mayor o igual a 0,90 ($R^2 > 0,80$) y la desviación estándar tan pequeña como sea posible; iii) F , índice de Fisher, es una medida de la calidad de la ecuación de correlación, para que sea aceptable este índice debe ser mayor a 50.

Tabla 2.- Valores de los coeficientes de las ecuaciones de correlación, LSER, para las diferentes mezclas acuosas metanol-agua.

%H₂O	X_w	π*	α	β	δ_H
0	0	0,595	1,000	0,690	210,8
10	0,2000	0,725	1,010	0,670	237,5
20	0,3595	0,821	0,994	0,682	265,7
30	0,5000	0,910	0,980	0,705	295,5
40	0,6000	0,970	0,980	0,695	326,6
50	0,7000	1,030	1,010	0,660	359,8

5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA en mezclas acuosas

En la Tabla 3, se incluye las constantes de velocidad de desactivación total del oxígeno molecular singulete por 9,10-DMA, $k_T^{9,10-DMA}$, obtenida a partir de la dependencia del tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$ con la concentración de 9,10-DMA.

Tabla 3.- Constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA en mezclas acuosas de MeOH.

% H ₂ O	$k_T^{9,10-DMA}/10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0	4,4±0,1
10	7,1±0,3
20	9,3±0,3
30	12,0±0,5
40	13,0±0,2
50	18,0±0,2

La Figura 12 muestra la dependencia de $k_T^{9,10-DMA}$ con el porcentaje de agua en el medio de reacción. Se puede observar que los valores obtenidos aumentan linealmente cuando el porcentaje de agua en el medio aumenta, es decir, con el aumento de la polaridad del medio de la reacción.

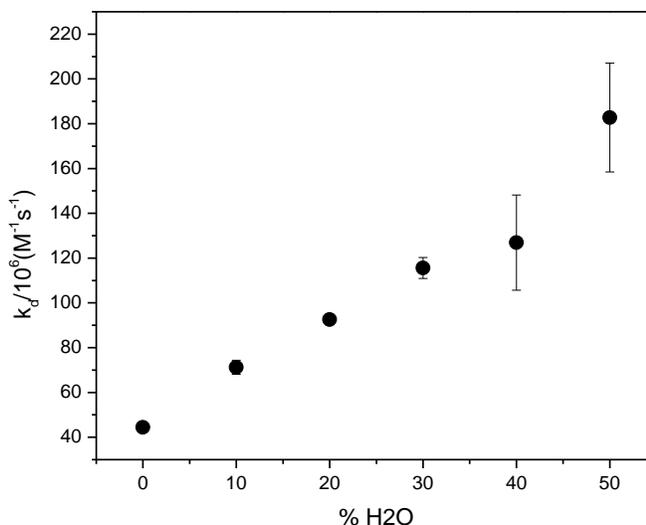


Figura 12.- Gráfico de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA en mezclas acuosas de metanol.

Para que el resultado de una correlación multiparamétrica entre las constantes de velocidad de desactivación con parámetros empíricos de las mezclas metanol-agua, arroje resultados estadísticamente aceptables, es necesario que la cantidad de datos a ajustar (número de constantes de velocidad) que se relacionarán con los descriptores sea lo suficientemente grande. Por razones experimentales, disponemos de un bajo número de variables que dependen de los descriptores microscópicos del solvente. Para reducir el número de descriptores, se decidió estimar cual es el parámetro microscópico del solvente que afectará en mayor grado la constante de velocidad de desactivación. Este análisis, indica que el parámetro π^* es el que más influye en la constante de velocidad de desactivación. Con esta consideración, se realizó un ajuste lineal entre la constante de velocidad de desactivación y el parámetro π^* , como se muestra en la ec. 26 y en la Figura 13.

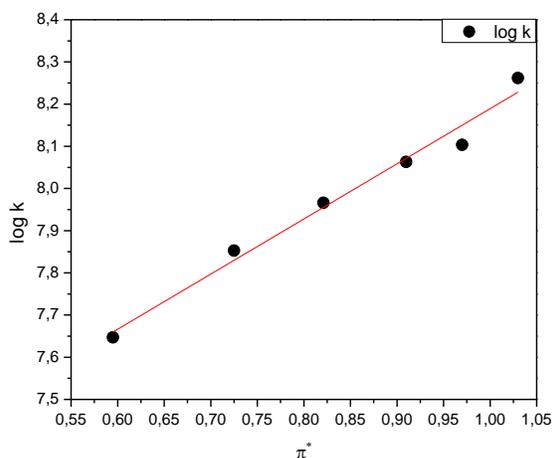


Figura 13.- Relación lineal entre logaritmo de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por 9,10-DMA y el parámetro π^* .

$$\text{Log}k = 6,882 + 1,307 \pi^* \quad R^2=0,977 \quad \text{ec. 26}$$

La reacción entre 9,10-DMA y $O_2(^1\Delta_g)$ involucra la participación de un exciplexo con transferencia parcial de carga, el mecanismo procedería a través de una cicloadición [2+4] concertada de carácter asincrónico²⁷. Se ha reportado que los coeficientes de los parámetros LSER, tanto en solventes puros como en mezclas acuosas, dioxano-agua y etanol-agua, muestran principalmente una dependencia con los parámetros empíricos π^* y ρ_H ²⁷. A partir de lo mencionado anteriormente y de nuestra estimación de LSER se puede decir que, el aumento en el valor de la constante de velocidad a medida que aumenta el porcentaje de agua en el medio, se puede deber a las propiedades del agua, capaz de favorecer la formación de un exciplexo con transferencia parcial de carga.

5.2. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química entre flavonoles y $O_2(^1\Delta_g)$ en mezclas acuosas (k_r)

Mediante experimentos de foto-oxigenación en condiciones de iluminación estacionaria, se determinaron las constantes de velocidad de reacción química, k_r^{fla} , correspondiente a la reacción entre flavonol y oxígeno molecular singulete en mezclas acuosas de metanol.

Para el desarrollo de estas experiencias cinéticas, se fijaron condiciones experimentales óptimas para el seguimiento del consumo de flavonol: tipo de sensibilizador, potencia de lámpara, tiempo de fotólisis y el intervalo de toma de muestra.

La determinación de la constante de velocidad de reacción química se realizó siguiendo el consumo del flavonol en el tiempo, utilizando como técnica analítica la espectrofotometría UV-vis. En la Figura 14 (A) se muestran los espectros de absorción obtenidos durante el proceso de foto-oxigenación de la Quer en presencia de rosa de bengala como sensibilizador. Las mediciones se realizaron en mezclas acuosas tamponadas de metanol a distintos pH y en diferentes %v/v.

El tratamiento cinético realizado corresponde a un ajuste de pseudo primer orden para el consumo de flavonol, Figura 14 (B).

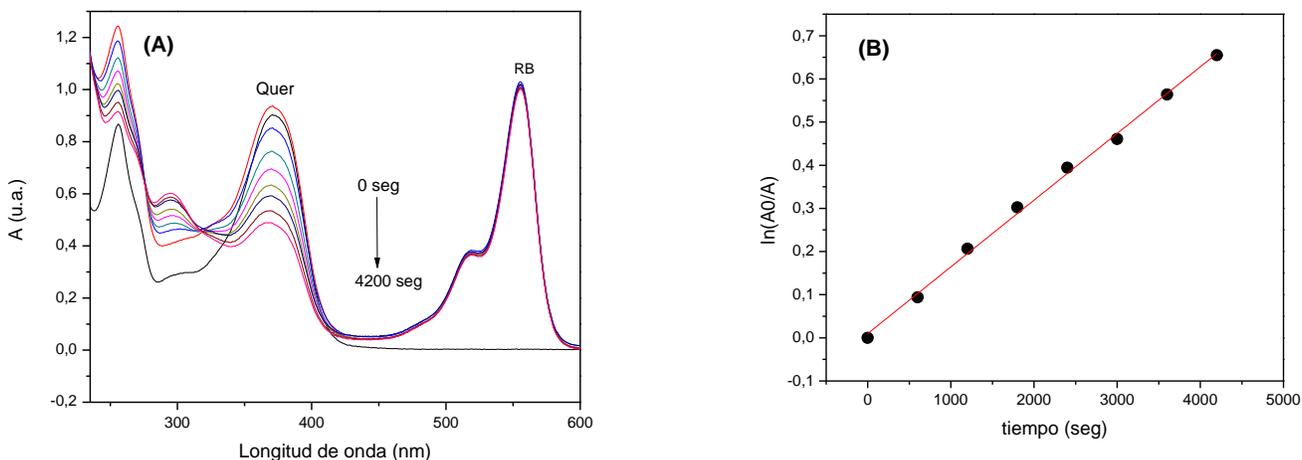


Figura 14.- (A) Variación en la absorción durante el tiempo de fotólisis estacionaria de quercitina en presencia de rosa de bengala como sensibilizador, en metanol como solvente. (B) Tratamiento cinético de pseudo primer orden del consumo de quercitina en el tiempo.

Tabla 4.- Valores de constante de velocidad de reacción química entre $O_2(^1\Delta_g)$ y flavonoles, k_r^{Fla} , en metanol.

Flavonol	$k_r^{Fla} / 10^5 M^{-1} s^{-1}$
3-HF	2,5±0,6
Kaemp	4,1±0,8
Fise	6,9±1,1
Quer	9,0±1,2
Miric	9,0±1,2

En la Tabla 4, se muestran los valores obtenidos de la constante de velocidad de reacción química, k_r^{Fla} , en metanol como solvente, se puede observar que k_r^{Fla} es fuertemente influenciada por el grado de sustitución de grupos hidroxilos que presentan los diferentes anillos del flavonol. Por lo tanto, los valores más altos de k_r^{Fla} corresponden aquellos flavonoles que presentan

mayor sustitución, tanto en el anillo A como en el anillo B. El aumento del valor de k_r^{Fla} a medida que aumenta la sustitución se encuentra en un rango de 1,6 a 3,6 veces mayor que la 3-HF, el menor aumento corresponde al flavonol Kaemp y los valores mayores a Quer y Miric, que presentan la misma constante de velocidad de reacción.

