



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FISICOQUÍMICA  
LABORATORIO DE CINÉTICA Y FOTOQUÍMICA

# **REACTIVIDAD DE FLAVONOIDES FRENTE A $O_2(^1\Delta_g)$ EN PRESENCIA DE METALES**

**Tesis para optar al grado de Doctora en Química**

Jennifer Elizabeth Rodríguez Ramírez

Else Lemp Miranda  
Directora de tesis

Santiago, Chile  
Junio 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Beca CONICYT Doctorado Nacional N°21151626 año 2015

Proyecto FONDECYT N°1150785

## **PRESENTACIÓN EN CONGRESOS**

- 25<sup>th</sup> I-APS Meeting, Santiago, Chile 24–27 mayo 2016
- 17<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, Pisa, Italia 4–8 septiembre 2017
- XIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina 23–27 octubre 2017
- XXXII Jornadas Chilenas de Química, Puerto Varas, Región de Los Lagos, Chile 9–12 enero 2018

## **PUBLICACIONES**

- Valencia G. C., Rodríguez J., Zanocco A. L., Lemp E. 2019. The microelement Calcium enhances the reactivity of Rutin towards singlet oxygen. *Afinidad* 76(586).

## AGRADECIMIENTOS

En este espacio quisiera agradecer a las diferentes personas que estuvieron presentes de alguna u otra forma y que permitieron que el ser doctora fuera una realidad.

En primer lugar, a mi familia, que ha sido un soporte para el diario vivir, especialmente a mi hijo, que le da sentido a todo lo que hago.

Agradezco también a mis amigas y amigos, Kiki, Ale, Christian, Tracy y Kamila que permitieron momentos de distracción y desahogo a lo largo de este proceso. Son pocos, pero los justos y necesarios para hacer la vida más entretenida.

A la profesora Else y al profesor Antonio, por su apoyo académico y humano, por sus consejos, por permitirme realizar mis tesis de pre y postgrado en el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, y por permitirme cultivar mi amor a la fisicoquímica.

Finalmente, quisiera agradecer a la Universidad de Chile porque no solo me permitió estudiar química o hacer un doctorado. Aquí pude desarrollarme como persona, formarme integralmente, participar en la labor académica en diferentes áreas y conocer personas maravillosas de los más diversos conocimientos e historias. Estar aquí marcó mi vida y fue un sueño que tuve desde la infancia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>X</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE	5
1.1.1. <i>Generación de Oxígeno Molecular Singulete</i>	6
1.1.2. <i>Desactivación de Oxígeno Molecular Singulete</i>	10
1.1.3. <i>Oxígeno Molecular Singulete en sistemas biológicos</i>	16
1.2. ANTIOXIDANTES	20
1.2.1. <i>Flavonoides</i>	22
1.3. IONES METÁLICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	31
1.4. ESTUDIOS SOBRE OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE, FLAVONOIDES Y COMPLEJOS FLAVONOIDE METAL	34
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
<b>4. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN</b>	<b>44</b>
4.1. REACTIVOS Y SOLVENTES	44
4.2. INSTRUMENTACIÓN	45
4.2.1. <i>Espectrómetro NIR PicoQuant Fluotime 200</i>	45
4.2.2. <i>Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 265</i>	46
4.2.3. <i>Espectrofotómetro de fluorescencia Quattro</i>	46
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>47</b>
5.1. MÉTODO DE JOB	47
5.2. MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND	47
5.3. FOTÓLISIS DE ESTADO ESTACIONARIO	48
5.4. ESPECTROSCOPIA RESUELTA EN EL TIEMPO	50
5.5. DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE FLAVONOIDES	51
5.6. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS	52
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ESTUDIOS EN MEDIO HOMOGÉNEO</b>	<b>54</b>

6.1. ESTEQUIOMETRÍA Y CONSTANTES DE ASOCIACIÓN DE LOS COMPLEJOS ESTUDIADOS	54
6.2. CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN QUÍMICA, $K_R$ , ENTRE LOS COMPLEJOS Y OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE	64
6.3. CONSTANTE DE VELOCIDAD DE DESACTIVACIÓN TOTAL DE OXIGENO MOLECULAR SINGULETE, $K_T$ , POR LOS COMPLEJOS	73
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ESTUDIOS EN MEDIO MICROHETEROGÉNEO</b>	<b>81</b>
7.1. DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE FLAVONOIDES	81
7.2. CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN QUÍMICA, $K_R$ , ENTRE LOS COMPLEJOS Y OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE	85
7.3. CAMBIO EN EL TIEMPO DE VIDA DEL OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE	92
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>99</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de energía potencial para oxígeno molecular en estado basal triplete y dos primeros estados electrónicamente excitados <sup>(44)</sup> .	6
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso de fotosensibilización del oxígeno molecular singlete. (VR: relajación vibracional; ISC: cruce entre sistemas; ET: transferencia de energía; IC: conversión interna)	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de desactivación del oxígeno molecular singlete.	11
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de interacción de oxígeno molecular singlete con desactivantes.	14
<b>Figura 5.</b> Mecanismos fundamentales de reacción de oxígeno molecular singlete: (i) ene; (ii) adición [2+2]; (iii) adición [2+4].	15
<b>Figura 6.</b> Principales reacciones bioquímicas que conducen a la formación de oxígeno molecular singlete <sup>(104)</sup> .	17
<b>Figura 7.</b> Consumo previsto de oxígeno molecular singlete por blancos intracelulares de una célula tipo de leucocito <sup>(78)</sup> .	19
<b>Figura 8.</b> Estructura química básica de los flavonoides.	22
<b>Figura 9.</b> Desactivación directa de ROS por flavonoides mediante mecanismo HAT (a) y SET (b).	25
<b>Figura 10.</b> Posibles sitios de complejación en una molécula de flavonoide	26
<b>Figura 11.</b> Abundancia de los elementos químicos en el cuerpo humano. No se incluye la serie de lantánidos y actínidos <sup>(179)</sup> .	32
<b>Figura 12.</b> Estructura molecular de los flavonoides a estudiar.	39
<b>Figura 13.</b> Decaimiento de la intensidad de la emisión infrarroja de oxígeno molecular singlete en el tiempo en presencia de morina.	50
<b>Figura 14.</b> Espectros de absorción UV–Vis de flavonoides en metanol.	55
<b>Figura 15.</b> Espectros de absorción de morina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.	56

<b>Figura 16.</b> Espectros de fluorescencia de catequina a concentración variable de ión metálico.	57
<b>Figura 17.</b> Gráficos de Job de complejos formados entre morina y metales de transición.	60
<b>Figura 18.</b> Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de morina por $O_2(^1\Delta_g)$ .	65
<b>Figura 19.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de morina.	66
<b>Figura 20.</b> Relación entre pKa y coeficiente de partición (log P) de flavonoles a diferente pH del medio acuoso.	84
<b>Figura 21.</b> Espectros UV-Vis de la reacción de fotooxidación entre $O_2(^1\Delta_g)$ y complejos de quercetina en liposomas de DPPC.	86
<b>Figura 22.</b> Espectros UV-Vis de la reacción de fotooxidación entre $O_2(^1\Delta_g)$ y complejos de morina en liposomas de DPPC.	87
<b>Figura 23.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos de quercetina en liposomas de DPPC.	88
<b>Figura 24.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos de morina en liposomas de DPPC.	89
<b>Figura 25.</b> Espectros de absorción de quercetina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.	119
<b>Figura 26.</b> Espectros de absorción de 3-hidroxi flavona sin complejar y a concentración variable de ión metálico.	120
<b>Figura 27.</b> Espectros de absorción de luteolina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.	121
<b>Figura 28.</b> Gráficos de Job de complejos formados entre quercetina y metales de transición.	121
<b>Figura 29.</b> Gráficos de Job de complejos formados entre 3-hidroxi flavona y metales de transición.	121
<b>Figura 30.</b> Gráfico de Job de complejo formado entre luteolina y $Cu^{+2}$ .	122

<b>Figura 31.</b> Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con morina. _____	122
<b>Figura 32.</b> Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con quercetina. _____	123
<b>Figura 33.</b> Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con 3–hidroxiflavona. _____	124
<b>Figura 34.</b> Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con luteolina. _____	124
<b>Figura 35.</b> Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con catequina. _____	125
<b>Figura 36.</b> Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de quercetina por $O_2(^1\Delta_g)$ . _____	125
<b>Figura 37.</b> Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de 3–hidroxiflavona por $O_2(^1\Delta_g)$ . _____	126
<b>Figura 38.</b> Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de luteolina por $O_2(^1\Delta_g)$ . _____	126
<b>Figura 39.</b> Espectros de fluorescencia y UV-Vis obtenidos en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de catequina por $O_2(^1\Delta_g)$ . _____	126
<b>Figura 40.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de quercetina. _____	127
<b>Figura 41.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de 3–hidroxiflavona. _____	127
<b>Figura 42.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de luteolina. _____	127
<b>Figura 43.</b> Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación del complejo catequina-Fe. _____	128

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores de $\tau_d$ ( $\mu\text{s}$ ) de varios solventes a diferentes temperaturas. ___	13
<b>Tabla 2.</b> Clases principales de flavonoides <sup>(132,133,134,136)</sup> . _____	23
<b>Tabla 3.</b> Concentración plasmática y cinética luego de administración de flavonoides en humanos <sup>(173)</sup> . _____	31
<b>Tabla 4.</b> Constantes de velocidad de reacción química, $k_r$ , y de desactivación total, $k_T$ , entre oxígeno molecular singulete y flavonoides <sup>(190)</sup> . _____	35
<b>Tabla 5.</b> Constantes de velocidad de reacción química, $k_r$ , y de desactivación total, $k_T$ , entre oxígeno molecular singulete y antocianinas <sup>(191)</sup> . _____	36
<b>Tabla 6.</b> Bandas de absorción UV–Vis de flavonoides en metanol. _____	54
<b>Tabla 7.</b> Estequiometría, constante de asociación y banda de absorción UV-Vis principal de los complejos. _____	63
<b>Tabla 8.</b> Constantes de velocidad de reacción química de los complejos frente a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ . _____	67
<b>Tabla 9.</b> Constante de velocidad de desactivación total del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por flavonoides y complejos. _____	80
<b>Tabla 10.</b> Concentración inicial (i) y final (f) del flavonoide en la fase orgánica, y coeficiente de partición octanol/agua. _____	82
<b>Tabla 11.</b> Concentración inicial (i) y final (f) del flavonoide en la fase orgánica, y coeficiente de partición octanol/buffer pH 7,4. _____	82
<b>Tabla 12.</b> Valores de pKa reportados en la literatura para los flavonoides estudiados. _____	83
<b>Tabla 13.</b> Constantes de velocidad de reacción química de los complejos frente a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en liposomas de DPPC. _____	90
<b>Tabla 14.</b> Valores experimentales para el tiempo de decaimiento de emisión infrarroja de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ( $\tau_D$ ) por flavonoides y complejos flavonoide–metal, incluidos en liposomas de DPPC. _____	93

## RESUMEN

En este trabajo se midió la reactividad de los flavonoides quercetina, morina, 3-hidroxi-flavona, luteolina y catequina frente a  $O_2(^1\Delta_g)$ , en presencia de los iones metálicos  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ , en medio homogéneo y microheterogéneo, mediante la determinación de las constantes de velocidad de reacción química entre los complejos formados y oxígeno excitado, y de las constantes de desactivación total de a  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Mediante el método de Job y el método de Benesi-Hildebrand se determinó la estequiometría de los complejos y la constante de asociación flavonoide-metal en medio homogéneo, respectivamente, obteniéndose como resultado que la mayor parte de los complejos presenta asociación 1:1, a excepción de morina-Cu, morina-Zn, morina-Fe y 3-hidroxi-flavona-Fe, que presentaron estequiometría 2:1. En todos los casos estudiados, se observó valores de constantes de asociación que indican un favorecimiento en la formación de los complejos, los cuales van desde  $15,2 M^{-1}$  para el complejo 3-hidroxi-flavona - Ca hasta  $2,25 \times 10^9 M^{-2}$  para el complejo Morina - Cu. En medio microheterogéneo no se determinó la constante de asociación de los complejos, aunque se pudo demostrar su formación bajo estas condiciones.

La constante de velocidad de reacción química entre los complejos y  $O_2(^1\Delta_g)$ , se obtuvo mediante el método de fotólisis estacionaria. Los resultados obtenidos

en medio homogéneo muestran un aumento en la reactividad para los complejos que presentan estequiometría 1:1 respecto del flavonoide sin complejar, el cual podría deberse al aumento de la densidad electrónica en los sitios reactivos del flavonoide, cuando este se encuentra asociado al ion metálico. Los complejos que presentaron estequiometría 2:1 mostraron bajos aumentos o disminución en la reactividad frente a  $O_2(^1\Delta_g)$  respecto del flavonoide sin complejar. De acuerdo con los resultados obtenidos, la presencia del doble enlace en el anillo C y del grupo 3-OH en el flavonoide, son fundamentales para dar cuenta de la magnitud de la constante de velocidad de reacción química, tanto del flavonoide libre como de los complejos formados con diferentes iones metálicos.

Al comparar los resultados obtenidos para la constante de velocidad de reacción química de los flavonoides y los complejos flavonoide-metal con  $O_2(^1\Delta_g)$ , en medio homogéneo y microheterogéneo, se aprecia que los flavonoides libres son más reactivos en el entorno lipídico, obteniéndose valores mayores en un orden de magnitud respecto de los valores medidos en metanol, sin embargo, los cambios que ocurren en la reactividad una vez los complejos se forman son menos significativos y menos predecibles en el sistema compartimentalizado.

Las constantes de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$  por complejos flavonoide-metal, se determinaron observando el decaimiento de la luminiscencia infrarroja del  $O_2(^1\Delta_g)$ . En los complejos medidos en medio homogéneo, se observó que la

desactivación total es mayor a la reactividad química, lo cual indica que la desactivación física es predominante. Por otra parte, los valores de la constante para los diferentes complejos, es siempre mayor a la del flavonoide sin complejar.

En condiciones de medio microheterogéneo, no fue posible determinar las constantes de asociación de los complejos estudiados, sin embargo, sí se realizó una determinación cualitativa de su capacidad para desactivar  $O_2(^1\Delta_g)$  respecto de los flavonoides libres. El efecto de la disminución en el tiempo de vida es discreto cuando en el medio se agrega solución de los iones metálicos  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . El efecto más importante se observa en los complejos de quercetina y morina formados con  $Cu^{+2}$ , los que presentan las mayores disminuciones en la constante de velocidad de reacción química, pero, a la vez, la mayor disminución en el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Los resultados obtenidos son consecuentes con la hipótesis, ya que, con la formación de complejos, se observa, de forma general, aumentos en la reactividad con oxígeno molecular singulete, respecto de los flavonoides libres. El ion  $Ca^{+2}$  resulta aún más relevante, considerando que su concentración en el medio extracelular puede llegar a 3 mM, por lo que existe gran probabilidad de encuentros con flavonoides y, por lo tanto, de mejoras en la desactivación de esta especie excitada.

## SUMMARY

In this work, the reactivity of the flavonoids quercetin, morin, 3-hydroxyflavone, luteolin and catechin against  $O_2(^1\Delta_g)$  was measured, in the presence of  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  and  $Fe^{+2}$  metal ions, in a homogeneous and microheterogeneous media. Measurements were performed by determining both, the chemical rate constants for reaction between the complexes flavonoid–metal and excited oxygen, and the total deactivation constants of  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Using the Job and the Benesi–Hildebrand methods, the stoichiometry of the complexes and the flavonoid–metal association constant in homogeneous medium, respectively, were determined. Result obtained shows that most of the complexes have 1:1 stoichiometry, except for morina–Cu, morina–Zn, morina–Fe and 3–hydroxyflavone–Fe, which presented stoichiometry 2:1. In all the cases studied, were observed association constant values that indicate a favourable formation of complexes, which range from  $15.2\text{ M}^{-1}$  for the 3-hydroxyflavone–Ca complex to  $2.25 \times 10^9\text{ M}^{-2}$  for the Morina–Cu complex. In the microheterogeneous medium, the association constant of the complexes was not determined, although their formation could be demonstrated under these conditions.

Chemical rate constant for reaction between the complexes and  $O_2(^1\Delta_g)$ , was obtained using the steady–state photolysis method. The results obtained in homogeneous medium show an increase in reactivity for the 1:1 stoichiometry

complexes regarding to the uncomplexed flavonoid. The biggest reactivity of complexes could be due to the increase in the electronic density in the reactive sites of the flavonoid, when it is associated with the metal ion. The complexes that presented 2:1 stoichiometry showed low increases or a decreases in reactivity against  $O_2(^1\Delta_g)$  with respect to the non complexed flavonoid. According to the results obtained, the presence of the double bond in the C ring and the 3-OH group in the flavonoid are essential to account for the magnitude of the chemical reaction rate constant for both, the free flavonoid and the complexes formed with different metal ions.

When comparing the results obtained for the chemical reaction rate constant of flavonoids and flavonoid–metal complexes with  $O_2(^1\Delta_g)$ , in homogeneous and microheterogeneous media, it can be seen that free flavonoids are more reactive in the lipid environment, obtaining values 10–fold greater than those measured in methanol, however, the changes in reactivity once the complexes are formed are less significant and less predictable in compartmentalized system.

The total deactivation constants of  $O_2(^1\Delta_g)$  by flavonoid–metal complexes were determined by observing the decay of the infrared luminescence of  $O_2(^1\Delta_g)$ . In the complexes measured in homogeneous medium, it was observed that the total deactivation is greater than the chemical reactivity, which indicates that the physical deactivation is predominant. On the other hand, the values of the

constant for the different complexes is always greater than that of the uncomplexed flavonoid.

In microheterogeneous medium conditions, it was not possible to determine the association constants of the complexes studied, however, a qualitative determination of their ability to deactivate  $O_2(^1\Delta_g)$  with respect to free flavonoids was made. The effect of the decrease in lifetime is slight when the metal ions  $Ca^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  were added to the medium. The most important effect is observed for quercetin and morin complexes with  $Cu^{+2}$ , which have the greatest decreases in the chemical reaction rate constant, but, at the same time, the greatest decrease in the lifetime of  $O_2(^1\Delta_g)$ .

The results obtained in this work are consistent with the hypothesis, since in general, the flavonoid–metal complexes showed an increase in reactivity with singlet molecular oxygen when are compared with the free flavonoids. The  $Ca^{+2}$  ion is even more relevant, considering that its concentration in the extracellular medium can reach 3 mM, so there is a high probability that this ion is associated with flavonoids, therefore, intensifying the deactivation of this excited species of oxygen.

## 1. INTRODUCCIÓN

El oxígeno molecular es esencial para la vida de todos los organismos aeróbicos<sup>(1)</sup>. A pesar de tener un número par de electrones, presenta características de birradical, debido a la degeneración que presenta su orbital molecular de mayor energía, teniendo dos electrones desapareados con multiplicidad de spin triplete. La mayoría de las moléculas orgánicas en su estado basal presentan multiplicidad de spin singulete, por lo que el oxígeno en su estado basal no reacciona con la mayoría de ellas, ya que estas reacciones son prohibidas por spin, a pesar de ser energéticamente favorables<sup>(2)</sup>.

La vida en la Tierra comenzó con la aparición de organismos anaeróbicos en una atmósfera con bajo contenido de O<sub>2</sub>, sin embargo, la aparición progresiva de organismos fotosintéticos hace 3,5 billones de años atrás<sup>(3)</sup>, aumentó su concentración hasta alcanzar la que se presenta en la actualidad, correspondiente al 21% de la composición atmosférica. Este aumento de concentración significó que las especies anaeróbicas debieron evolucionar hacia especies que en su metabolismo tuvieran mecanismos antioxidantes, para protegerlos de la toxicidad de esta molécula oxidante. Una parte de estos organismos, además de tener mecanismos antioxidantes, evolucionaron para utilizarlo en diferentes transformaciones metabólicas y para la producción eficiente de energía. Los organismos que han logrado este nivel de desarrollo se conocen como especies u organismos aeróbicos<sup>(4,5)</sup>.

La cadena transportadora de electrones es el mayor consumidor de  $O_2$  en las células de los mamíferos<sup>(6)</sup>. Permite la formación de moléculas de adenosín trifosfato (ATP), el cual es la fuente de energía de todos los seres vivos, a través de un proceso llamado fosforilación oxidativa o metabolismo aeróbico<sup>(7,8)</sup>. Estas reacciones ocurren en la mitocondria, organelo de las células eucariotas localizado en el citoplasma y separado de este por una doble membrana<sup>(9,10,11,12)</sup>. Entre el 1% y 2% del oxígeno molecular usado por la mitocondria en la cadena respiratoria, es parcialmente reducido a anión radical superóxido, el que luego es metabolizado a peróxido de hidrógeno<sup>(13,14,15,16)</sup>. Ambas moléculas pertenecen a un conjunto llamado especies reactivas de oxígeno o ROS, que incluye radicales de oxígeno como radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ) e hidroperoxilo ( $HOO^{\bullet}$ ); y ciertos agentes no radicalarios como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HCl$ ), ozono ( $O_3$ ) y oxígeno molecular singulete ( $^1O_2$ )<sup>(4,16,17)</sup>. Estas especies no solo pueden ser generadas en la mitocondria, sino que también en el medio intracelular por la enzima xantina oxidasa, y en el medio extracelular por neutrófilos y macrófagos<sup>(18,19,20)</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno cumplen un rol fundamental en los organismos vivos, un nivel basal de estas moléculas es necesario para procesos biológicos básicos<sup>(21)</sup>. Estas especies son agentes antibacterianos; reguladores redox de la fosforilación de proteínas, canales iónicos y factores de transcripción; y potenciales agentes antineoplásicos. Además, participan en la transducción de señales específicas para variadas funciones celulares y activan mecanismos de

defensa que previenen el daño celular. También se requieren ROS para procesos biosintéticos como la producción de hormonas tiroideas y reticulación de la matriz extracelular<sup>(22,23,24,25)</sup>.

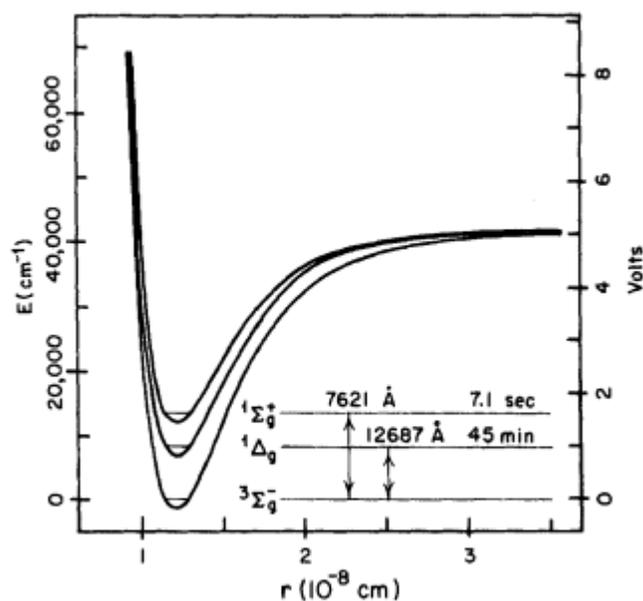
Los niveles de ROS en los sistemas biológicos se encuentran en estado estacionario, es decir, su concentración permanece casi invariable en el tiempo gracias a sistemas reguladores que las mantienen a bajos niveles<sup>(26)</sup>. Sin embargo, cuando se produce un desbalance entre la producción de estas especies y su eliminación, encontrándose concentraciones finales superiores a las requeridas para las distintas funciones biológicas que desempeñan, se genera un estado denominado estrés oxidativo, en que las ROS pueden causar daño a diferentes macromoléculas como ADN, lípidos, polisacáridos y proteínas<sup>(27,28,29)</sup>. Las causas del desbalance en la concentración de ROS pueden ser variadas: (i) un aumento en el nivel de compuestos endógenos y exógenos que ingresan a la autooxidación junto con la producción de ROS; (ii) el agotamiento de las reservas de antioxidantes de baja masa molecular; (iii) inactivación de enzimas antioxidantes; (iv) disminución en la producción de enzimas antioxidantes y antioxidantes de baja masa molecular; y (v) ciertas combinaciones de dos o más de los factores enumerados anteriormente<sup>(30)</sup>.

Algunos estudios asocian diferentes fisiopatologías con el estrés oxidativo. Por ejemplo, la preeclamsia, enfermedad multiorgánica que se puede producir en mujeres gestantes con más de 20 semanas de gestación, se produciría por una

exacerbación de la disfunción de células endoteliales, generado por el aumento de ROS<sup>(31,32)</sup>. También afectaría la fertilidad en hombres, ya que los espermatozoides pueden generar especies reactivas de oxígeno, pero no son capaces de reparar el daño causado por la oxidación, afectando la concepción tanto natural como asistida<sup>(33)</sup>. Además, algunas evidencias indicarían que el estrés oxidativo es el mayor factor que contribuye a la iniciación o progresión de diferentes enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y Huntington, además de isquemia cerebral y esclerosis lateral amiotrófica<sup>(34)</sup>. Estas enfermedades tienen un factor de riesgo común correspondiente al envejecimiento, y la evidencia muestra que el estrés oxidativo aumenta con la edad<sup>(35,36)</sup>. Otra enfermedad que toma relevancia en condiciones de estrés oxidativo es el cáncer<sup>(37,38)</sup>, una de las principales causas de muerte en el mundo de acuerdo a datos entregados por la Organización Mundial de la Salud<sup>(39)</sup>, en el que este estado oxidativo tiene un rol crucial en el desarrollo y progresión de la enfermedad, donde las células se adaptan al estrés provocado por las especies oxidantes a través de mutaciones al material genético, contribuyendo a transformaciones malignas de estas e impulsando el desarrollo de esta patología<sup>(40,41,42)</sup>. En resumen, el estrés oxidativo está asociado a diferentes enfermedades, así como al envejecimiento y la expectativa de vida<sup>(36)</sup>.