El valor obtenido para k_r^{Fise} es 1,7 veces mayor que el valor obtenido para k_r^{Kaemp} , esto implica que la mayor sustitución del anillo B por sobre el anillo A es más importante para la reactividad frente a $^1\text{O}_2$. Si se comparan estos dos flavonoles con la 3-HF (flavonol base) el aumento en el valor de k_r^{Fla} para el Kaemp y Fise corresponderían a 1,7 y 2,8 veces respectivamente. Además la comparación entre los flavonoles Kaemp y Quer da cuenta del efecto de la sustitución por un grupo hidroxilo en la posición meta, la sustitución en esta posición favorecería la reactividad de la Quer con oxígeno molecular singulete, la constante de velocidad de reacción química obtenida para la Quer es el doble que la constante de velocidad de reacción química obtenida para Kaemp.

Por otra parte, los valores obtenidos para k_r^{Fla} de los flavonoles Quer y Miric estarían indicando que la adición de otro grupo hidroxilo en la posición meta del anillo B no influenciaría en la reactividad de los flavonoles con $^1\text{O}_2$. La capacidad para desactivar $^1\text{O}_2$ de los distintos flavonoles por vía química se puede ordenar de acuerdo a su reactividad como; $\text{M}=\text{Q}>\text{F}>\text{K}>\text{HF}$. La reactividad frente al oxígeno molecular singulete es similar a la reactividad de los flavonoles encontrada en literatura como atrapadores y reductores de radicales libres^{16, 28}.

En la Tabla 5, se muestran los valores obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química entre los flavonoles estudiados y $^1\text{O}_2$ en mezclas acuosas, utilizando tampón de acetato pH 5,1 como medio acuoso.

Tabla 5.- Valores de constante de reacción química entre $O_2(^1\Delta_g)$ y flavonol, k_r^F , en mezclas acuosas de metanol en tampón acetato pH=5,1.

% H ₂ O	$k_r/10^5 M^{-1} seg^{-1}$				
	3-HF	Quer	Miric	Fise	Kaemp
0	2,5±0,6	9,0±1,2	9,0±1,2	6,9±1,1	4,1±0,8
10	3,8±0,6	9,8±1,2	23,0±3,8	10,0±0,6	5,8±0,8
20	6,2±0,3	12,0±0,7	27,0±1,7	11,0±0,9	8,9±0,2
30	4,7±0,4	14,0±1,4	23,0±0,9	10,0±1,3	6,6±0,7
40	4,4±2,0	13,0±2,4	24,0±1,3	10,0±4,0	7,2±1,3
50	4,2±1,0	17,0±3,0	33,0±6,9	12,0±2,5	11,0±1,9

De los valores que se muestran en la Tabla 5 y su representación en la Figura 15 se puede mencionar que k_r^{Fla} no presenta una dependencia lineal con el aumento de agua en el medio, utilizando tampón acetato pH 5,1 como medio acuoso. La dependencia de la reactividad a medida que aumenta el porcentaje de agua en el medio no es igual para todos los flavonoles, sin embargo, se puede observar un leve aumento relativo en su reactividad.

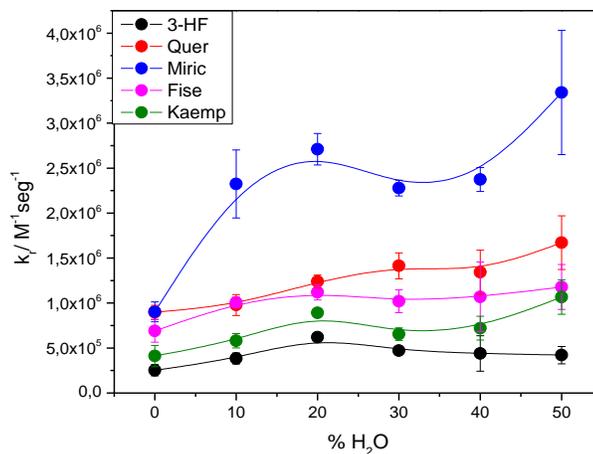


Figura 15.- Relación de la constante de velocidad de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y flavonoles con el porcentaje de agua en metanol pH 5,1.

Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química en mezclas acuosas de metanol, utilizando buffer de Tris pH 7,8 como medio acuoso, para la 3-HF y Quer se muestran en la Figura 16 y en la Tabla 6.

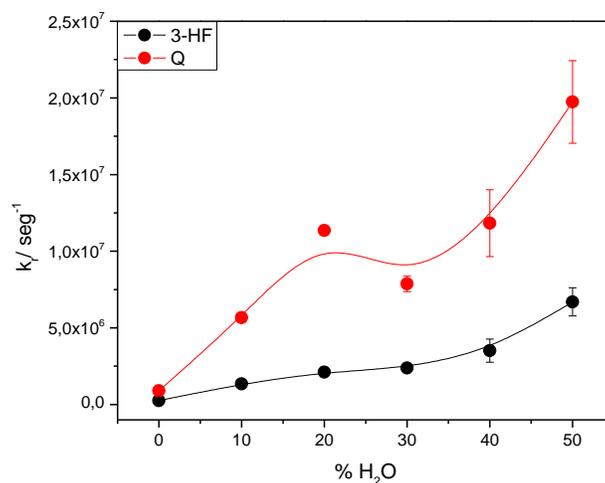


Figura 16.- Gráfico de la constante de velocidad de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y flavonoles, 3-HF y Quer, versus el porcentaje de agua en metanol a pH=7,8.

Tabla 6.- Valores de constante de reacción química entre $O_2(^1\Delta_g)$ y flavonoles (Quer y 3-HF), k_r^{Fla} , flavonoles en mezclas acuosas metanol-buffer Tris 7,8.

%H ₂ O	$k_r/10^5 M^{-1} seg^{-1}$	
	3-HF	Quer
0	2,5±0,63	9,0±1,2
10	14,0± 1,1	57,0± 3,0
20	21,0±0,4	110,0± 0,4
30	24,0± 2,4	79,0± 5,1
40	35,0± 7,6	120,0± 22,0
50	67,0± 9,2	200,0± 27,06

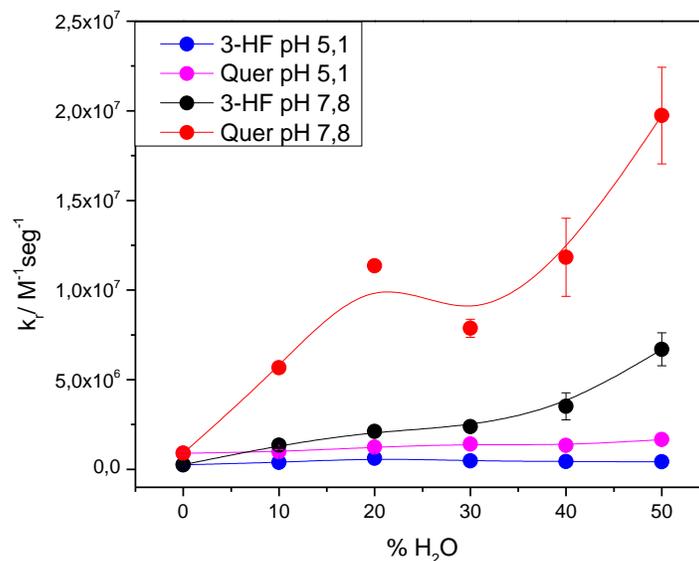


Figura 17.- Gráfico de la constante de velocidad de reacción química del 1O_2 con flavonol, 3-HF y Quer, versus porcentaje de agua a diferentes pH en metanol.

En el gráfico de la Figura 17 se puede observar que la variación en el valor de constante de velocidad de reacción química del 1O_2 con los flavonoles, Quer y 3-HF, a medida que aumenta el porcentaje de agua en el medio, es

considerablemente mayor cuando se utiliza un tampón Tris pH 7,8 en la mezcla de solvente, que cuando se utiliza tampón de acetato con pH 5,1.

A pH 7,8 la variación en la constante de velocidad de reacción química para 3-HF y Quer es de 27 y 22 veces, respectivamente, cuando se la compara con la constante de velocidad de reacción del $^1\text{O}_2$ con flavonoles en metanol como solvente, Figura 17.

La desprotonación de los grupos hidroxilos jugaría un rol clave en la reactividad de los flavonoles frente al oxígeno molecular singulete. El pK_a del grupo hidroxilo del anillo C es menor para la 3-HF que para la Quer. Esta diferencia, es consistente con la mayor variación en la constante de velocidad de reacción para la 3-HF, comparando los dos pH estudiados. A pH 7,8 el porcentaje de especies desprotonadas, correspondiente al grupo hidroxilo del anillo C, para la 3-HF y Quer es de 71% y 3,9% respectivamente. Esta diferencia en la concentración de especies desprotonadas, es la responsable de que la 3-HF se vea más favorecida a pH más básico que la Quer. Sin embargo, la Quer es mejor antioxidante que la 3-HF en los dos pH estudiados.

Debido a limitaciones de solubilidad del sustrato como del actinómetro los valores de constantes de velocidad de reacción entre el oxígeno molecular singulete y los flavonoles fueron insuficientes para realizar correlaciones multiparamétricas estadísticamente válidas.

5.3. Efecto de la presencia de iones divalentes. Cambio en la reactividad de los flavonoles con $O_2(^1\Delta_g)$

En esta memoria se estudió la interacción de los flavonoles 3-HF y Quer con cationes alcalinos térreos (Mg y Ca) y la interacción de Quer con Cu(II). El estudio contempla la interacción flavonol-catión y la reactividad de este aducto con oxígeno molecular singlete.