## 1.1. Oxígeno Molecular Singulete

El oxígeno molecular singulete [ $O_2(^1\Delta_g)$ ], una de las especies reactivas del oxígeno, es un agente oxidante no radicalario que corresponde al estado excitado de más baja energía del oxígeno molecular. Su energía es de 22,5 Kcal por sobre el estado basal y al decaer genera una luminiscencia infrarroja característica a 1270 nm. El oxígeno molecular en su estado basal tiene dos electrones desapareados en el orbital molecular de mayor energía, lo que le otorga una multiplicidad de espín triplete, mientras que, en el primer estado excitado, tiene todos sus electrones apareados, presentando multiplicidad de espín singulete. Esto hace que presente una química muy diferente al oxígeno molecular triplete o basal, siendo sustantivamente más reactivo, ya que las reacciones en que participa son permitidas por espín<sup>(43)</sup>. Además, se ha descrito un estado singulete excitado de mayor energía, [ $O_2(^1\Sigma_g)$ ], ubicado a 37,5 Kcal por sobre el estado basal (Fig. 1). El estado  $^1\Sigma_g$  tiene un tiempo de vida intrínseco en fase gas de 7,1 segundos, mucho más corto que el tiempo de vida reportado para el estado  $^1\Delta_g$ , igual a 2700 segundos<sup>(44)</sup>. Por otra parte, en fases condensadas el estado  $^1\Sigma_g$  decae rápidamente al estado excitado de menor energía, por lo que habitualmente no es considerado en los procesos que ocurren en solución.



**Figura 1.** Diagrama de energía potencial para oxígeno molecular en estado basal triplete y dos primeros estados electrónicamente excitados<sup>(44)</sup>.

### 1.1.1. Generación de Oxígeno Molecular Singulete

Se han descrito una diversidad de métodos para generar oxígeno molecular singulete en solución, los que son utilizados según las necesidades de cada experimento.

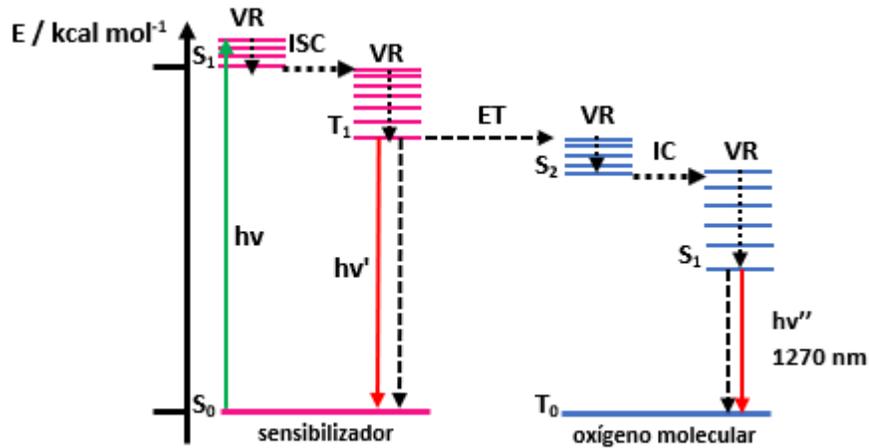
Entre los métodos utilizados para la generación de  $\text{O}_2(1\Delta_g)$ , se pueden considerar: (i) excitación directa de oxígeno en estado basal. En este método, una solución, sometida a altas presiones de oxígeno, se irradia con un láser Nd:YAG<sup>(45,46)</sup>, y se produce la transición electrónica de la molécula en el medio de reacción. Sin embargo, esta técnica no es muy utilizada debido a su baja

eficiencia; (ii) descarga de microondas a través de una corriente de oxígeno gaseoso, que genera como productos oxígeno  $^1\Delta_g$  y  $^1\Sigma_g$ , átomos de oxígeno y ozono. Los dos últimos se remueven en una reacción con vapor de mercurio, y el estado excitado de mayor energía de la molécula de oxígeno decae rápidamente al estado  $^1\Delta_g$ , luego la corriente generada es burbujeada en la solución con el sustrato a oxidar<sup>(47)</sup>. Esta metodología fue utilizada por Corey y Taylor<sup>(48)</sup> en el año 1964 para confirmar la existencia del oxígeno molecular singulete; (iii) reacción química entre peróxido de hidrógeno e ion hipoclorito o hipobromito, metodología utilizada por Khan y Kasha<sup>(49)</sup> en el año 1963 al observar la luminiscencia característica del  $O_2(^1\Delta_g)$ , también descrita por Foote y Wexler<sup>(50)</sup> al año siguiente; y (iv) fotosensibilización, método comúnmente utilizado para la generación de oxígeno excitado en el laboratorio, que se explicará con mayor detalle.

La fotosensibilización consiste en un proceso de transferencia de energía desde un sensibilizador fotoexcitado al oxígeno molecular en estado basal para generar  $O_2(^1\Delta_g)$ . El primer estado singulete excitado del sensibilizador ( $S_1$ ) se genera por absorción directa de energía, en un sistema bajo irradiación continua a una longitud de onda específica, la que se selecciona de acuerdo con la máxima absorción de esta molécula. Desde este estado excitado, puede ocurrir transferencia de energía directamente al oxígeno en estado basal, sin embargo, el proceso es prohibido por espín, por lo que resulta favorable solo si el estado singulete excitado del sensibilizador tiene largos tiempos de vida. Típicamente el

mecanismo involucra la formación de un complejo de encuentro triplete, que en algunos casos evoluciona a un exciplexo de transferencia de carga. Cuatro pares de productos diferentes, como resultado de procesos permitidos por espín, pueden generarse a partir de estos transientes:  $O_2(^1\Delta_g)$  y el estado  $T_1$  del sensibilizador; oxígeno  $^3\Sigma_g$  y el estado  $T_2$  del sensibilizador; oxígeno  $^3\Sigma_g$  y el estado  $T_1$  del sensibilizador; oxígeno  $^3\Sigma_g$  y el estado fundamental del sensibilizador. Es evidente que el primer proceso, formación de  $O_2(^1\Delta_g)$  y el estado  $T_1$  del sensibilizador, posibilita que para algunos sensibilizadores el rendimiento cuántico de  $O_2(^1\Delta_g)$  pueda ser tan grande como igual a 2. Si el tiempo de vida del sensibilizador en estado singulete es muy corto, puede decaer al estado basal ( $S_0$ ), volviendo al ciclo de irradiación y excitación, o cruzar al triplete excitado ( $T_1$ ). La desactivación de sensibilizadores en estado triplete por oxígeno en estado fundamental, es el mecanismo más común para producir oxígeno molecular singulete. El complejo de encuentro, formado por una colisión entre el sensibilizador triplete y el oxígeno  $^3\Sigma_g$ , de multiplicidad singulete, triplete o penruplete, puede descomponerse liberando la molécula fotosensibilizadora y la molécula de oxígeno, ambas sin cambios. El complejo de encuentro de multiplicidad singulete, genera como productos el sensibilizador en estado basal y oxígeno excitado singulete ( $O_2(^1\Delta_g)$  o  $^1\Sigma_g$ ); los productos del complejo triplete son oxígeno  $^3\Sigma_g$  y  $S_0$ , mientras que para el complejo de multiplicidad 5, no se han descrito canales reactivos<sup>(43,51,52)</sup>. La interconversión de los estados excitados

involucrados en la producción de oxígeno molecular singlete por fotosensibilización, se muestran en la Fig. 2.



**Figura 2.** Esquema del proceso de fotosensibilización del oxígeno molecular singlete. (VR: relajación vibracional; ISC: cruce entre sistemas; ET: transferencia de energía; IC: conversión interna)

Para que una molécula sea un buen sensibilizador, debe tener un conjunto de características: (i) alto coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda de excitación; (ii) estados tripletes con tiempos de vida largo (superiores a 1  $\mu$ s); (iii) energía del estado triplete superior a la del estado excitado del oxígeno (mayor que 22,5 Kcal/mol); (iv) rendimiento cuántico de estado triplete sobre 0,4; (v) no reaccionar químicamente con oxígeno molecular singlete; y (vi) alta fotoestabilidad, para evitar su consumo durante la fotosensibilización<sup>(53)</sup>. La elección del sensibilizador para un experimento en particular va a depender de diversos factores, entre otros, eventual reactividad con el sustrato a oxidar, la

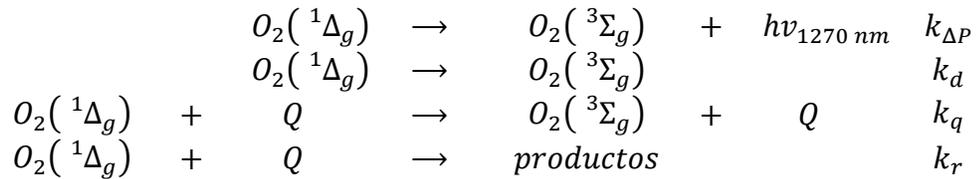
solubilidad en el medio de reacción y rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete en el medio de reacción.

Entre las moléculas utilizadas como fotosensibilizadores se pueden encontrar: colorantes orgánicos, entre los que destacan rosa de bengala, azul de metileno y eosina, que tienen rendimientos cuánticos sobre 0,5<sup>(54)</sup>; hidrocarburos aromáticos, por ejemplo, naftalenos<sup>(55)</sup>, antracenos<sup>(56)</sup>, bifenilos<sup>(57)</sup> y quinonas<sup>(58,59)</sup>; porfirinas y ftalocianinas, donde las primeras tienen como característica principal estar presentes en sistemas naturales, por lo que pueden ser utilizadas para generar oxígeno molecular singulete en sistemas de interés biológico<sup>(60)</sup>; complejos de metales de transición, con ligandos derivados de ftalocianinas, 2,2'-bipiridina y 1,10-phenanthrolina, y centros metálicos entre los que se incluyen Ru(II), Os(II), Ir(III) y Zn(II), entre otros<sup>(61,62,63,64)</sup>. Recientemente, también se han sintetizado nuevos fotosensibilizadores que incluyen en su estructura 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos (BODIPY)<sup>(65,66)</sup> o se han funcionalizado nanopartículas y quantum dots con algunas moléculas como azul de metileno o ftalocianinas<sup>(67,68)</sup>.

### **1.1.2. Desactivación de Oxígeno Molecular Singulete**

La desactivación del  $O_2(^1\Delta_g)$  puede ocurrir mediante tres vías: desactivación radiativa ( $k_{\Delta P}$ ), desactivación física con el solvente ( $k_d$ ) y por interacciones con desactivantes presentes en el medio. La interacción del

O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) con desactivantes puede ocurrir de dos formas: desactivación física (k<sub>q</sub>), y reacción química (k<sub>r</sub>) (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema de desactivación del oxígeno molecular singlete.

### 1.1.2.1. Desactivación radiativa

La desactivación radiativa del oxígeno molecular singlete corresponde al decaimiento de la especie excitada desde el estado singlete al estado basal triplete, por emisión fosforescente en el infrarrojo cercano a 1270 nm. El proceso de desactivación radiativo sigue una cinética de primer orden, la constante de velocidad se representa por  $k_{\Delta P}$ , y su valor se determina del inverso del tiempo de vida medio ( $\tau_m$ ) de la molécula aislada, igual a 45 minutos.  $\tau_m$  puede disminuir en presencia de otros gases y es dependiente de la presión parcial estos, de acuerdo con la Ec.1 <sup>(69)</sup>.

$$1/\tau_{\Delta P} = (2,6 \times 10^{-4})(1 + 3,8P_{O_2} + 3,0P_{CO_2} + 0,7P_{N_2}) \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde

$\tau_m$ , tiempo de vida medio de O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) en segundos;

$P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$  y  $P_{N_2}$ , presión parcial en atmosferas.

### 1.1.2.2. Desactivación física con el solvente

La desactivación física por el solvente, descrita por la constante  $k_d$ , da cuenta de la transferencia de energía desde el estado excitado del oxígeno molecular a los modos vibracionales del solvente. El tiempo de vida del oxígeno molecular singulete depende del solvente utilizado, siendo factores importantes el número de grupos OH, enlaces C–H, presencia de halógenos y sustitución isotópica<sup>(70,71,72)</sup>. En la tabla 1 se muestran valores del tiempo de vida de oxígeno molecular singulete en diferentes solventes. El hecho de que el tiempo de vida en H<sub>2</sub>O sea más corto, podría sugerir que la constante dieléctrica o el momento dipolar del solvente son parámetros determinantes del tiempo de vida del O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>), sin embargo, en solventes como acetona (21,01 F/m; 2,88 D<sup>(73)</sup>) y benceno (2,2825 F/m; 0 D<sup>(73)</sup>) se observan tiempos de vida similares; además, se ha demostrado que no hay correlación entre el tiempo de vida y la viscosidad del medio<sup>(74,75)</sup>, lo que indica que son otras las características del solvente las que determinan  $\tau_d$ . Por otra parte, en agua, el valor de  $\tau_d$  es de 3,45  $\mu$ s, el menor registrado, en metanol aumenta a 9,5  $\mu$ s, y en agua deuterada el tiempo de vida es 20 veces mayor que en agua. En solventes halogenados se han reportado los tiempos de vida más largos, p. ej., en 1,1,2-tricloro-2,2,1-trifluoroetano  $\tau_d$  es 99 ms<sup>(76)</sup>. En general, a mayor número de enlaces C–H, sustitución isotópica con átomos de deuterio o reemplazo de átomos de hidrógeno por halógenos, se observan mayores tiempos de vida del del O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Recientemente, Bregnhøj y

col. han publicado que, además, el tiempo de vida depende con la temperatura, planteando que el oxígeno molecular singulete decae al estado basal superando una barrera de energía en la interacción con el solvente, y se produce un efecto túnel a temperaturas más altas<sup>(77)</sup>.

**Tabla 1.** Valores de  $\tau_d$  ( $\mu\text{s}$ ) de varios solventes a diferentes temperaturas.

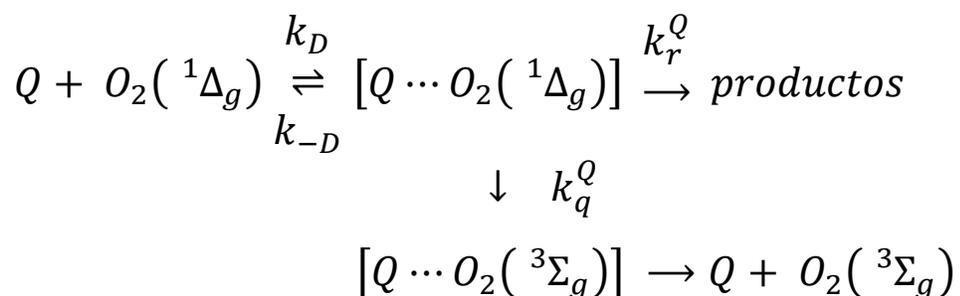
Solvente	$\tau_d^a / \mu\text{s}$				
	278 K	298 K	323 K	348 K	363 K
H <sub>2</sub> O	3,57	3,45	3,27	3,07	2,93
D <sub>2</sub> O	77,8	67,9	58,3	51,9	49,5
CH <sub>3</sub> OH	8,9	9,5	9,7	.. <sup>b</sup>	.. <sup>b</sup>
CH <sub>3</sub> OD	32,0	31,3	30,3	.. <sup>b</sup>	.. <sup>b</sup>
CD <sub>3</sub> OD	282	275	257	.. <sup>b</sup>	.. <sup>b</sup>
1-propanol	15,8	15,9	16,1	16,4	16,6
1-octanol	17,8	17,7	17,7	17,6	17,4
Acetona-h <sub>6</sub>	43,9	45,8	47,6	.. <sup>b</sup>	.. <sup>b</sup>
Acetona-d <sub>6</sub>	989	1046	1083	.. <sup>b</sup>	.. <sup>b</sup>
Acetonitrilo-h <sub>3</sub>	81,6	80,9	79,9	78,8	.. <sup>b</sup>
Acetonitrilo-d <sub>3</sub>	1604	1613	1662	1752	.. <sup>b</sup>
Benceno-h <sub>6</sub>	.. <sup>b</sup>	30,4	30,3	30,2	.. <sup>b</sup>
Benceno-d <sub>6</sub>	.. <sup>b</sup>	731	592	453	.. <sup>b</sup>
Clorobenceno	43,7	43,5	43,3	43,1	42,9
Iodobenceno	39,2	38,8	38,2	37,6	37,2
Tolueno-h <sub>8</sub>	31,6	30,3	28,7	27,1	26,1
Tolueno-d <sub>8</sub>	407	298	205	143	114

<sup>a</sup>Valores reportados en literatura<sup>(77)</sup>. <sup>b</sup>Solvente fuera del rango líquido.

### 1.1.2.3. Interacción con desactivantes presentes en el medio

La interacción del oxígeno molecular singulete con desactivantes puede ocurrir por dos caminos: desactivación física ( $k_q$ ), lo que implica una transferencia de energía, sin modificación química en el aceptor; y reacción química ( $k_r$ ), resultando en la alteración de la molécula con la que reacciona<sup>(78)</sup>.

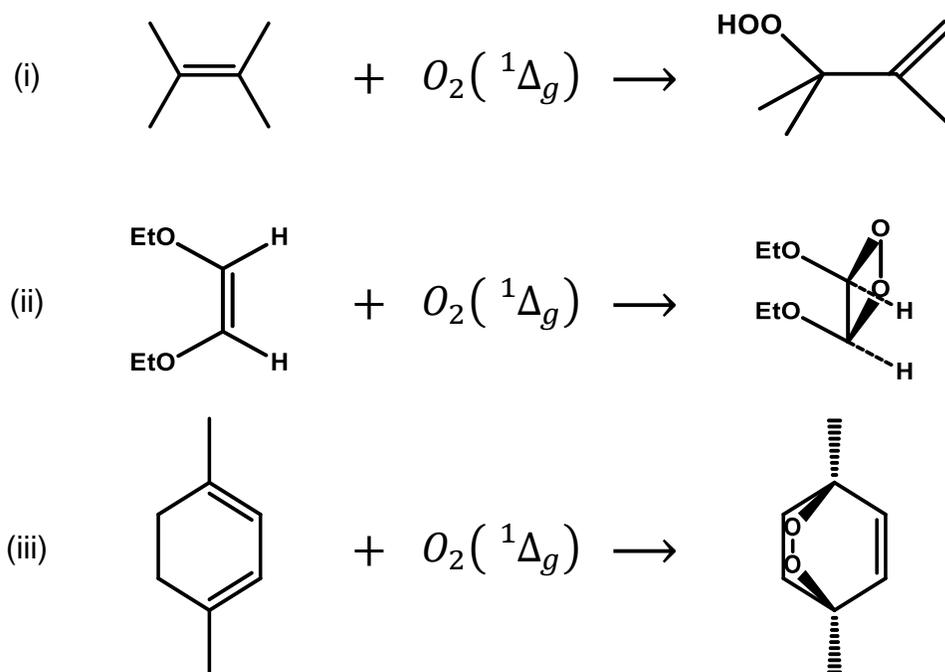
Para ambos mecanismos, diferentes autores han sugerido la formación de un intermediario común, un exciplexo con carácter de transferencia de carga, para el proceso de interacción entre el  $O_2(^1\Delta_g)$  y una molécula desactivante (Q)<sup>(79,80,81)</sup>. Dependiendo de las características del aceptor, el exciplexo puede conducir a la formación de productos a través de un proceso químico o desactivarse al estado basal para formar un complejo de transferencia de carga, que genera los reactantes sin cambio, vía un mecanismo físico<sup>(82)</sup> (Fig. 4).



**Figura 4.** Mecanismo de interacción de oxígeno molecular singulete con desactivantes.

El oxígeno molecular singulete es una especie electrofílica, por lo que se espera que sustratos con alta densidad electrónica interactúen y desactiven con mayor eficiencia a esta molécula excitada. Los tipos de reacción fundamentales con diferentes sustratos corresponden a los mecanismos: (i) ene, que genera hidroperóxidos, que pueden ser intermediarios para la formación de alcoholes alílicos; (ii) [2+2], que forma dioxetanos, típicamente moléculas termosensibles y que descomponen para dar compuestos

carbonílicos; y (iii) adición [4+2], que conduce a la formación de endoperóxidos, ruta sintéticamente útil que permite la obtención de compuestos específicamente oxigenados<sup>(83,84)</sup> (Fig. 5).



**Figura 5.** Mecanismos fundamentales de reacción de oxígeno molecular singulete: (i) ene; (ii) adición [2+2]; (iii) adición [2+4].

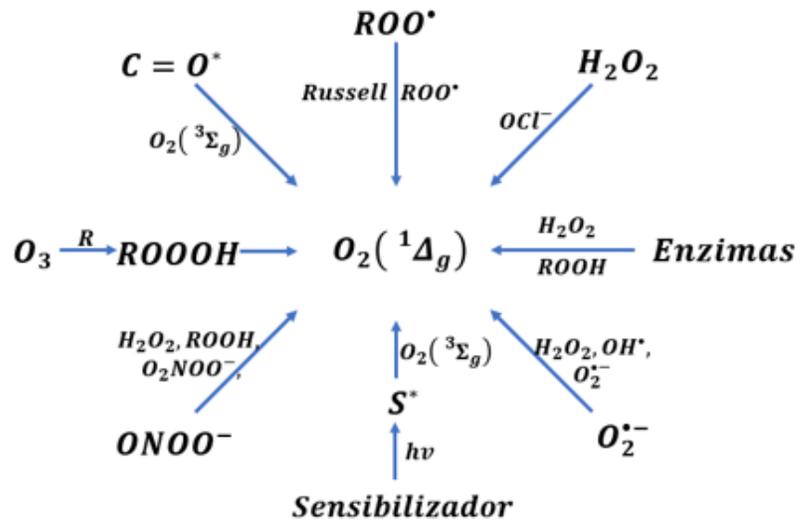
La interacción del  $O_2(^1\Delta_g)$  con diferentes sustratos ha sido ampliamente estudiada y utilizada en síntesis orgánica para obtener productos o intermediarios de reacción, siendo relevantes en este ámbito las reacciones con aminas secundarias para obtener iminas<sup>(85)</sup>, la oxidación de fenoles, aminas y sulfuros<sup>(53)</sup>, la fotooxigenación de heterociclos, entre los que se incluyen furanos<sup>(86)</sup>, pirroles<sup>(87)</sup>, indoles<sup>(88)</sup>, oxazoles<sup>(89)</sup>, entre otras. Un uso

particular que ha tenido el estudio de la reactividad de  $O_2(^1\Delta_g)$  es en la síntesis de pruebas fluorescentes que reaccionan de forma específica con  $O_2(^1\Delta_g)$ , las que presentan emisión radiativa una vez que ocurre la reacción con oxígeno molecular singulete, y permiten su cuantificación, siendo importante para mediciones de esta especie reactiva en sistemas biológicos<sup>(90,91,92)</sup>.

### **1.1.3. Oxígeno Molecular Singulete en sistemas biológicos**

El oxígeno molecular singulete es generado en los sistemas biológicos, por fotosensibilización, o mediante reacciones químicas. Entre los mecanismos que no involucran absorción de radiación electromagnética, se pueden considerar los siguientes: (i) mecanismo de Russell, en el cual la reacción de dos radicales peroxilos primarios o secundarios ( $ROO^{\cdot}$ ), forma un intermediario tetraoxido ( $ROOOOR$ ), que rápidamente se descompone, dando lugar a la formación de una cetona, un alcohol y oxígeno molecular, una fracción de este último es producido en estado singulete<sup>(93,94)</sup>; (ii) reacción de peróxido de hidrógeno con ácido hipocloroso producido por mieloperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno e iones cloruro<sup>(95)</sup>; (iii) reacción de anión superóxido, generado por xantina oxidasa, con peróxido de hidrógeno<sup>(96)</sup>, (iv) reacción de ozono con moléculas biológicas como metionina, cisteína, glutatión reducido, entre otras, con formación de intermediarios hidrotioxido<sup>(97)</sup>; (v) reacción de peroxinitrito con peróxido de hidrógeno<sup>(98,99)</sup>; (vi) transferencia de energía desde especies

carbonílicas excitadas<sup>(100)</sup>; y (vii) reacciones que involucran la participación de diferentes enzimas, como peroxidasas y oxigenasas<sup>(101,102,103)</sup>. En la figura 6 se muestra un esquema que resume estas reacciones.

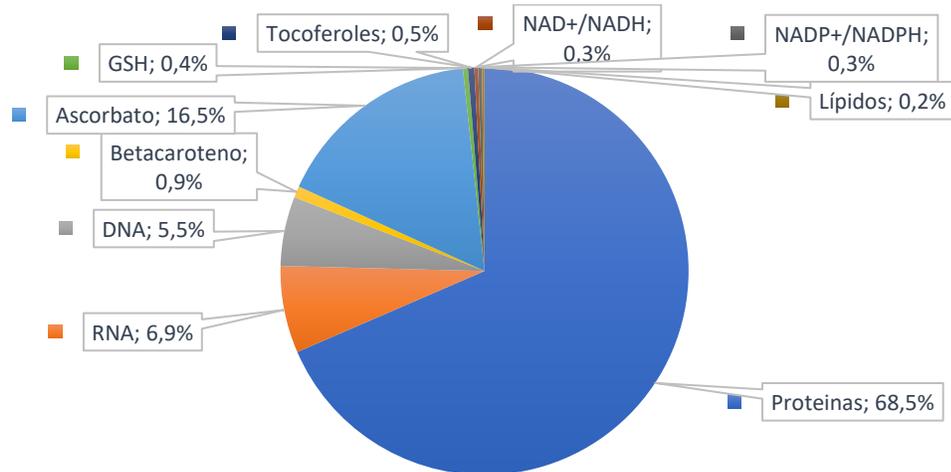


**Figura 6.** Principales reacciones bioquímicas que conducen a la formación de oxígeno molecular singlete<sup>(104)</sup>.