5.3.1. Estudio espectroscópico de la interacción de flavonoles con iones divalente

En la Figura 17 se muestra la variación en el espectro de absorción de Quer resultante de la interacción con el catión Cu(II). Los diferentes espectros corresponden a modificaciones en las relaciones molares de $[Cu]/[Quer]$. Se puede observar la aparición de una nueva banda a mayor longitud de onda que correspondería al aducto Quer-Cu. El corrimiento batocrómico observado puede ser explicado por la extensión del sistema conjugado de la Quer¹⁹.

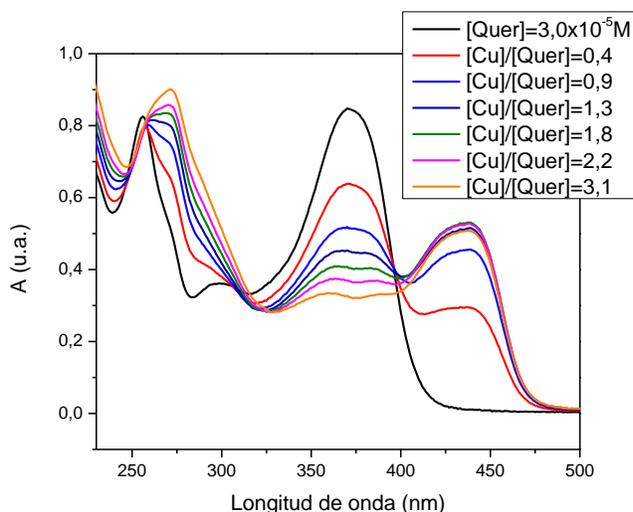


Figura 18.- Espectro de absorción UV-vis de Quer a diferentes razones molares $[Cu]/[Quer]$, en metanol. $[Quer]=3,0 \times 10^{-5} M$, $[Cu(II)]=1,3 \times 10^{-5}-1,7 \times 10^{-4} M$.

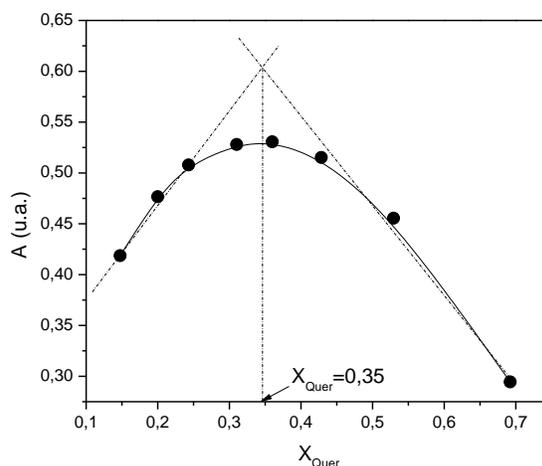


Figura 19.- Determinación de la relación estequiométrica de la reacción entre Quer y Cu en metanol, absorbancia medida a 438nm.

La estequiometría del aducto Quer-Cu se realizó utilizando el método de Job's, Figura 19, midiendo el cambio en la absorción a 438nm. Así a medida que aumenta la relación molar entre Quer y Cu, la absorbancia del producto formado aumenta hasta un máximo, a una fracción molar que corresponde a la estequiometría del aducto, luego la absorbancia disminuye. La relación estequiométrica obtenida para la reacción entre Quer y Cu fue a 2:1.

A pesar que la determinación de la estequiometría de la reacción Quer-Cu fue de 2:1, se observó que, la absorbancia de la solución que contiene una relación estequiométrica 2:1 Quer:Cu, disminuía en el tiempo, incluso si la solución se encontraba protegida de la luz, por lo que se consideró importante la determinación de la estabilidad de la solución en el tiempo. Como resultado de este estudio se encontró que la estabilidad de las soluciones depende de la razón molar entre Quer y Cu. La solución es estable cuando la relación molar $[Cu]/[Quer]$ igual a 0,5. Soluciones con razones molares mayores a 1,0 no son estables, la estabilidad en el tiempo de las diferentes soluciones a distintas razones molares $[Cu]/[Quer]$ se muestran en la Figura 20.

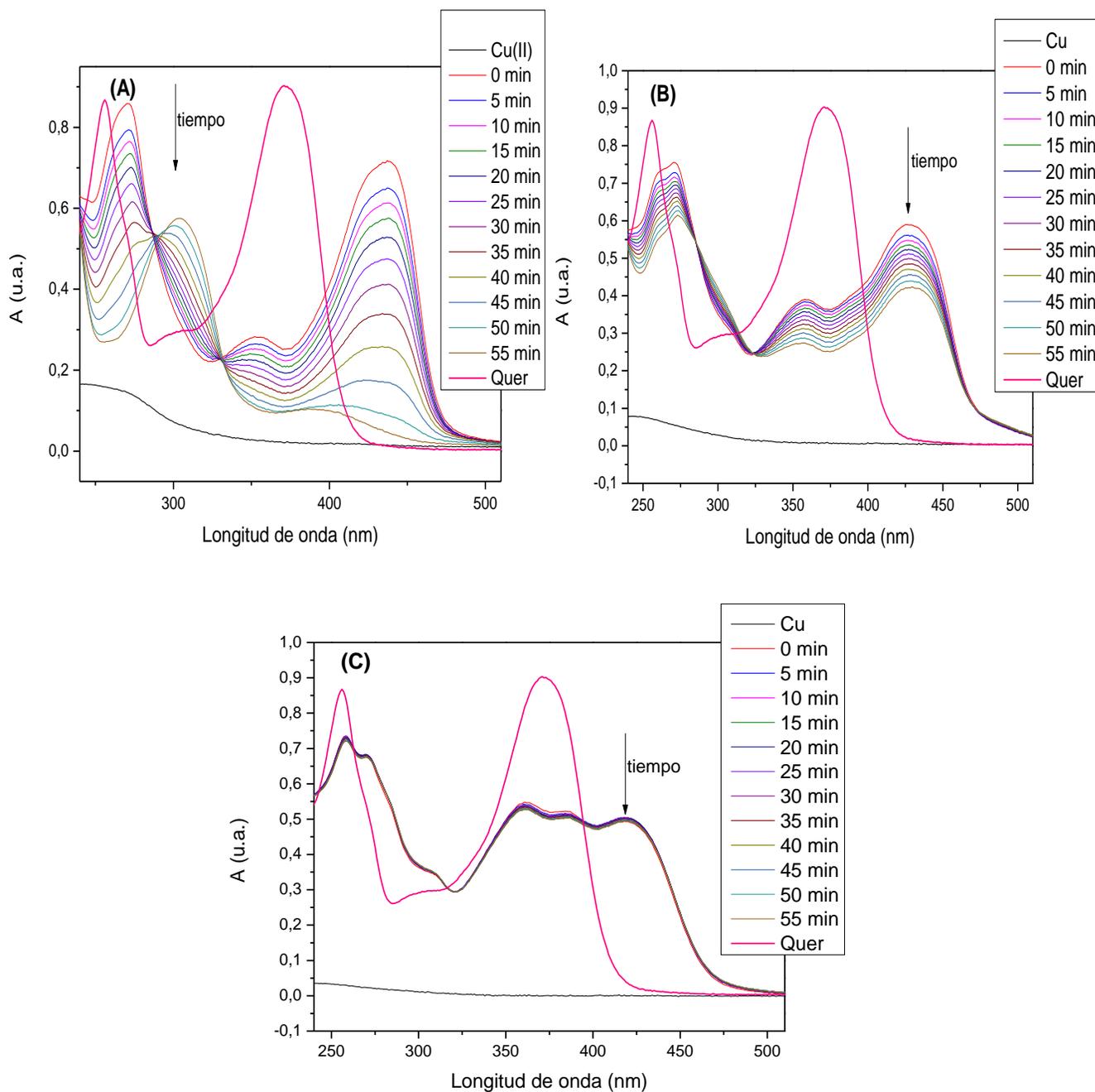


Figura 20.- Estabilidad del aducto Quer-Cu en metanol a diferentes razones molares. (A) $[Cu]/[Quer]=2,0$. (B) $[Cu]/[Quer]=1,0$. (C) $[Cu]/[Quer]=0,5$.

La dependencia de la estabilidad de la Quer enlazada a Cu(II) se debe a que este complejo se autooxida, este proceso se muestra en las ec. 6-8 de la

sección 1.2.3. El Cu(II) es reducido a Cu(I) cuando se encuentra enlazado a Quer produciendo QuerS (producto de la oxidación) y peróxido de hidrógeno el cual es un agente oxidante que reaccionaría con Quer libre, produciendo así una disminución en la absorbancia tanto de Quer como del complejo Quer-Cu sin necesidad de un agente externo al sistema.

Por otra parte, la interacción entre la Quer y el catión Mg(II) se muestra en la Figura 21, donde se observa el cambio en el espectro de absorción de Quer por la presencia de Mg, al igual que en el caso Quer-Cu, se observa la aparición de una nueva banda sobre los 420nm con una disminución en la absorbancia de las dos bandas características de la Quer, esto implicaría que la formación del complejo con Mg estaría involucrando a los sustituyentes de los dos grupos cromóforos. El espectro de absorción de la Quer presenta una leve variación cuando se adiciona Mg, con respecto a la presencia del catión Cu donde el espectro de absorción de la Quer presenta notorios cambios.

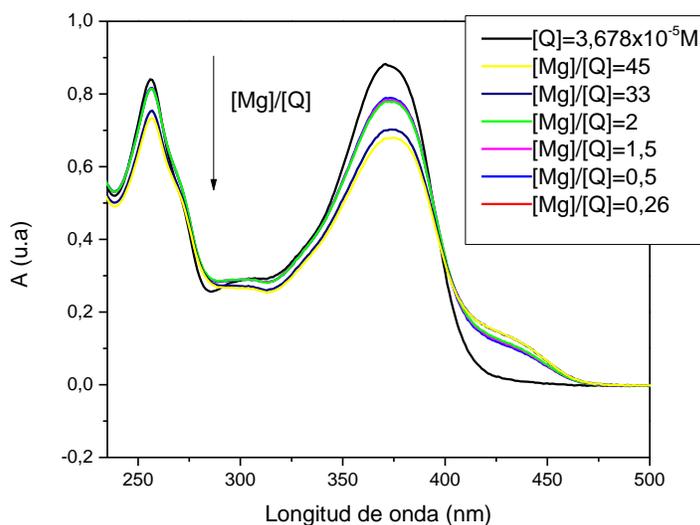


Figura 21.- Espectro de absorción de la Quer en presencia de Mg utilizando diferente razones molares en metanol. [Quer]= $3,7 \times 10^{-5}$ M, [Mg(II)]= $9,5 \times 10^{-6}$ - $1,7 \times 10^{-3}$ M.

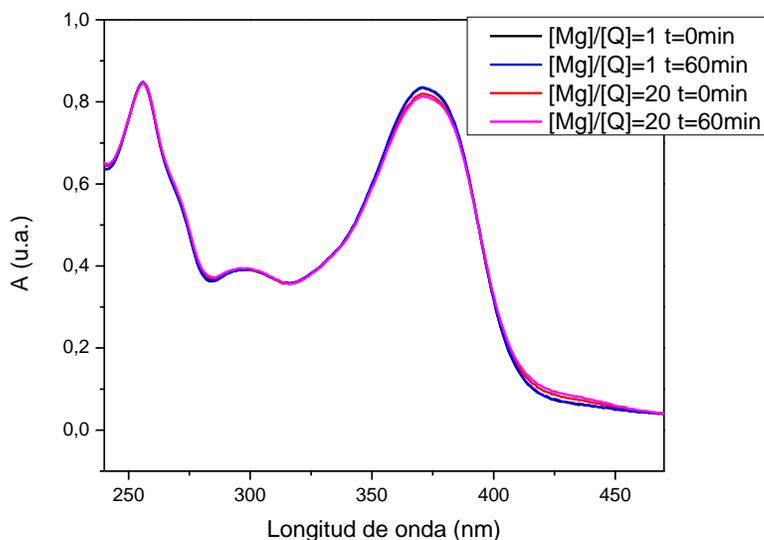


Figura 22.- Estabilidad del aducto Q-Mg en el tiempo para dos razones molares en metanol.

Por otro lado, la interacción de la Quer con cationes Ca(II) a bajas relaciones molares $[Ca(II)]/[Quer]$ (hasta $[Ca(II)]/[Quer]=4$), muestra leves cambios en el espectro de absorción, Figura 23 (A). Esta leve modificación podría tener dos posibles explicaciones; i) cierta dificultad para la formación de un enlace entre Quer y Ca, ii) la formación de nuevos enlaces no estaría afectando de forma significativa los cromóforos. Por el contrario, a altas relaciones molares $[Ca(II)]/[Quer]$ los cambios espectrales son notorios. Además se observó que el aducto Quer-Ca es estable en el tiempo, para diferentes razones de $[Ca]/[Quer]$, como se muestra en la Figura 24, los espectros de absorción UV-vis no cambian significativamente su forma a diferencia de la interacción de Quer-Cu que a ciertas razones muestra una disminución de absorbancia del sistema.

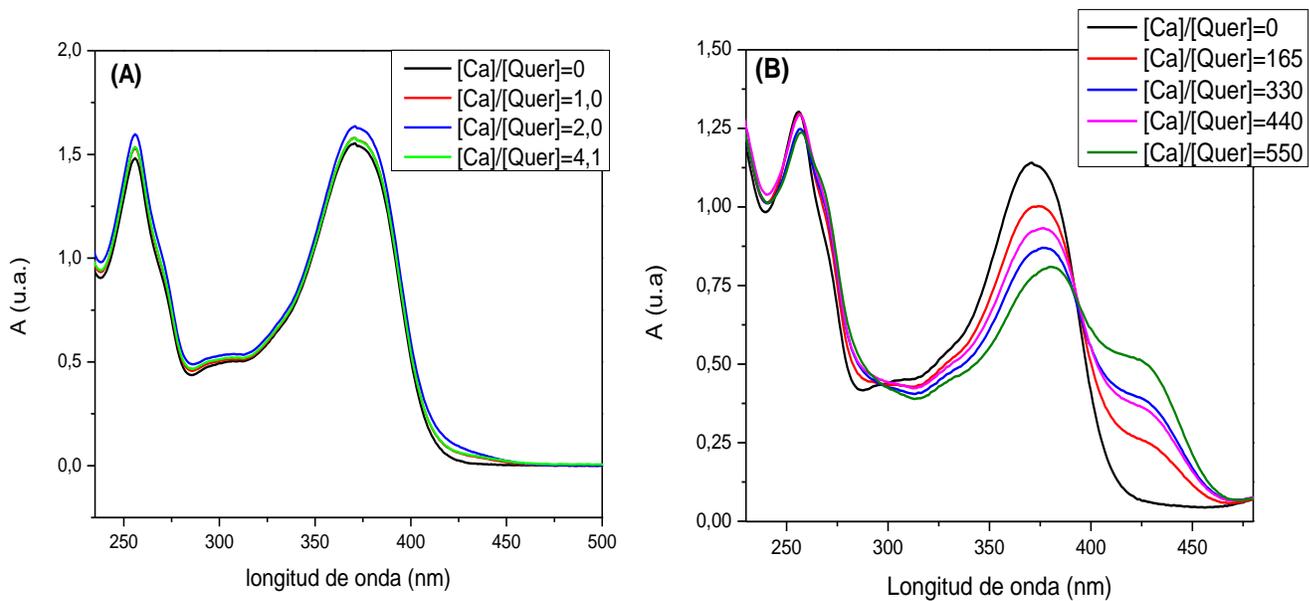


Figura 23.- Espectro de absorción de la Quer en ausencia y presencia de Ca utilizando diferente razones molares en metanol.

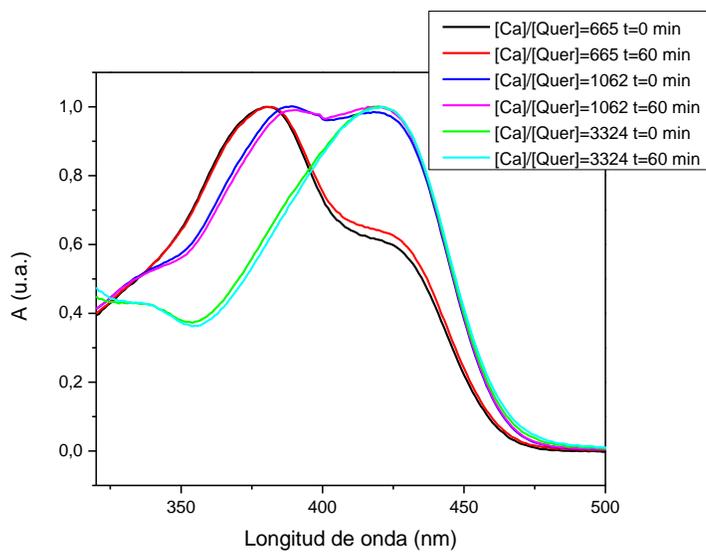


Figura 24.- Estabilidad del aducto Quer-Ca en el tiempo para diferentes razones $[Ca]/[Quer]$ en metanol.

Existen diferencias considerables entre la formación de un complejo con iones de metales de transición y cationes alcalinos térreos. Se ha encontrado en la literatura que la reacción entre la Quer y Ca involucraría la formación de un complejo iónico, esto debido a que el radio de los iones es mayor que el radio de la cavidad entre el grupo carbonilo de la posición 4 y el hidroxilo de la posición 3²⁹, en cambio la reacción entre Cu(II) y Quer es a través de la formación de un quelato.

De los estudios espectroscópicos de la interacción de Quer con los tres cationes divalentes se puede concluir que; i) Todas las interacciones resultan en la aparición de una nueva banda, sobre los 400 nm. ii) La banda característica de Quer de mayor energía presenta diferencias para los dos tipos de cationes, para el Cu la banda sufre un corrimiento batocrómico y una deformación, en cambio para los cationes alcalinos térreos sólo sufre una disminución en la absorción. iii) La interacción con Ca a bajas razones molares no produce cambios significativos en el espectro de absorción, a diferencia del Mg en el cual se observa la aparición de un hombro en la banda de mayor longitud de onda. Roshal et. al. propone que la formación del aducto Quer-Ca requeriría que la Quer se encontrara ionizada³⁰, este requisito no se cumple utilizando metanol como solvente por lo que la reacción no estaría siendo favorecida.

Análogamente se estudió la interacción de la 3-HF con cationes alcalinos térreos (Mg y Ca). En la Figura 25 se muestra el cambio en el espectro de absorción correspondiente a 3-HF en presencia de Mg, se puede apreciar una nueva banda de absorción la cual posee un máximo alrededor de 410nm que podría corresponder a la 3-HF enlazada a Mg. En la Figura 26 se muestra que la solución de 3-HF en presencia de catión Mg es estable en el tiempo, a diferentes razones molares $[Mg(II)]/[Quer]$.