De acuerdo con diferentes estudios, el tiempo de vida del oxígeno molecular singlete en células está fuertemente condicionado por el medio acuoso de estos sistemas, donde tiene un valor de 3,5  $\mu s$  en agua en ausencia de sustratos reactivos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el medio celular existen diversas moléculas que pueden actuar como desactivantes del  $O_2(^1\Delta_g)$ , y podrían reducir significativamente su tiempo de vida. Hatz y col. reportan tiempos de vida de alrededor de 3  $\mu s$  en neuronas y células HeLa, el que estaría determinado por interacciones con agua intracelular y no con otros componentes del medio<sup>(105)</sup>,

conclusiones similares a las obtenidas previamente por Skovsen y col.<sup>(106)</sup>. Otros estudios realizados alrededor de 1990 concluyeron que el tiempo de vida de la especie reactiva sería menor a 1  $\mu$ s en diferentes sistemas celulares<sup>(107,108,109)</sup>, sin embargo, estas medidas podrían estar sujetas a errores considerables dadas las dificultades en su determinación, principalmente debido a interferencias del sensibilizador o bajos rendimientos cuánticos de generación que producían señales de baja intensidad.

Las proteínas corresponden a aproximadamente el 68% del peso seco de una célula, por lo tanto, es esperable que sean el mayor blanco del oxígeno molecular singlete en sistemas biológicos<sup>(110)</sup>. Además, el  $O_2(^1\Delta_g)$  puede reaccionar también con ADN, ARN, lípidos y esteroides. A partir de las constantes de velocidad de reacción de estos blancos biológicos con oxígeno molecular singlete y su abundancia relativa, Davies<sup>(78)</sup> calculó el consumo potencial del  $O_2(^1\Delta_g)$  por diferentes componentes celulares, demostrando la importancia de las proteínas como blanco reactivo (Fig 7.). Se debe tener en consideración que este cálculo corresponde a una aproximación y se han omitido factores críticos como la localización del sensibilizador y el limitado radio de difusión de oxígeno molecular singlete.



**Figura 7.** Consumo previsto de oxígeno molecular singlete por blancos intracelulares de una célula tipo de leucocito<sup>(78)</sup>.

Debido a su posible formación tanto fuera como dentro de la célula, el oxígeno molecular singlete posee características que lo hacen una especie mutagénica, citotóxica y genotóxica. Estudios de su reactividad con ADN han mostrado que reacciona eficientemente con el residuo desoxiguanosina ( $5,3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  en medio neutro), mientras que otros residuos no mostraron mayor desactivación de esta especie. Sin embargo, este valor es menor para ADN nativo ( $5,3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  en medio neutro), lo cual se podría explicar por el hecho de que esta biomacromolécula no está formada en su totalidad por desoxiguanosina y por el impedimento que impone la matriz a la difusión del  $O_2(^1\Delta_g)$ <sup>(111,112)</sup>. Cuando el oxígeno molecular singlete es generado en el medio extracelular, se ha demostrado que es capaz de atacar componentes críticos para la vida celular, causando lesiones en membranas, mitocondria y otras sustancias y organelos<sup>(113,114)</sup>. Las lesiones tóxicas y mutagénicas producidas por oxígeno

molecular singulete pueden acumularse en las células y, si no se reparan, es posible que se desarrollen mutaciones, enfermedades degenerativas y cáncer<sup>(115)</sup>.

## **1.2. Antioxidantes**

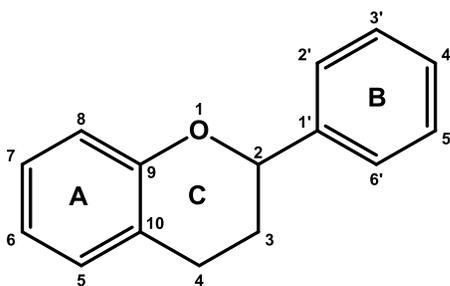
De acuerdo con la definición entregada por Halliwell<sup>(116)</sup>, un antioxidante es una sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones en comparación a un sustrato oxidable, reduce o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. Bajo condiciones normales, el organismo posee defensas eficientes contra el estrés oxidativo, sustentadas por un espectro relativamente amplio de antioxidantes, que se pueden categorizar en dos grandes grupos. El primero de estos corresponde a las enzimas antioxidantes, entre las que se incluyen glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, tioredoxina reductasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasas, entre otras<sup>(117,118,119)</sup>. El segundo grupo corresponde al de antioxidantes de bajo peso molecular o no enzimáticos, e incluye a moléculas como glutatión reducido, ácido úrico, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles, vitamina A y ubiquinoles<sup>(120)</sup>, entre otros, siendo mayor en número al de enzimas que tienen la capacidad de prevenir la oxidación, y poseen la habilidad de penetrar y alcanzar sitios específicos de la célula en donde ocurre estrés oxidativo<sup>(121)</sup>. Algunos de los antioxidantes son sintetizados en el organismo, sin embargo, una parte de ellos

ingresan a través de la dieta alimenticia, y son los llamados antioxidantes exógenos.

Dentro de los antioxidantes más estudiados se encuentra la vitamina C, vitamina E y  $\beta$ -caroteno<sup>(122)</sup>. La vitamina C es considerada el antioxidante hidrosoluble más importante en fluidos extracelulares; es capaz de desactivar o reaccionar con oxígeno molecular singlete, radicales hidroxilos (OH·) y radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )<sup>(123)</sup> y tiene la capacidad de regenerar  $\alpha$ -tocoferol<sup>(124,125)</sup>. La vitamina E, compuesta mayoritariamente por  $\alpha$ -tocoferol, corresponde al antioxidante liposoluble más importante; funciona efectivamente en la ruptura de cadenas y elimina radicales lipoperóxido<sup>(126)</sup>; además, los tocoferoles que componen esta vitamina pueden reaccionar con oxígeno molecular singlete en ambientes membranosos, mediante una oxigenación irreversible de esta molécula<sup>(127)</sup>. El  $\beta$ -caroteno es un antioxidante liposoluble precursor de la vitamina A y es capaz de inhibir la lipoperoxidación causada por radicales libres y oxígeno molecular singlete<sup>(128)</sup>. Las mayores fuentes de antioxidantes exógenos son frutas, vegetales y granos integrales, en los que además se pueden encontrar otros fitoquímicos que tienen capacidad antioxidante y además proporcionan beneficios en la salud al reducir el riesgo de enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, hipertensión arterial, inflamación, infecciones virales, microbiales y parasitarias, etc.<sup>(129)</sup>. La acción sinérgica de estos compuestos sería la responsable de todo el espectro de acción de ellos, y no cada uno por sí solo<sup>(130,131)</sup>.

### 1.2.1. Flavonoides

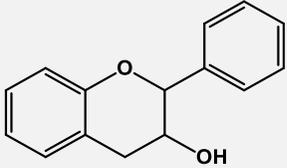
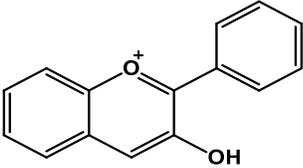
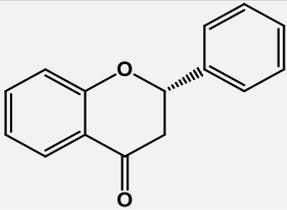
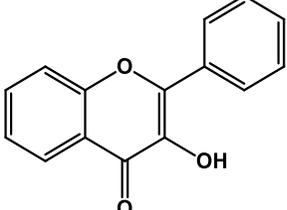
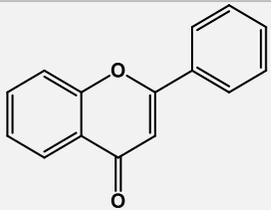
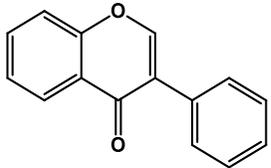
Un conjunto importante de antioxidantes naturales son los flavonoides, que corresponden a la clase más común de compuestos polifenólicos y están ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal<sup>(132)</sup>. Se pueden encontrar en hojas, flores, frutas, semillas, frutos secos, especias, aceite de oliva, plantas medicinales y bebidas como vino tinto, té y cerveza (en bajos niveles)<sup>(133)</sup>.



**Figura 8.** Estructura química básica de los flavonoides.

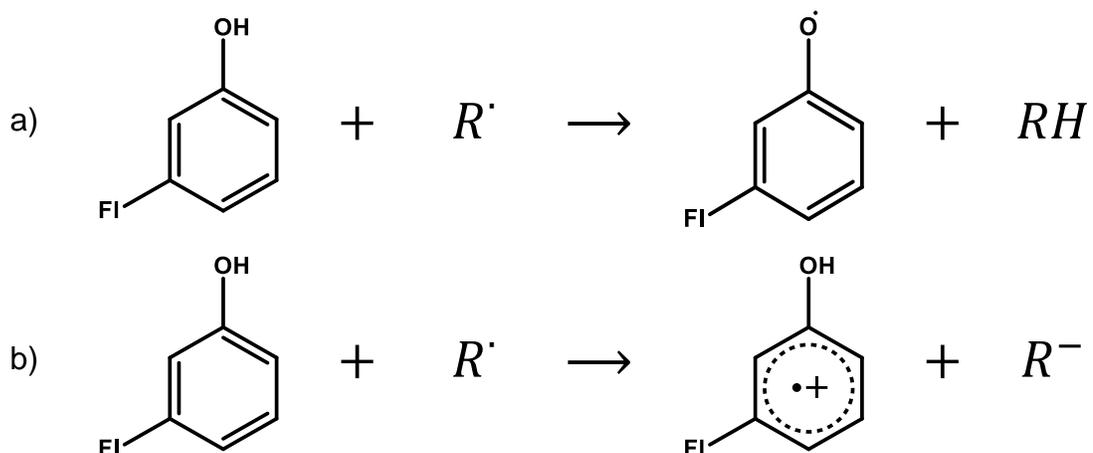
La estructura básica de un flavonoide es un derivado de benzo- $\gamma$ -pirona, que consiste en 15 átomos de carbono distribuidos en dos anillos de benceno denominados A y B, conectados por un anillo pirano, denominado C, que contiene un átomo de oxígeno (Fig 8.). Existen diferentes clases de flavonoides que difieren en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B, los que pueden ser grupos hidroxilos, metoxilos y/o glicosídicos (Tabla 2)<sup>(134,135)</sup>.

**Tabla 2.** Clases principales de flavonoides<sup>(132,133,134,136)</sup>.

Clase	Estructura general	Flavonoides	Fuentes
Flavanoles		Catequina Epicatequina Galocatequina Epigalocatequina	Frutas Té Cacao Cereales
Antocianidinas		Cianidina Pelargonidina Delfinidina Malvidina	Miel Berries Aceite de oliva Frutos secos
Flavanonas		Naringenina Hesperetina Liquiritina	Limón Naranja Pomelo Tomate
Flavonoles		Quercetina Kaempferol Miricetina Morina	Uvas Manzana Cebolla Vino tinto
Flavonas		Apigenina Luteolina Crisina	Brócoli Apio Zanahoria Perejil
Isoflavonas		Genisteina Genistina Daidzeina Daidzina	Soya Garbanzos Porotos negros Habas

### 1.2.1.1. Mecanismos de acción antioxidantes

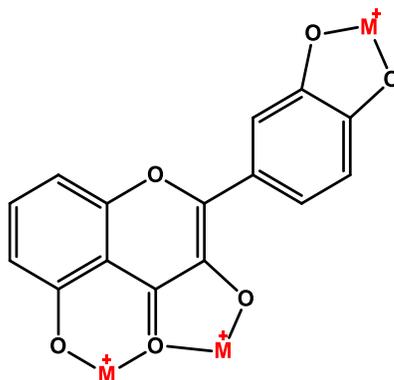
Los mecanismos de acción por los cuales los flavonoides pueden actuar como antioxidantes involucra la interacción directa con especies reactivas, previniendo su formación o reparando el daño causado por ellas<sup>(116)</sup>. Entre los mecanismos involucrados en la actividad biológica de los flavonoides, se pueden mencionar los siguientes: (i) eliminación directa de ROS mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) a través de la ruptura homolítica de un enlace O–H o transferencia de un electrón (SET, por sus siglas en inglés)<sup>(137)</sup> (Fig. 9). Aspectos importantes en la estructura de los compuestos que operan mediante este mecanismo son la presencia de un grupo catecol en el anillo B, el doble enlace entre la posiciones 2 y 3 del anillo C, y los grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5<sup>(138)</sup>; (ii) activación de enzimas antioxidantes<sup>(139,140)</sup>; (iii) reducción de radicales  $\alpha$ -tocoferil a su forma antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, mediante transferencia de hidrógeno<sup>(141)</sup>; (iv) inhibición de inducción o actividad de oxidasas como xantina oxidasa<sup>(142)</sup>, proteína quinasa C<sup>(143)</sup> y NO sintasa<sup>(144)</sup>; (v) incremento de los niveles de ácido urico<sup>(145)</sup>; (vi) aumento de la actividad de antioxidantes de bajo peso molecular en condiciones donde estos últimos presentan actividad prooxidante bajo ciertas condiciones como irradiación UVA<sup>(146)</sup>; y (vii) complejación con metales de transición.



**Figura 9.** Desactivación directa de ROS por flavonoides mediante mecanismo HAT (a) y SET (b).

La complejación de flavonoides con iones metálicos inhibe las reacciones en las que estos participan generando radicales libres, tales como las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss<sup>(147)</sup>, abstrayéndolos y formando complejos estables. Sin embargo, también se ha propuesto que el complejo formado no solo impide la oxidación debido a la limitación de un reactante, sino que también modifica la acción biológica de los flavonoides<sup>(148)</sup> y aumenta su capacidad antioxidante. Respecto a lo último, se han realizado diversos estudios que dan cuenta del aumento de esta capacidad frente a oxidantes radicalarios, como radical superóxido<sup>(149)</sup> o generados por diazo compuestos como DPPH<sup>(150)</sup>, ABTS<sup>(151)</sup> o ABAP<sup>(152)</sup>. Al respecto, se ha observado que existen tres sitios donde es más probable que ocurra la complejación: entre los grupos 5–hidroxilo y 4–carbonilo; 3–hidroxilo y 4–carbonilo; y 3',4'–dihidroxilo<sup>(153)</sup> (Fig. 10). La preferencia por uno u otro sitio para la complejación dependerá de la presencia de estos grupos en

la molécula, el ión metálico con el que ocurre la complejación y condiciones del medio, como el pH o solvente utilizado.



**Figura 10.** Posibles sitios de complejación en una molécula de flavonoide

Sin embargo, un problema recurrente en la información reportada en la literatura sobre los complejos flavonoide–metal, corresponde a la discrepancia que existe entre diferentes autores respecto de la estequiometría del aducto formado. Así, para el complejo formado por  $Al^{+3}$  y Quercetina, Gutierrez y col. han propuesto que la estequiometría metal–ligando es 1:1, 2:1 y 2:3<sup>(154)</sup>, De Souza y col. solo reportan el complejo 2:1<sup>(155)</sup>, mientras que Cornard y col. describen la formación de un complejo de estequiometría 1:2 cuando la relación del metal con el flavonoide en solución es de 0,5, mientras que un aumento de la relación conduce a la formación de un segundo complejo de estequiometría 2:1<sup>(156)</sup>. Para el mismo flavonoide, Mira y col.<sup>(157)</sup> y Fernandez y col.<sup>(158)</sup> reportan la formación de complejos de estequiometría metal–ligando 1:1, 1:2, 1:3, 2:2 y 2:3 con los iones  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ , mientras que Hajji y col. asumen una

estequiometría 1:1 para el análisis de sus resultados<sup>(159)</sup>. Para  $\text{Cu}^{+1}$ , Hajji y col. reportan la formación de un complejo con estequiometría 1:1, en tanto que Fernández y col. no observan su formación.

#### **1.2.1.2. Acción prooxidante**

Si bien los flavonoides son reconocidos como moléculas con capacidad antioxidante, diferentes investigaciones han mostrado que también presentan actividad que favorece procesos de oxidación. Hanasaki y col. reportaron un aumento en la producción de radicales hidroxilos por reacción de Fenton, al estudiar la actividad antioxidante de baicaleina, quercetina, morina y miricetina frente a  $\text{OH}\cdot$ , flavonoides que tienen entre tres y seis hidroxilos como sustituyentes. En el mismo estudio, se describe que este aumento no es observable para mono- o dihidroxiflavonoides<sup>(160)</sup>. Cao y col. observaron actividad prooxidante para una serie de flavonoides, incluyendo flavonas, isoflavonas y flavanonas, cuando estaban en presencia de  $\text{Cu}^{+2}$ , concluyendo que a mayor cantidad de grupos hidroxilos en la estructura de estas moléculas, mayor era la actividad prooxidante, y que en presencia del ión metálico no ocurría complejación<sup>(161)</sup>. También se ha observado que la concentración es un parámetro para tener en consideración en la acción prooxidante, Yen y col. mostraron que para concentraciones entre 25–200  $\mu\text{M}$  de quercetina y entre 125–200  $\mu\text{M}$  de morina, aumentaba la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radical superóxido en

linfocitos. De igual forma se observó daño al ADN de estas células debido a la estimulación de estrés oxidativo<sup>(162)</sup>. Otra forma en que los flavonoides pueden actuar como prooxidantes es mediante la formación de radicales fenoxi (FI – O<sup>•</sup>) por mecanismo HAT. Los radicales fenoxi tienen un tiempo de vida de 200  $\mu$ s<sup>(163)</sup>, y se estabilizan formando estructuras que contienen quinonas, las que también son reactivas, pero se pueden estabilizar con nucleófilos como glutatión, cisteína y ácidos nucleicos, lo que conduce a la formación de radicales superóxido<sup>(164)</sup>. Por otra parte, los flavonoides pueden actuar como prooxidante mediante la inhibición de la respiración mitocondrial por autooxidación y posterior formación de radical superóxido<sup>(165)</sup>; oxidación catalizada por peroxidasas, formando fenoxirradicales<sup>(166)</sup> y oxidación de antioxidantes de bajo peso molecular<sup>(167)</sup>.

Sin embargo, es posible que la acción prooxidante de flavonoides esté relacionada con sus funciones benéficas. Por ejemplo, para el flavonoide epigallocatequina galato, Maeta y col. indican que es capaz de actuar como prooxidante para causar una respuesta al estrés oxidativo en levaduras bajo ciertas condiciones<sup>(168)</sup>, y Nakagawa y col. concluyen que la capacidad de este flavonoide de promover la apoptosis en una variedad de células tumorales, se debe a que genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por lo tanto se forman radicales hidroxilos en presencia de Fe<sup>+2</sup>, lo que conduce a la muerte celular<sup>(169)</sup>.

### 1.2.1.3. Consumo y biodisponibilidad

Se han realizado un conjunto de estudios para determinar la absorción y biodisponibilidad de diferentes flavonoides. Un aspecto importante a considerar es la ingesta de estas sustancias a través de la dieta alimenticia. Hertog y col. realizaron un estudio de cohorte a hombres que vivían en Zutphen, al este de Países Bajos, en el que determinaron que la ingesta promedio diaria de los flavonoides quercetina, kaempferol, miricetina, apigenina y luteolina, corresponde a 25,9 mg y las mayores fuentes de estos son té (61%), cebollas (13%) y manzanas (10%)<sup>(170)</sup>. Commenges y col. realizaron un estudio de cohorte a personas mayores de 65 años, que vivían en Gironde y Dordogne, al sur de Francia, y concluyó que la ingesta promedio de flavonoides es de 14,4 mg y las fuentes de estos compuestos correspondería a frutas (35,2%), vegetales (19,1%), vino (16,9%) y té (16,0%)<sup>(171)</sup>. Otro estudio realizado por Hertog y col. a personas residentes de Caerphilly, una ciudad industrial al sur de Gales, mostró que la ingesta promedio diaria es de 26,3 mg, proveniente en un 82% del consumo de té y un 10% de cebollas<sup>(172)</sup>. En los dos primeros estudios, se observó una relación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de padecer enfermedades coronarias y demencia, mientras que, en el último, no se observó relación entre el mayor consumo de flavonoides y la prevalencia de isquemia cardiaca en esa cohorte, lo que posiblemente puede deberse a la adición de leche

al té, ya que las moléculas antioxidantes se enlazan a las proteínas de esta y finalmente no son absorbidas en el tracto intestinal.

Para que los flavonoides puedan ser absorbidos, estos deben ser liberados de la matriz de los alimentos a través de la masticación, acción de jugos digestivos y microorganismos del colon. La absorción dependerá de las propiedades fisicoquímicas de este tipo de compuestos, como tamaño, lipofilicidad, solubilidad y pKa<sup>(173)</sup>. Durante bastante tiempo, la absorción de estos compuestos se consideró despreciable debido a que en su mayoría están unidos a azúcares, no existen enzimas que puedan liberar al flavonoide de la fracción sacárida y las bacterias intestinales capaces de realizar hidrólisis los degradan en gran medida<sup>(174)</sup>. Sin embargo, estudios realizados en las últimas décadas han demostrado que la biodisponibilidad de flavonoides específicos es mucho mayor de lo que se creía anteriormente<sup>(132)</sup>. Quercetina presenta diferente biodisponibilidad dependiendo de la matriz alimenticia en que se encuentre y su glicolización, mostrando mayor concentración máxima plásmica cuando es consumida desde cebollas (0,74  $\mu\text{M}$ ), luego de 42 minutos y con una vida media de 28 horas; mientras que, a dosis mayores proveniente de manzanas, la concentración máxima es menor (0,34  $\mu\text{M}$ ), se alcanza luego de 2,2 horas y la vida media es de 23 horas<sup>(175)</sup>. (+)-catequina presenta rápida absorción, alcanzando concentración máxima en plasma luego de 1,5 horas de su consumo, y presenta una vida media de 3,1 horas, sin embargo, su absorción es menor cuando se compara con quercetina<sup>(176)</sup>. Estudios en ratas muestran que la

biodisponibilidad de Morina es de 0,35% y puede ser mejorada hasta 11,2% mediante la encapsulación en micelas mixtas<sup>(177)</sup>. En la tabla 3 se presenta concentraciones plasmáticas y cinética de diferentes flavonoides.

**Tabla 3.** Concentración plasmática y cinética luego de administración de flavonoides en humanos<sup>(173)</sup>.

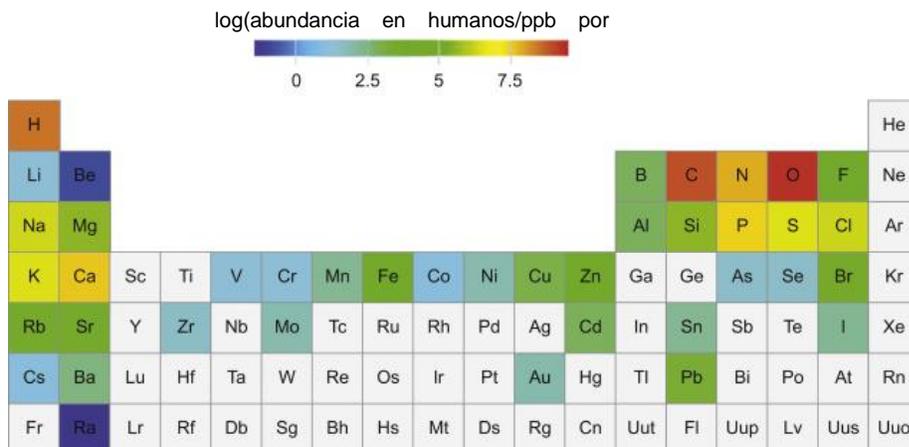
Flavonoide	Fuente	Dosis ( $\mu\text{mol}$ )	$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$T_{\text{max}}$ (h)	$T_{1/2}$ (h)
Quercetina	Cebolla	225	0,74	0,7	28
	Manzana	325	0,30	2,2	23
Rutina	Compuesto puro	662	2,0	7	7
	Té negro	662	1,0	4	7
(+)-catequina	Vino tinto	120	0,09	1,5	3,1
(-)-catequina	Té verde	143	0,43	1,3	3,0
	Chocolate	565	0,7	3	-
Genisteina	Leche de soya	70	0,74	6,5	-
	Compuesto puro	186	0,87	7,4	-
Daidzeina	Leche de soya	98	0,79	6,5	-
	Compuesto puro	196	0,92	7,2	-

$C_{\text{max}}$ : concentración máxima;  $T_{\text{max}}$ : tiempo en que se alcanza la concentración máxima;  $T_{1/2}$ : tiempo de vida medio.

### 1.3. Iones Metálicos en Sistemas Biológicos

En una persona de 70 kg, los elementos principales que lo componen son hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre; en menor cantidad le siguen los macrominerales sodio, potasio, magnesio y calcio, los que se encuentran en el orden de los gramos, excepto por calcio que es cercano a 1,7 kg; mientras que existen elementos a nivel traza que son esenciales, y corresponden a los iones metálicos de hierro, zinc, manganeso, cobre, cobalto y molibdeno, y a los iones no metálicos de selenio y yodo, que se encuentran en el rango de los miligramos,

excepto hierro y zinc que se encuentran entre 2–5 gramos<sup>(178)</sup>. En la figura 11 se observa la abundancia de los diferentes elementos en el cuerpo humano.



**Figura 11.** Abundancia de los elementos químicos en el cuerpo humano. No se incluye la serie de lantánidos y actínidos<sup>(179)</sup>.

Una característica de los metales es su capacidad de ceder electrones fácilmente generando iones cargados positivamente, que tienden a ser solubles en fluidos biológicos, forma que les permite cumplir su rol en estos sistemas<sup>(180)</sup>. Estos cationes forman parte de procesos químicos que ocurren por interacciones con moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas y enzimas; estabilizando, desestabilizando o modulando estas biomoléculas a través de cambios conformacionales y generando centros de actividad en biomacromoléculas<sup>(181)</sup>.