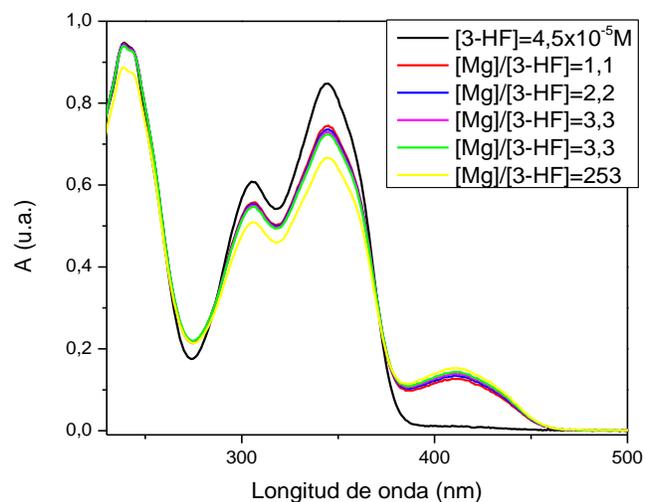


Figura 25.- Espectro de absorción de la 3-HF en ausencia y presencia de Mg a diferente razones molares en metanol. $[3\text{-HF}] = 4,5 \times 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Mg(II)}] = 5,0 \times 10^{-5} - 1,1 \times 10^{-2} \text{M}$

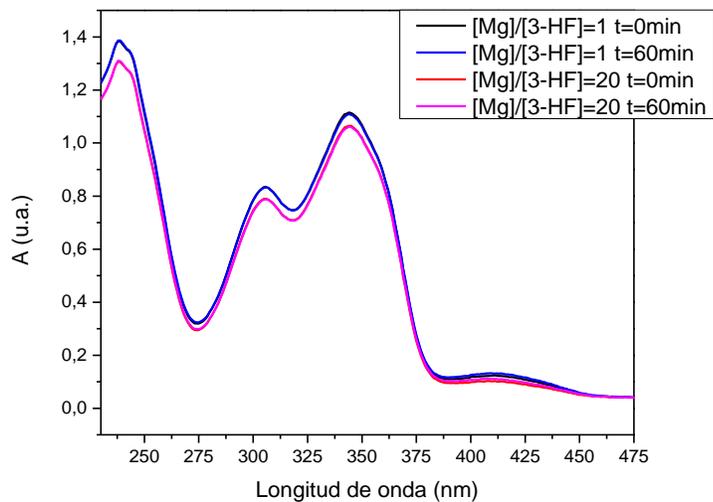


Figura 26.- Estabilidad del aducto 3-HF-Mg en el tiempo para dos razones molares en metanol.

Por otra parte, la interacción de 3-HF con Ca se muestra en la Figura 27, donde se observa la aparición de una nueva banda a mayores longitudes de onda, con un máximo de absorción aproximadamente a 410nm. La forma de

este espectro de absorción es muy similar al espectro con Mg como catión divalente, sin embargo, las concentraciones de catión en solución son mayores, variando desde 90-1523 veces más Ca que 3-HF.

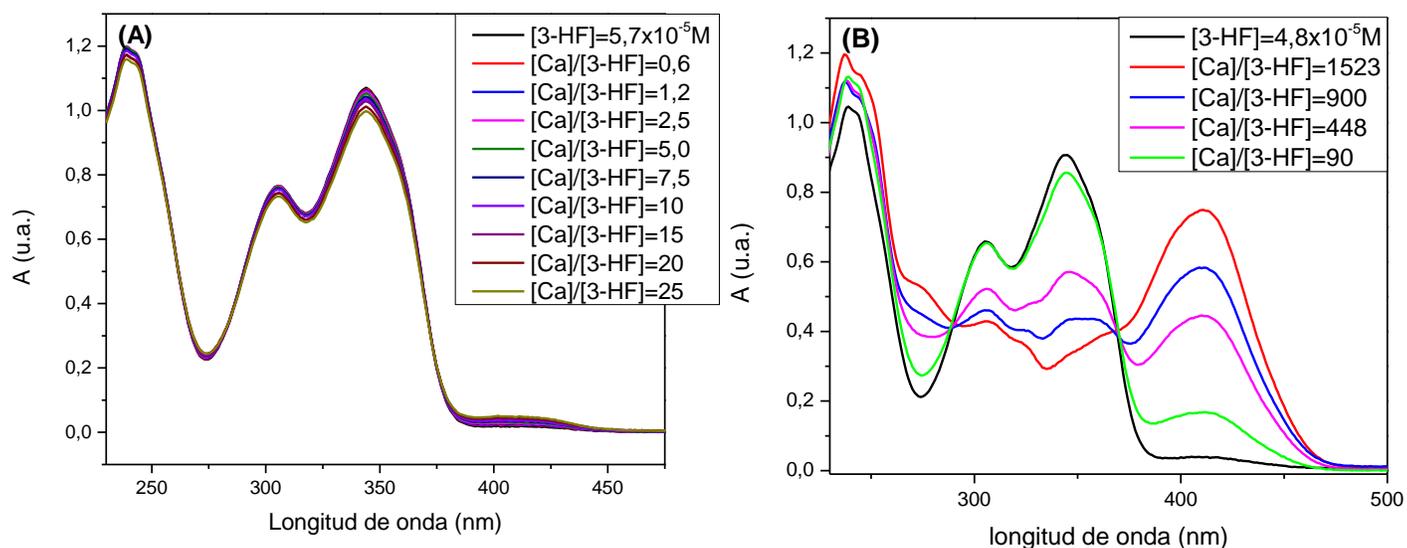


Figura 27.- Espectro de absorción de la 3-HF en ausencia y presencia de Ca utilizando diferente razones molares en metanol.

(A): [3-HF]= $5,7 \times 10^{-5} \text{M}$, [Ca(II)]= $3,4 \times 10^{-5}$ - $1,4 \times 10^{-4} \text{M}$.

(B): [3-HF]= $4,8 \times 10^{-5} \text{M}$, [Ca(II)]= $7,3 \times 10^{-2}$ - $4,3 \times 10^{-3} \text{M}$.

En la Figura 28 se muestra la estabilidad de la solución de 3-HF en presencia de Mg(II), se observa que la solución es estable en el tiempo para las diferentes razones molares $[Mg(II)]/[3-HF]$.

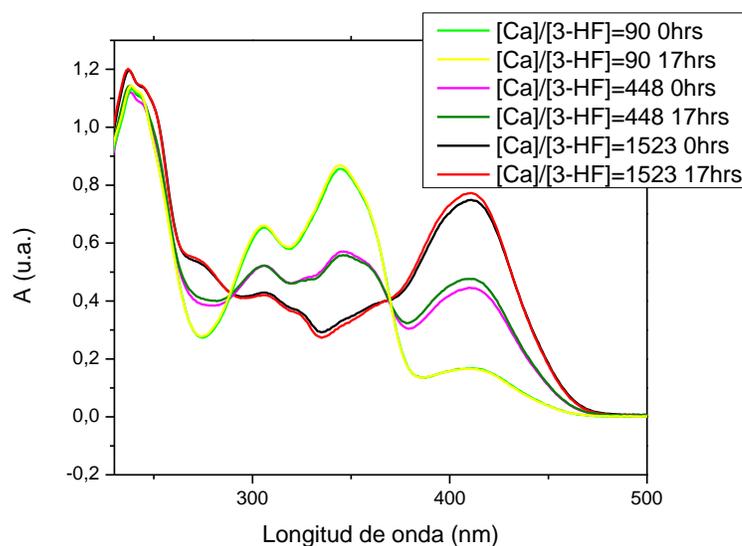


Figura 28.- Estabilidad del aducto 3-HF-Ca en el tiempo para diferentes razones $[Ca]/[3-HF]$ en metanol.

De los estudios espectroscópicos de la interacción de la 3-HF con cationes alcalinos térreos se puede decir que; i) Al adicionar pequeñas concentraciones de Ca, razones molares $[Ca]/[3-HF]$ entre 1 y 3, no se observan cambios significativos en las bandas de absorción. Para el caso del Mg se observa la aparición de una nueva banda a mayor longitud de onda, para las mismas razones molares $[Mg]/[3-HF]$. Esto indica la dificultad, posiblemente estérica, que tiene el Ca para poder enlazar en los grupo 3-OH y 4-oxo del anillo C. ii) La banda de menor longitud de onda característica de la 3-HF, sufre una pequeña disminución de la absorbancia en presencia de los dos cationes.

Comparando los espectros de absorción UV-vis de los diferentes flavonoles para el mismo catión se puede decir que; i) Para los flavonoles, Quer y 3-HF, en presencia de Mg se observa la aparición de una nueva banda a longitudes de onda mayores, sin embargo, la banda de la 3-HF es más definida

ya que para la Quer se encuentra solapada. ii) Para ambos cationes, la banda característica del flavonol de menor longitud de onda, sólo sufre una disminución en su absorción.

5.3.2. Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete con flavonoles en presencia de iones divalente

La determinación de la constante de velocidad de reacción química, utilizando espectroscopia UV-vis como método analítico, es más compleja debido a que las bandas del espectro de absorción de los flavonoles y del aducto de éstos con iones divalentes se encuentran muy superpuestas. Por lo que no se tiene claridad de la forma del espectro de la interacción entre flavonol y los cationes.

Para la determinación de la constante de velocidad de reacción entre oxígeno molecular singulete y el aducto flavonol-cación en metanol se utilizó como actinómetro 9,10-DMA, para esto las fotólisis se realizaron en las mismas condiciones experimentales mencionadas en la sección 4.1.

En la determinación de la constante de velocidad de reacción de $^1\text{O}_2$ y Quer-Cu se utilizó una relación molar de $[\text{Cu}]/[\text{Quer}]$ igual a 0,5, a pesar de no ser ésta la estequiometría del aducto determinada anteriormente, pero sí es la solución que presenta mayor estabilidad en el tiempo. En la Figura 29 se encuentra el espectro de absorción del proceso de foto-oxidación de Quer-Cu en presencia de rosa de bengala como sensibilizador y metanol como solvente.