Entre las funciones que cumplen estos elementos en los sistemas biológicos, se puede destacar  $\text{Ca}^{+2}$ , macronutriente que se encuentra presente en

concentraciones entre 1–3 mM en el medio extracelular y 0,1  $\mu\text{M}$  en el medio intracelular<sup>(181,182)</sup>, y participa en la contracción muscular, coagulación sanguínea, transporte de  $\text{K}^+$ , liberación de neurotransmisores, adhesión celular, formación de microtúbulos y en respuestas hormonales<sup>(183)</sup>. Otros elementos importantes corresponden a los iones de metales de transición, como  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{+2}$ .  $\text{Zn}^{+2}$  se encuentra a una concentración de alrededor 0,6 mM y alrededor del 95% es intracelular. El  $\text{Zn}^{+2}$  está presente en miles de enzimas cumpliendo un rol catalítico y estructural, y también se ha encontrado presente en proteínas unidas a ácidos nucleicos que regulan la transcripción y transducción de mensajes genéticos<sup>(184,185)</sup>. El hierro típicamente se encuentra en su forma iónica  $\text{Fe}^{+3}$ , la que es poco soluble en medio acuoso ( $K_{ps}=10^{-39}$  M), a una concentración aproximada de  $10^{-18}$  M, por lo que se encuentra mayoritariamente formando complejos. El hierro, además, se encuentra como  $\text{Fe}^{+2}$ , el que, por el contrario, es extremadamente soluble en solución acuosa<sup>(186)</sup>. Estos iones son esenciales para la síntesis de hemoglobina, reacciones de oxido–reducción y proliferación celular. Del total de hierro en humanos, dos tercios componen los glóbulos rojos, el resto es almacenado en el complejo ferritina/hemosiderina, mientras que solo 1–2 mg circulan por el torrente sanguíneo<sup>(187)</sup>. El cobre funciona como un donador/aceptor de electrones en reacciones redox claves, como respiración mitocondrial, síntesis de melamina y entrecruce de colágeno, lo que se debe a su habilidad para pasar entre los estados de oxidación  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ . Es un componente estructural de macromoléculas, entregando la coordinación

química apropiada para mantener estructuras de orden superior y está envuelto en el desarrollo de mantenimiento de la integridad cardiovascular y esquelética, función y estructura del sistema nervioso central y función eritropoyética, incluido el metabolismo del hierro. Dependiendo de la fuente del material biológico, el contenido de este elemento es del orden de partes por billón (ppb) a partes por millón (ppm)<sup>(188,189)</sup>.

#### **1.4. Estudios sobre oxígeno molecular singulete, flavonoides y complejos flavonoide metal**

Diferentes estudios han dado cuenta del aumento de la capacidad antioxidante de flavonoides frente a oxidantes radicalarios cuando estos forman quelatos con diferentes metales de transición. Consecuentemente, se ha propuesto el lugar en la estructura del flavonoide donde ocurriría la complejación, sin embargo, son escasos los estudios en que se ha medido la reactividad de estos compuestos frente a oxígeno molecular singulete. Morales y col. estudiaron la reactividad de una serie de flavonoides, encontrando que son buenos desactivantes de  $O_2(^1\Delta_g)$  y podrían ser valiosos antioxidantes en sistemas bajo estrés oxidativo, en particular si una dieta rica en flavonoides es previamente consumida<sup>(190)</sup>. Adicionalmente, Morales y col. analizaron la dependencia de los valores de las constantes de velocidad con la estructura molecular en términos de descriptores globales y funciones condensadas de Fukui, obtenidas de

cálculos de estructura electrónica. Los resultados apoyan la formación de un exciplexo de transferencia de carga en todas las reacciones estudiadas. La fracción de exciplexos que genera productos de reacción, evoluciona a través de un hidroperóxido y/o un endoperóxido, intermediario producido por ataque del oxígeno molecular singulete al doble enlace del anillo C del flavonoide. Sin embargo, sólo 1-5% del exciplexo evoluciona para dar productos de reacción, lo que implica que los flavonoides desactivan  $O_2(^1\Delta_g)$  principalmente a través un proceso físico (Tabla 4).

**Tabla 4.** Constantes de velocidad de reacción química,  $k_r$ , y de desactivación total,  $k_T$ , entre oxígeno molecular singulete y flavonoides<sup>(190)</sup>.

Flavonoide	$k_r / 10^5 M^{-1} s^{-1}$ EtOH	$k_T / 10^7 M^{-1} s^{-1}$ D <sub>2</sub> O, pD=7,4	$k_r / k_T$ (%)
Morina	65,7	13,4	4,9
Rutina	0,58	2,4	0,24
Quercetina	5,7	5,7	1
Quercitrina	0,52	2,7	0,19
Epicatequina	<0,01	5,5	<0,002
Catequina	<0,01	5,1	<0,002

En otro estudio realizado por De Rosso y col., se determinaron las constantes velocidad de desactivación total y velocidad de reacción química de un grupo de antocianinas (glucósidos de antocianidinas) frente a  $O_2(^1\Delta_g)$ . Los datos reportados muestran que estos compuestos son desactivantes eficientes de esta especie reactiva, con valores de  $k_T > 2 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$  en HCl 1% en metanol (Tabla 5), valores de reactividad total comparables a los descritos para flavonoles altamente hidroxilados. Además, se encontró que la reactividad química era sustantivamente baja, ya que aproximadamente una molécula de antocianina es

degradada luego de desactivar 125 moléculas de oxígeno excitado, lo que evidencia que la interacción física es la vía principal de desactivación<sup>(191)</sup>. Cálculos semiempíricos de orbitales moleculares AM1 para la forma catiónica de estos flavonoides, mostraron que la sustitución 4'-OH en el anillo B produce un aumento en la resonancia con el anillo C, permitiendo una deslocalización más fuerte de los electrones  $\pi$  y facilitando que la carga positiva forme un sistema 1,3-dieno en el anillo C<sup>(192)</sup>. En consecuencia, se podría esperar que un aumento en el número de grupos electrodonores establezca la estructura resonante del sistema dieno, favoreciendo un mecanismo de reacción del tipo [4+2]. Conclusiones similares a las obtenidas en estos estudios fueron obtenidas por Mukai y col. al estudiar la reacción entre oxígeno molecular singulete y catequinas del té<sup>(193)</sup>, por Turnaire y col. al investigar la reacción entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y 13 flavonoides provenientes de flavonol, flavona, flavanona y flavana<sup>(194)</sup>, por Nagai y col. cuando los sustratos reactivos son flavonoides que presentan doble enlace en el anillo C<sup>(195)</sup> y por Montenegro y col. al determinar la reactividad de  $O_2(^1\Delta_g)$  frente a naringina y su derivado chalcona<sup>(196)</sup>.

**Tabla 5.** Constantes de velocidad de reacción química,  $k_r$ , y de desactivación total,  $k_T$ , entre oxígeno molecular singulete y antocianinas<sup>(191)</sup>.

Antocianina	$k_r / 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$k_T / 10^8 M^{-1} s^{-1}$	$k_r / k_T$ (%)
Malvidina	4,5	5,6	0,8
Malvidina 3-glucósido	4,0	5,5	0,72
Malvidina 3,5-diglucósido	3,0	4,3	0,70
Cianidina 3-glucósido	1,9	3,3	0,58
Cianidina 3-rutinósido	1,2	3,2	0,38
Cianidina 3-galactósido	1,3	2,8	0,46

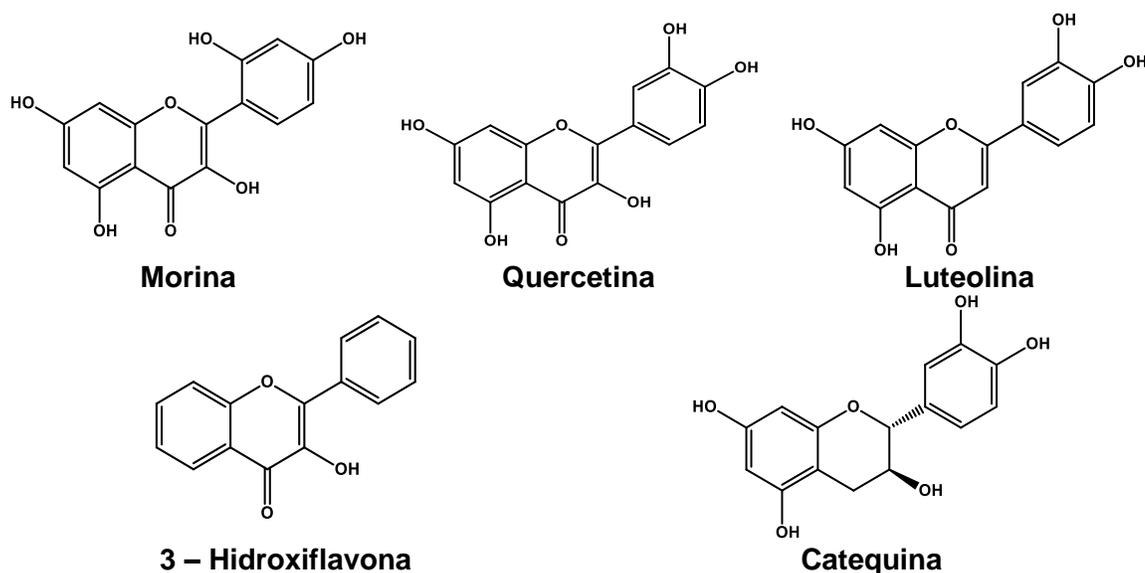
Una de las primeras referencias respecto a la reactividad de oxígeno molecular singlete con complejos formados por iones metálicos corresponde a una tesis realizada en el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, en la cual se reporta un aumento en la reactividad química de los flavonoles quercetina y 3-hidroxiavona en aproximadamente un orden de magnitud, cuando estos se encuentran en presencia de los iones divalentes  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ . Adicionalmente, se ha planteado que este efecto podría atribuirse a la formación de un complejo de asociación entre estos flavonoides y los iones estudiados<sup>(197)</sup>. Ferrari y col. investigaron el comportamiento de 3,3'-dihidroxiavona y el complejo que forma con  $\text{La(III)}$ , como desactivadores de las especies reactivas del oxígeno fotogeneradas por riboflavina,  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . En esta encontraron que la 3,3'-dihidroxiavona y el complejo reaccionan con estas especies reactivas a través de un mecanismo complejo. La flavona desactiva al  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  predominantemente por la vía física, hecho que constituye una propiedad deseable para los antioxidantes, puesto que se recuperan luego del proceso de desactivación y consecuentemente, una misma molécula puede desactivar muchas moléculas de especie reactiva. Además, encontraron que la quelación de metal mejora en gran medida la capacidad de la flavona como un desactivador general de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ <sup>(198)</sup>. Muñoz y col. reportaron el efecto de la complejación con  $\text{Cu}^{+2}$  con crisina frente a  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  fotogenerado por riboflavina, mostrando que el flavonoide libre desactiva a la especie reactiva casi por completo a través de reacción química, mientras que el complejo es un desactivante cuatro veces más

eficiente, con un 80% de desactivación mediante un proceso físico<sup>(199)</sup>. Hasta la fecha no se han reportado más estudios respecto de la reactividad de flavonoides y complejos con iones metálicos, frente a oxígeno molecular singulete.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la relevancia del oxígeno molecular singulete como especie perjudicial en sistemas que se encuentran en condiciones de estrés oxidativo y el uso generalizado de los flavonoides como antioxidantes, tanto en alimentos como en preparaciones farmacéuticas, en este proyecto se plantea la realización de un estudio sobre el efecto de la presencia de metales en la reactividad de flavonoides frente al oxígeno molecular singulete. Esta investigación se realizará en medio homogéneo utilizando metanol, y en soluciones de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina, sistema recurrentemente utilizado para mimetizar membranas biológicas.

Los estudios en medio microheterogéneo se realizarán para determinar si iones metálicos, capaces de penetrar en la membrana, también forman complejos de asociación con flavonoides situados en la bicapa cerca de la interfase lípido-agua. Los flavonoides por estudiar corresponden a morina, luteolina, quercetina, 3-hidroxi-flavona y catequina (Fig. 12), y se han seleccionado considerando su reactividad frente al oxígeno excitado y su estructura química. Morina, quercetina y catequina son los flavonoides más reactivos frente al  $O_2(^1\Delta_g)$ , y las constantes de velocidad para la desactivación

total ( $k_T$ ), tienen valores del orden de  $13,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $5,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $5,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente, en  $\text{D}_2\text{O}$  a  $\text{pD} = 7,4$ <sup>(190)</sup>.



**Figura 12.** Estructura molecular de los flavonoides a estudiar.

Desde el punto de vista estructural, los flavonoides morina y quercetina tienen el mismo número de grupos hidroxilos y difieren en la posición de uno de estos en el anillo B, lo que podría evidenciar la dependencia de la coordinación con iones metálicos con la estructura, así como la reactividad de los complejos formados frente a oxígeno molecular singulete. El flavonoide luteolina es menos reactivo ( $k_T$  (MeOD)=  $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y no posee la sustitución hidroxilo en la posición 3 del anillo C, y 3-hidroxi flavona solo presenta esta sustitución en su estructura, lo que puede advertir sobre la importancia de esta y el efecto del

número de grupos hidroxilos, tanto para la formación del complejo como para la reactividad con la especie excitada. El flavonoide catequina carece del doble enlace entre las posiciones 2 y 3, y no presenta la sustitución carbonílica en la posición 4, por lo que se espera que su estudio sea relevante para la comprensión de la reactividad química de los complejos formados, considerando que en investigaciones realizadas anteriormente se ha indicado la importancia de este sitio estructural en estos compuestos para la reactividad con oxígeno molecular singulete<sup>(190,191,192)</sup>.