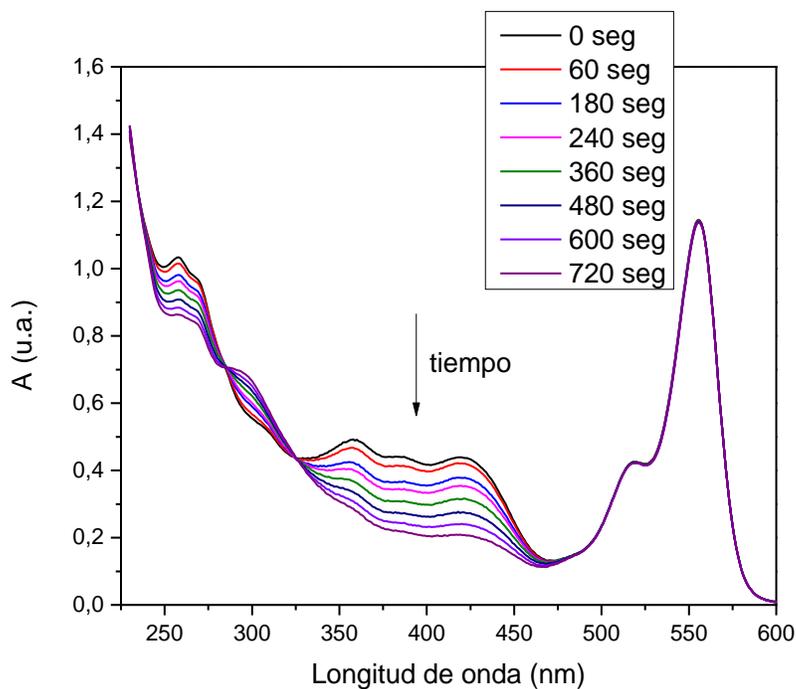


Figura 29.- Disminución de la absorción durante la foto-oxidación de Quer en presencia de Cu(II). Sens: RB, solvente: metanol, [Cu]/[Quer]=0,5.

Se observa un aumento en la constante de velocidad de reacción del $^1\text{O}_2$ y Quer en presencia de Cu, este aumento corresponde a 6,3 y 4,6 veces, respecto a la solución libre de Cu, cuando el consumo de las especies reactivas se determina en 420 y 358 nm respectivamente, como se muestra en la Tabla 7. En la Figura 30 se puede observar que la cinética de la reacción con Cu se ajusta a un tratamiento de pseudo primer orden al igual que en la reacción de Quer libre con $^1\text{O}_2$.

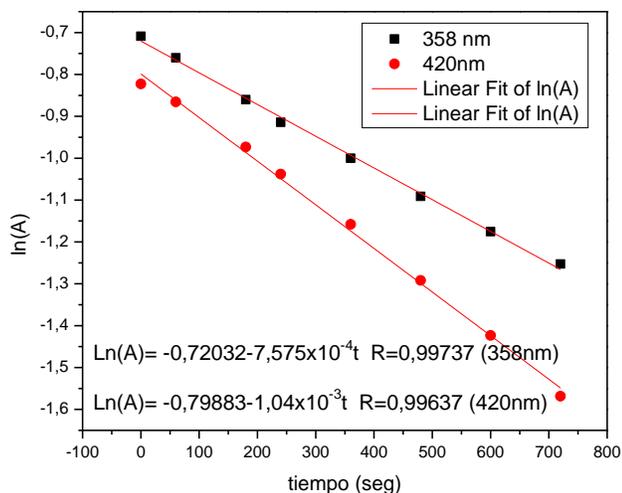


Figura 30.- Ajuste para tratamiento de pseudo-primer orden para la foto-oxidación de Quer en presencia de Cu(II), en metanol.

Tabla 7.- Constante de velocidad de reacción química para Quer y Quer-Cu, a dos longitudes de onda, en metanol y para una relación molar [Cu]/[Quer]=0,5.

	$k_r / M^{-1} s^{-1}$
Quer	$9,0 \times 10^5$
Quer-Cu (358nm)	$6,3 \times 10^6$
Quer-Cu (420nm)	$8,6 \times 10^6$

Para la evaluación de la constante de velocidad reactiva entre Quer y oxígeno molecular singulete en presencia de Mg, se realizaron tres fotólisis utilizando tres relaciones estequiométricas, [Quer]:[Mg]; 1:0, 1:1 y 1:2.

En la Figura 31 se encuentra el gráfico del tratamiento de pseudo primer orden, para los datos cinéticos obtenidos para la foto-oxidación de Quer en presencia de Mg.

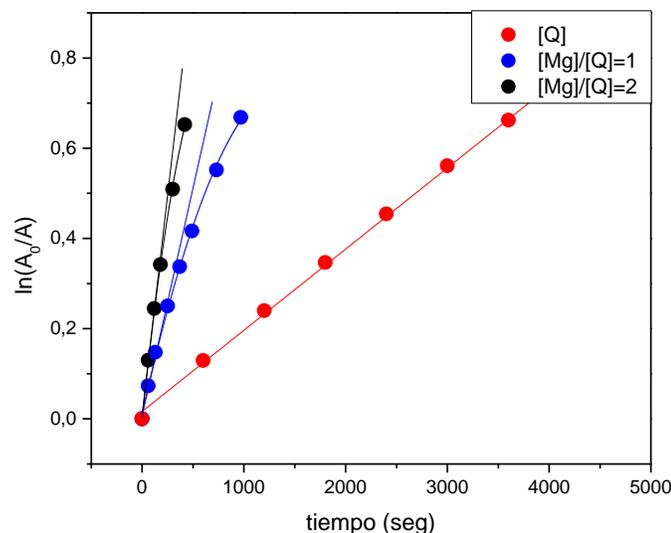


Figura 31.- Representación del ajuste de un polinomio de grado dos y de su pendiente inicial para la reacción de Quer con oxígeno molecular singulete a diferentes concentraciones de Mg.

De la Figura 31 se observa que la cinética de reacción tiene una desviación negativa respecto al ajuste de pseudo primer orden, el cual debería ser una recta, esta desviación implica que la absorbancia, como medida de concentración, es mayor a la esperada. Este efecto puede tener tres posibles explicaciones; i) la absorbancia medida no corresponde sólo a una especie, por lo tanto, la disminución de la Quer estaría siendo afectada por la superposición de la banda correspondiente a la posible asociación entre Quer y Mg ii) el ajuste de los datos experimentales no correspondería a un tratamiento cinético de pseudo-primer orden, iii) disminución en la concentración de oxígeno molecular singulete, que podría ser menor si se abren nuevas vías de consumo. Para aclarar esta última posibilidad es necesario realizar medidas de constante de desactivación resueltas en el tiempo. Sin embargo, esta medición es necesaria complementarla con un análisis más detallado de los aspectos señalados en los otros dos puntos mencionados. Para esto se debe desarrollar un método

analítico apropiado para poder realizar la determinación de la concentración del analito de interés en el tiempo y del tipo de cinética a la cual se ajusta.

Los valores de las constantes de velocidad reactivas de $^1\text{O}_2$ y Quer para las diferentes concentraciones Mg en el medio se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8.- Dependencia de la constante de velocidad de la reacción entre $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y Quer con la concentración de Mg presente en el medio.

[Mg]/[Quer]	$k_r / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 371nm
0	$9,0 \times 10^5$
1	$5,4 \times 10^6$
2	$1,1 \times 10^7$

Se observa que la constante de velocidad de reacción aumenta 22 veces cuando la concentración de Mg es igual a la concentración de Quer, y 30 veces cuando la concentración de Mg duplica la concentración de Quer. Este resultado permite postular que el aducto formado entre la Quer y Mg es más reactivo frente al oxígeno molecular singulete que la Quer libre.

Por otra parte, para el estudio de la cinética para la reacción entre oxígeno molecular singulete y Quer en presencia de Ca, se asume nuevamente una cinética de pseudo primer orden. Como las bandas de absorción se encuentran superpuestas, se cuantifica a partir de la banda correspondiente al flavonol.

Los valores obtenidos para la constante de velocidad de reacción (Tabla 9) muestran un notable cambio a medida que la concentración de Ca aumenta, esto es debido probablemente a una asociación de Quer con Ca. El aducto formado presentaría una mayor reactividad frente al $^1\text{O}_2$ que la Quer libre, como se desprende del aumento de la constante de velocidad de reacción a medida que aumenta la concentración de Ca en el medio.

Tabla 9.- Dependencia de la constante de velocidad de reacción con la concentración de Ca presente en el medio para la reacción de Quer con $^1\text{O}_2$.

$[\text{Ca}^{2+}] \text{ M}$	$[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Quer}]$	$k_r / \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$
0	0	$2,7 \times 10^6$
$2,3 \times 10^{-3}$	55	$2,2 \times 10^7$
$4,5 \times 10^{-3}$	110	$4,3 \times 10^7$
$6,0 \times 10^{-3}$	165	$5,1 \times 10^7$
$1,4 \times 10^{-2}$	330	$7,5 \times 10^7$
$1,8 \times 10^{-2}$	440	$9,5 \times 10^7$
$2,3 \times 10^{-2}$	550	$1,2 \times 10^8$
$3,2 \times 10^{-2}$	770	$1,2 \times 10^8$
$3,3 \times 10^{-2}$	792	$1,3 \times 10^8$
$4,2 \times 10^{-2}$	1019	$1,4 \times 10^8$
$7,0 \times 10^{-2}$	1698	$1,6 \times 10^8$

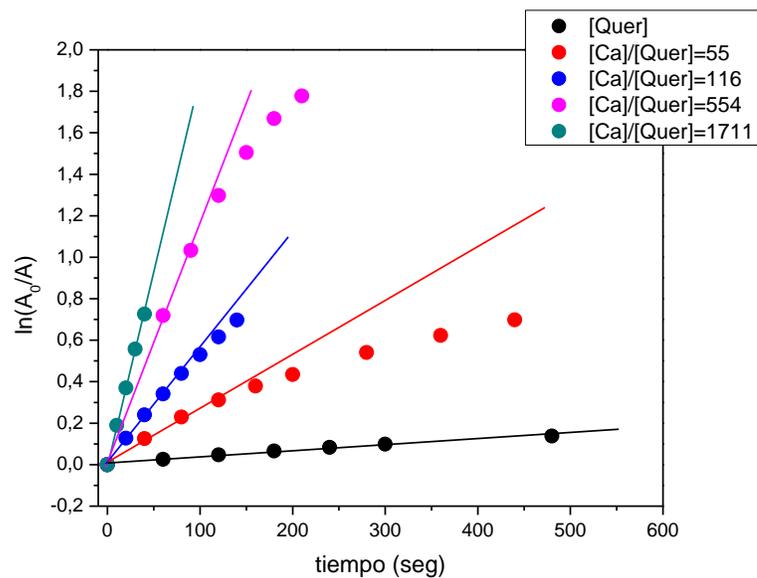


Figura 32.- Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de Quer con $^1\text{O}_2$ en presencia de $\text{Ca}(\text{II})$ a diferentes razones molares $[\text{Ca}]/[\text{Quer}]$.

En la Figura 32 se muestra la cinética de la foto-oxidación de Quer en presencia de diferentes concentraciones de Ca, se observa que las curvas experimentales presentan una desviación negativa respecto a la linealidad esperada para un ajuste de pseudo primer orden. Al igual que en el caso de la foto-oxidación de la Quer en presencia de Mg, este comportamiento se puede explicar considerando las tres posibilidades ya mencionadas.

El estudio de la foto-oxidación de la 3-HF en presencia de Mg, corresponde a tres fotólisis con distintas razones de [3-HF]:[Mg]; 1:1, 1:2, 1:20. Para realizar el ajuste a una cinética de pseudo primer orden se considera la banda centrada en 344nm, las constante de velocidad reactiva para la diferente razones se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10.- Dependencia de la constante de velocidad de reacción con la concentración de Mg presente en el medio para la reacción de 3-HF con 1O_2 .

[Mg]/[3-HF]	$k_r / M^{-1}s^{-1}$ ~344nm
0	$2,5 \times 10^5$
1	$1,1 \times 10^7$
2	$1,2 \times 10^7$
20	$1,5 \times 10^7$

Se observa que la constante de velocidad reactiva de 1O_2 y 3-HF en presencia de Mg aumenta en 44 veces cuando la concentración de Mg es igual a la del flavonol, además se puede observar un leve aumento en la constante de velocidad cuando la concentración de Mg es mayor que la concentración de 3-HF, alcanzado un valor de la constante de velocidad 60 veces mayor que la constante de velocidad en ausencia de Mg. El aumento en la constante se puede deber a la formación de un nuevo producto entre la 3-HF y Mg.

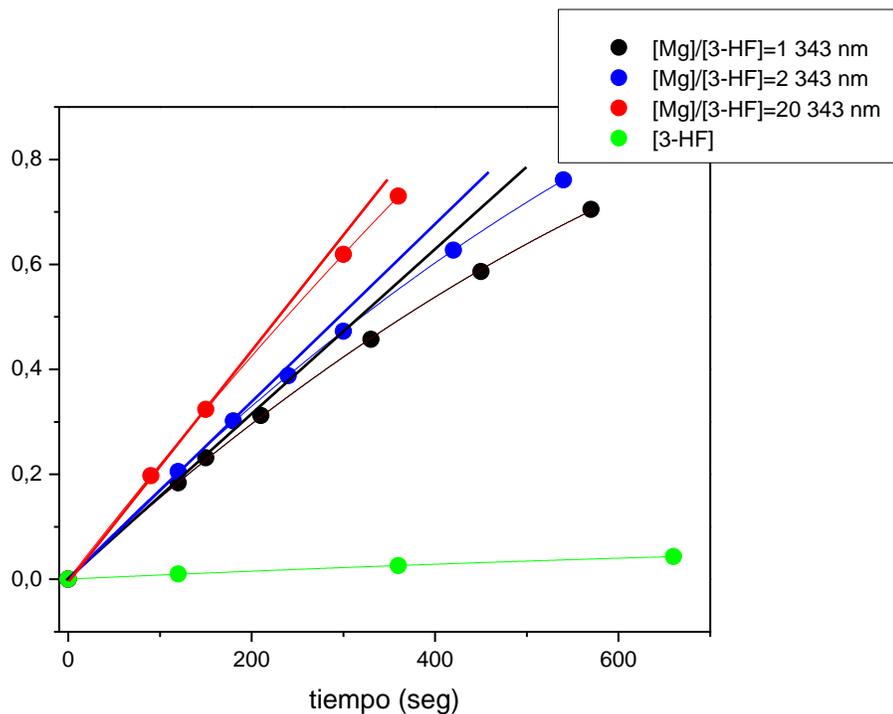


Figura 33.- Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de 3-HF con $^1\text{O}_2$ en presencia de Mg(II) a diferentes razones molares $[\text{Mg}]/[\text{3-HF}]$.

En la Figura 33 se muestra el ajuste de pseudo primer orden de las cinéticas entre 3-HF y oxígeno molecular singulete en presencia de Mg, observándose la disminución de la absorbancia de la banda del espectro de absorción, que posee un máximo aproximado en 343, para todas las relaciones molares $[\text{Mg}]/[\text{3-HF}]$ estudiadas. Se observa que los datos experimentales tienen una desviación negativa respecto a la linealidad esperada para un tratamiento de pseudo primer orden. Esto implica que la absorbancia es menor que la esperada, lo que se puede entender en términos de los argumentos que se dieron para la foto-oxidación de Quer en presencia de Mg. Se observa que para relaciones molares $[\text{Mg}]/[\text{3-HF}]$ igual a 1 y 2 la desviación es más pronunciada que para la relación molar $[\text{Mg}]/[\text{3-HF}]$ igual a 20.

En la cinética de la foto-oxidación de 3-HF en presencia de Ca se realizó un ajuste de pseudo primer orden. Las constantes de velocidad de reacción

química obtenidas para las diferentes concentraciones de Ca utilizadas se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11.- Dependencia de la constante de velocidad de reacción química para la 3-HF con $^1\text{O}_2$ dependiente de la concentración de Ca presente en el medio.

$[\text{Ca}^{2+}] / \text{M}$	$[\text{Ca}^{2+}] / [\text{3-HF}]$	$k_r / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (344nm)
0	0	$2,9 \times 10^5$
$4,7 \times 10^{-3}$	90	$2,4 \times 10^7$
$2,3 \times 10^{-2}$	448	$1,6 \times 10^7$
$4,7 \times 10^{-2}$	900	$1,0 \times 10^8$
$8,0 \times 10^{-2}$	1523	$1,1 \times 10^8$

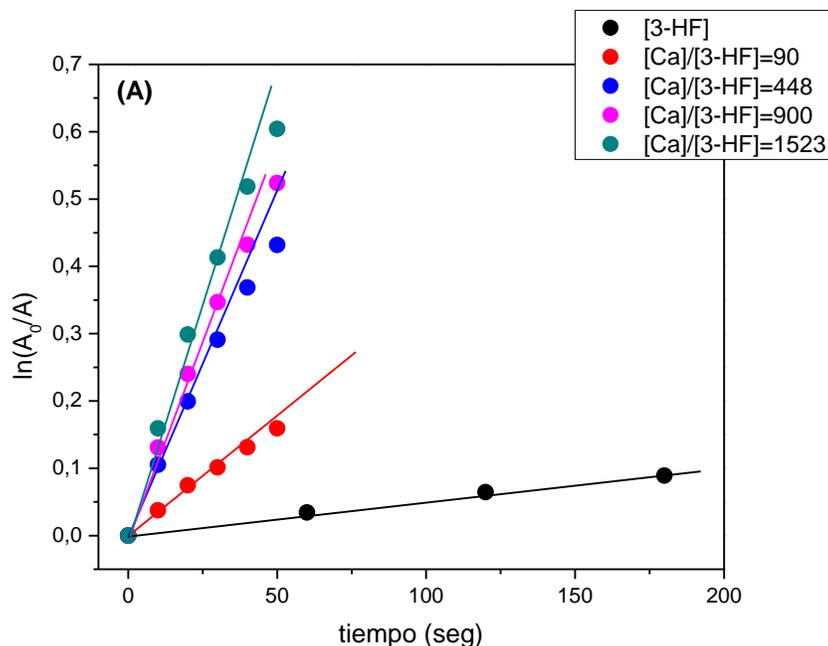


Figura 34.- Ajuste cinético de pseudo primer orden para la reacción de 3-HF con $^1\text{O}_2$ en presencia de Ca(II) a distintas razones molares $[\text{Ca}]/[\text{3-HF}]$.

En la Figura 34 se muestran los tratamientos cinéticos de pseudo primer orden. Se observa que la desviación es notoriamente menor que para las cinéticas estudiadas anteriormente.

Se observa un aumento en la constante de velocidad de reacción química a medida que aumenta la concentración de Ca presente en el medio. Esto puede significar que la absorción a 344nm, no es únicamente de la 3-HF y que en la misma región pueda estar absorbiendo el posible aducto entre la 3-HF y Mg.

De la interacción de los dos flavonoles estudiados en presencia de Ca se podría decir que a iguales razones molares, la constante de velocidad reactiva entre $^1\text{O}_2$ y Fla son similares, indicando reactividades similares. Sin embargo, es destacable mencionar el aumento en la reactividad respecto a los flavonoles libres, la 3-HF tiene un aumento en su reactividad frente al $^1\text{O}_2$ de 86 veces y el aumento para la Quer corresponde a 56 veces respecto a la Quer libre.

Para la reacción de los dos flavonoles, Quer y 3-HF, con Mg y su posterior reactividad con oxígeno molecular singulete podemos concluir que el efecto del Mg es mayor cuando se utiliza 3-HF. La velocidad de reacción aumenta 44 veces cuando la concentración Mg y 3-HF son iguales, en cambio, el aumento en la velocidad de reacción para la Quer es de 6 veces.

La diferencia en el aumento de la constante de velocidad de reacción de oxígeno molecular singulete y flavonoles, 3-HF y Quer, en presencia de cationes, podría originarse en las diferencias estructurales entre la 3-HF y Quer. La Quer, a diferencia de la 3-HF, posee más sitios en los cuales los cationes pueden interactuar, los cuales no estarían directamente involucrados en sitio de la reacción, provocando que el aumento en la reactividad no sea tan considerable como el que se observa para la 3-HF.

6. Conclusiones

- El estudio del efecto solvente sobre la reacción entre 9,10-Dimetilantraceno y $O_2 (^1\Delta_g)$ muestra que la constante de velocidad de reacción depende de la capacidad del solvente de estabilizar cargas y dipolos. En esta memoria se ha confirmado la influencia del agua cuando la reacción se lleva a cabo en metanol, observándose un aumento de 4 veces en la constante de velocidad cuando el porcentaje de agua llega al 50%, por lo que se corrobora la naturaleza dipolar del intermediario.
- Las constantes de velocidad de reacción entre diferentes flavonoles y $O_2(^1\Delta_g)$ en metanol, muestran dependencia con la sustitución presente en los anillos aromáticos A y B. A mayor número de grupos hidroxilo en el anillo B, mayor es la reactividad, como se confirma por el orden de reactividad obtenido Miric=Quer>Fise>Kaemp>3-HF.
- La constante de velocidad de reacción entre flavonol y $O_2(^1\Delta_g)$ es influenciada por la cantidad de agua presente en la mezcla metanólica. La variación en el valor de la constante dependerá del pH del medio acuoso. A pH más básico el aumento en la cantidad de agua provocará un incremento mayor en la constante de velocidad de reacción entre el flavonol y oxígeno molecular singulete que a pH más ácido. Esto se debe a la desprotonación de los grupos hidroxilos. A igual concentración de agua pero pH creciente en el medio, la constante reactiva aumenta 16 veces para la 3-HF.
- El estudio de la reacción de Quer con Cu(II), muestra que la banda de absorción sufre un corrimiento batocrómico, la banda correspondiente a la Quer libre desaparece completamente cuando la relación molar Quer:Cu es de 1:2. El mismo corrimiento batocrómico se observa cuando se utilizan cationes alcalinos térreos, sin embargo, no se observa que la banda correspondiente al flavonol libre desaparezca. El cambio en el

espectro de absorción es menor a medida que aumenta el radio del catión.

- La reactividad de los flavonoles (3-HF y Quer) frente a oxígeno molecular singulete aumenta en presencia de cationes divalentes, esta variación en la reactividad se debe probablemente a formación de un aducto entre el flavonol y el catión que es más reactiva. Los dos flavonoles estudiados, 3-HF y Quer, presentan diferentes cambios en la reactividad, la molécula Quer posee más sitios que pueden interaccionar con los cationes los cuales no influyen directamente en el centro de la reacción con oxígeno molecular singulete. Por otra parte, la molécula 3-HF sólo presenta un sitio de interacción con el catión, influenciando directamente el centro de la reacción, esto produciría un mayor aumento en la reactividad para la 3-HF que para la Quer frente a oxígeno molecular singulete.

7. Bibliografía.

1. Ogilby, P. R., Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39 (8), 3181-3209.
2. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B., Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1993**, 22 (1), 113-262.
3. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J., Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 233-234, 351-371.
4. Foote, C. S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, 54 (5), 659-659.
5. Dam, N.; Keszthelyi, T.; Andersen, L. K.; Mikkelsen, K. V.; Ogilby, P. R., Effect of Solvent on the $O_2(a^1\Delta_g) \rightarrow O_2(b^1\Sigma_g^+)$ Absorption Spectrum: Demonstrating the Importance of Equilibrium vs Nonequilibrium Solvation. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, 106 (21), 5263-5270.
6. Merkel, P. B.; Kearns, D. R., Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94 (21), 7244-7253.
7. Hurst, J. R.; Schuster, G. B., Nonradiative relaxation of singlet oxygen in solution. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, 105 (18), 5756-5760.
8. Schweitzer, C.; Schmidt, R., Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews* **2003**, 103 (5), 1685-1757.
9. Lissi, E. A.; Encinas, M. V.; Lemp, E.; Rubio, M. A., Singlet oxygen $O_2(^1D_g)$ bimolecular processes. Solvent and compartmentalization effects. *Chemical Reviews* **1993**, 93 (2), 699-723.
10. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F., Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* **1999**, 65 (4), 337-353.
11. Sánchez, S. R. Flavonoides con actividad antitumoral: Identificación y estudio del mecanismo de acción. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, 2009.
12. (a) K. Raj Narayana, M. S. R., M.R, Chaluvadi, D.R. Krishna, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* **2001**, 33, 2-16; (b)

- Procházková, D.; Bousová, I.; Wilhelmová, N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82* (4), 513-523.
13. Gotewold, E., *The Science of Flavonoids*. Springer: 2006.
 14. (a) Herrero-Martinez, J. M.; Sanmartin, M.; Roses, M.; Bosch, E.; Rafols, C., Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *26* (10), 1886-1895; (b) Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A.; Rietjens, I., The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31* (7), 869-881.
 15. Valenzuela, J. E. M. Estudio del efecto protector de flavonoides como atrapadores de oxígeno molecular singulete en modelos de membrana fosfolipídica. Dependencia del medio, de la estructura y reactividad. Universidad de Chile, Santiago, 2008.
 16. Manuela Silva, M.; Santos, M. R.; Caroço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; ccedilalo; Mira, L., Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research* **2002**, *36* (11), 1219-1227.
 17. (a) Torreggiani, A.; Tamba, M.; Trincherro, A.; Bonora, S., Copper(II)-quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure* **2005**, *744*, 759-766; (b) Jurd, L.; Geissman, T. A., Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. *The Journal of Organic Chemistry* **1956**, *21* (12), 1395-1401; (c) Chen, W. J.; Sun, S. F.; Cao, W.; Liang, Y.; Song, J. R., Antioxidant property of quercetin-Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion. *Journal of Molecular Structure* **2009**, *918* (1-3), 194-197; (d) Mira, L.; Fernandez, M. T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M. H.; Jennings, K. R., Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research* **2002**, *36* (11), 1199-1208; (e) Hajji, H. E.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O., Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research* **2006**, *40* (3), 303-320; (f) Malesev, D.; Kuntic, V., Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2007**, *72* (10), 921-939; (g) Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M., Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (17), 6343-6351; (h) Dangleterre, L.; Cornard, J. P.; Lapouge, C., Spectroscopic and theoretical investigation of the solvent effects on Al(III)-hydroxyflavone complexes. *Polyhedron* **2008**, *27* (6), 1581-1590; (i) Lapouge, C.; Dangleterre, L.; Cornard, J. P., Spectroscopic and theoretical studies of the Zn(II) chelation

- with hydroxyflavones. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110* (45), 12494-12500.
18. Pekal, A.; Biesaga, M.; Pyrzynska, K., Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *Biometals* **2011**, *24* (1), 41-49.
 19. Bukhari, S. B.; Memon, S.; Mahroof-Tahir, M.; Bhanger, M. I., Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2009**, *71* (5), 1901-1906.
 20. Canada, A. T.; Giannella, E.; Nguyen, T. D.; Mason, R. P., The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, *9* (5), 441-449.
 21. Matsuura, T.; Matsushima, H.; Sakamoto, H., Photosensitized oxygenation of 3-hydroxyflavones. Possible model for biological oxygenation. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (24), 6370-6371.
 22. Studer, S. L.; Brewer, W. E.; Martinez, M. L.; Chou, P. T., Time-resolved study of the photooxygenation of 3-hydroxyflavone. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (19), 7643-7644.
 23. Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W., Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *The Journal of Organic Chemistry* **1983**, *48* (17), 2877-2887.
 24. Reichardt, C., *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Third, Upsated and Enlarged Edition ed.; 2004.
 25. Marcus, Y., The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chemical Society Reviews* **1993**, *22* (6), 409-416.
 26. (a) Marcus, Y., The use of chemical probes for the characterization of solvent mixtures. Part 2. Aqueous mixtures. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1994**, (8), 1751-1758; (b) Guettari, M.; Aschi, A.; Gomati, R.; Gharbi, A., Structural transition of a homopolymer in solvents mixture. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, *28* (5-6), 811-815.
 27. Olivares, R. E. C. Efecto del solvente en la reacción entre oxígeno molecular singulete y antracenos sustituidos. Tesis Doctoral, Universidad de Chile, Tesis para optar al grado de Doctor en Química, 2009.
 28. Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G., Flavonoids as Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (11), 4846-4851.

29. Roshal, A. D.; Grigorovich, A. V.; Doroshenko, A. O.; Pivovarenko, V. G.; Demchenko, A. P., Flavonols and crown-flavonols as metal cation chelators. The different nature of Ba²⁺ and Mg²⁺ complexes. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102* (29), 5907-5914.
30. Munoz, A.; Roshal, A. D.; Richelme, S.; Leroy, E.; Claparols, C.; Grigorovich, A. V.; Pivovarenko, V. G., Identification and Structural Assessment of Alkaline-Earth Metal Complexes with Flavonols by FAB Mass Spectrometry. *Russian Journal of General Chemistry* **2004**, *74* (3), 438-445.