Los iones metálicos que se utilizarán para evaluar el efecto de su presencia sobre la reactividad de los flavonoides frente a oxígeno molecular singulete son  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , y corresponden a aquellos que participan en procesos relevantes en los organismos vivos.

## 2. HIPÓTESIS

La reactividad de flavonoides frente al oxígeno molecular singulete, se modifica en presencia de iones metálicos debido a la formación de complejos de asociación metal-flavonoide, los que podrían presentar diferentes estequiometrías y capacidades complejantes, de acuerdo con la naturaleza del metal y al patrón de sustitución del flavonoide con el que ocurre la complejación.

El flavonoide asociado a un ion metálico puede producir un incremento de la constante de velocidad de reacción química y de la constante de desactivación total del oxígeno molecular singulete, siendo predominante la desactivación vía de un proceso físico, resultando en la vuelta del flavonoide a su estado fundamental, permitiendo que reaccione nuevamente.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Medir y evaluar la reactividad de los flavonoides morina, luteolina, Quercetina, 3–hidroxiflavona y catequina frente a oxígeno molecular singulete, en presencia de los iones metálicos  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , en sistemas homogéneos y microheterogéneos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la estequiometría de los complejos de asociación formados entre los flavonoides morina, luteolina, quercetina, 3–hidroxiflavona y catequina, y los iones metálicos  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ .
- Determinar la constante de formación de los complejos de asociación entre los flavonoides morina, luteolina, quercetina, 3–hidroxiflavona y catequina, y los iones metálicos  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ .
- Determinar la constante de velocidad de reacción química entre flavonoides y oxígeno molecular singulete en presencia de iones metálicos.
- Determinar la constante de desactivación total del oxígeno molecular singulete por flavonoides en presencia de iones metálicos.

- Comprobar difusión de los iones metálicos a través de una bicapa lipídica mimetizada, con los flavonoides incorporados, y evaluar su reactividad con oxígeno molecular singulete.

## **4. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN**

### **4.1. Reactivos y solventes**

Los reactivos, quercetina dihidrato, morina monohidrato, 3-hidroxi-flavona, (+)-catequina monohidrato, acetato de hierro y octadecilamina obtenidos de Sigma-Aldrich; luteolina obtenida de AK Scientific; acetato de cobre monohidrato, acetato de zinc dihidrato, cloruro de calcio anhidro y sulfato de cobre pentahidratado, obtenidos de Merck S.A; 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina obtenida de Avanti Polar Lipids. Los solventes metanol, metanol monodeuterado y agua deuterada obtenidos de Merck S.A. Todos los reactivos y solventes se usaron sin purificación previa.

Los sensibilizadores utilizados para generar Oxígeno Molecular Singulete: Rosa de Bengala, Azul de metileno y Tetrafenilporfina Zinc, obtenidos de Sigma-Aldrich, se usaron sin purificación previa.

## **4.2. Instrumentación**

### **4.2.1. Espectrómetro NIR PicoQuant Fluotime 200**

La fosforescencia del oxígeno molecular singulete se detectó por medio de un equipo PicoQuant Fluotime 200 modificado. Para la excitación de rosa de bengala y tetrafenilporfina zinc a 532 nm se utilizó un láser de estado sólido bombeado por diodo (CryLaS FTSS355-Q4) usando una velocidad de repetición de 1 kHz. Para la excitación de azul de metileno a 657 nm se utilizó un láser de estado sólido bombeado por diodo (CryLaS FTSS355-Q4) usando una velocidad de repetición de 2 kHz. La luminiscencia emitida por la muestra fue filtrada por un filtro de corte de 1100 nm (Edmun Optics) y por un filtro de paso de banda a 1270 nm (Spectrogon) para remover cualquier luz dispersada. Un lente plano-convexo se utilizó para enfocar la luz emitida sobre la ventana del fotomultiplicador. Como detector se utilizó un fotomultiplicador sensitivo al cercano infrarrojo H1033A-45 Hamamatsu Photonics. El conteo de fotones se logró con un escalador multicanal Picoquant Nanoharp 250. Las señales de emisión resueltas en el tiempo fueron analizadas utilizando el software Picoquant Fluofit 4.0 que permite obtener tiempos de vida y amplitudes.

#### **4.2.2. Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 265**

El detector de arreglo de diodos de este equipo permite obtener espectros de absorción UV-Vis en tiempos cortos en todo el rango de longitud de onda, desde 190 nm a 1100 nm. La fuente de radiación corresponde a una lámpara de xenón de alta energía. Está conectado a un computador y es controlado por el software UV Lab.

#### **4.2.3. Espectrofotómetro de fluorescencia Quattro**

Este equipo permite obtener espectros de emisión fluorescente. La fuente de excitación corresponde a una lámpara de xenón de alta energía, y la longitud de onda de excitación es seleccionada con un monocromador. Además, tiene un monocromador de emisión que diferencia las longitudes de onda que llegan al detector del equipo. Está conectado a un computador y es controlado por el software FluoreScan.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Método de Job

El método de Job o de Variaciones Continuas se utiliza para determinar la estequiometría de los complejos de asociación formados<sup>(200)</sup>. Consiste en la medición de soluciones de modo que la suma de las concentraciones del metal y el sustrato sea constante y que cada solución sea de diferente fracción molar. A través del uso de una técnica analítica se mide la intensidad de la señal de monitoreo (absorbancia o fluorescencia) y se realiza un gráfico de fracción molar de los sustratos v/s intensidad de señal. La razón de fracciones molares en el punto de mayor intensidad da cuenta de la estequiometría del complejo formado.

### 5.2. Método de Benesi-Hildebrand

El método de Benesi–Hildebrand se utiliza para determinar la constante de equilibrio para la formación de complejos a través de medidas espectrofotométricas<sup>(201)</sup>. En este método se fija la concentración de uno de los reactantes, el que se denomina *host* (H), mientras el otro varía y se encuentra a una concentración mayor, y se denomina *guest* (G). La ecuación que describe la dependencia del cambio en la propiedad medida con la concentración se obtiene según la estequiometría del complejo:

Para la formación de complejos con estequiometría 1:1

$$1/\Delta P = \frac{1}{b\Delta\varepsilon[H]_0 K_{11}} * \frac{1}{[G]} + \frac{1}{b\Delta\varepsilon[H]_0} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Para la formación de complejos con estequiometría 1:2

$$1/\Delta P = \frac{1}{b\Delta\varepsilon[H]_0 K_{12}} * \frac{1}{[G]^2} + \frac{1}{b\Delta\varepsilon[H]_0} \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde

$\Delta P$  cambio en la propiedad medida (absorbancia o fluorescencia);

$[H]_0$  concentración total de reactante a concentración constante;

$[G]$  concentración total de reactante a concentración variable;

$b\Delta\varepsilon$  término derivado de la ecuación de Lambert–Beer;

$K_{11}$  constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1, y;

$K_{12}$  constante de equilibrio para la formación del complejo 1:2.

### 5.3. Fotólisis de estado estacionario

El método de fotólisis de estado estacionario se utilizó para determinar las constantes de velocidad de reactividad química entre el flavonoide complejado y el oxígeno molecular singulete. Típicamente, se irradia una celda de cuarzo que contiene el fotosensibilizador y la sustancia a medir, en un sistema de temperatura controlada. La iluminación se realiza a diferentes tiempos,

realizando medidas de absorbancia en cada intervalo. Se obtiene un número suficiente de medidas en el tiempo, observando la disminución de la concentración de la sustancia.

El sistema de fotólisis consiste en un portacelda protegido de la luz ambiente, con una abertura que lleva interpuesto un filtro de corte de 500nm el cual permite excitar selectivamente al sensibilizador, una ampolleta halógena de 50 W que sirve de fuente de radiación, ubicada a una distancia tal del portacelda que permite seguir con un método espectroscópico el consumo del flavonoide en el tiempo.

Considerando los procesos elementales por los cuales el oxígeno molecular singlete se genera y reacciona con el flavonoide, la velocidad de consumo del flavonoide (F) estará dada por la ecuación 4.

$$-d[F]/dt = k_r [^1O_2][F] \quad \text{Ecuación (4)}$$

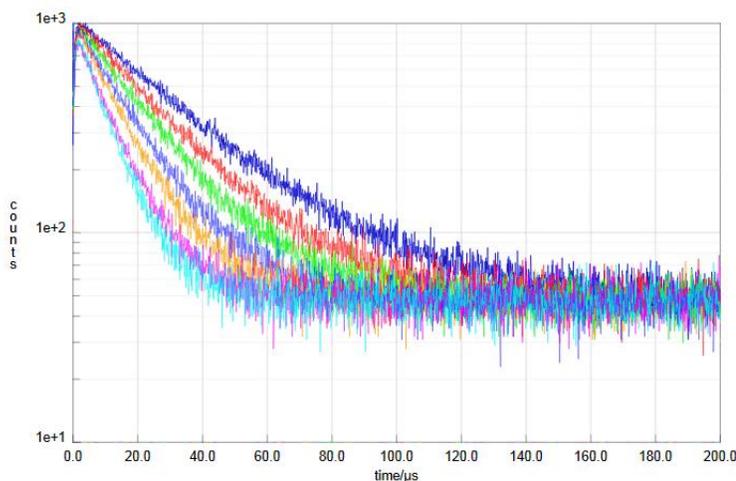
Si se considera que la concentración de oxígeno molecular singlete se mantienen en estado estacionario, es decir, permanece constante en el tiempo, la velocidad se puede expresar como una cinética de pseudo primer orden (ecuación 5), en la que el valor de constante de velocidad experimental,  $k_{exp}$ , se obtiene del graficar  $\ln([F]_0/[F])$  v/s tiempo. En igualdad de condiciones, se repite el experimento con un actinómetro que reacciona solo químicamente con esta especie excitada, cuya constante de velocidad reactiva es conocida,

obteniéndose la concentración estacionaria del oxígeno excitado, lo que permite obtener el valor de la constante de velocidad reactiva  $k_r$  para el sustrato de interés.

$$-d[F]/dt = k_{exp}[F] \quad \text{Ecuación (5)}$$

#### 5.4. Espectroscopía resuelta en el tiempo

El equipo de espectroscopía resuelta en el tiempo permite observar el decaimiento de oxígeno excitado, midiendo su emisión infrarroja a 1270 nm que es característica de esta especie, ya sea en el solvente puro o en presencia de un sustrato reactivo (Fig. 13). La disminución de la luminiscencia ( $I$ ) del oxígeno molecular singlete en el tiempo se puede ajustar a un modelo de decaimiento exponencial (ecuación 6).



**Figura 13.** Decaimiento de la intensidad de la emisión infrarroja de oxígeno molecular singlete en el tiempo en presencia de morina.

$$I = I_0 e^{-t/\tau_D} \quad \text{Ecuación (6)}$$

En consecuencia, el equipo permite obtener el tiempo de vida del oxígeno excitado en ausencia ( $\tau_0$ ) y en presencia ( $\tau_D$ ) del sustrato F dado, cuyo inverso corresponde al valor de  $k_D$ . Al aplicar la ecuación de Stern–Volmer a los datos de tiempo obtenidos en el solvente puro y a diferentes concentraciones de sustrato, se obtiene la constante de velocidad de desactivación total  $k_T$  (ecuación 7).

$$\tau_0/\tau_D = 1 + k_T \tau_0 [F] \quad \text{Ecuación (7)}$$

donde

$$k_D = 1/\tau_D;$$

$$k_d = 1/\tau_0;$$

$$k_T = k_q + k_r.$$

### 5.5. Determinación de la hidrofobicidad de flavonoides

La hidrofobicidad de los flavonoides estudiados se determinó por medidas de coeficiente de reparto en los sistemas octanol/agua y octanol/buffer pH7,4. En primer lugar, se mezclan cantidades iguales de los solventes octanol y agua, y octanol y buffer pH7,4, con agitación durante 24 horas para que las fases se saturan mutuamente, y luego se deja reposando 24 horas más para que las fases se separen adecuadamente. Una vez separadas las fases, se toman 2 ml de

octanol saturado en agua, se agrega una cantidad suficiente de flavonoide para obtener una solución 1 mM de quercetina, morina, 3–hidroxiflavona y Luteolina, y 5 mM de catequina, y sobre esta se agrega 2 ml de agua saturada en octanol. Las mezclas se agitan durante 24 horas a 20° C y luego se dejan reposar durante 24 horas más. A través de espectroscopía UV-Vis se mide la absorbancia en la fase octanol antes de realizar la mezcla y una vez ocurrido el reparto.

## **5.6. Preparación de vesículas**

Las vesículas unilamelares grandes (LUV's) de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) son preparadas mediante el método de inyección controlada. Este consiste en inyectar 1,5 ml de una solución de DPPC en cloroformo con una bomba de jeringa Cole-Parmer serie 74900. La solución se inyecta a una velocidad de 4 ml/hora en 4,5 ml de agua termorregulada a 73° C y es purgada continuamente con nitrógeno para facilitar la evaporación del cloroformo. Una vez terminada la inyección, se mantiene la puga de nitrógeno por 10 minutos y la temperatura a 73° C por otros 30 minutos para asegurar la remoción total del solvente orgánico. Luego se deja enfriar hasta que alcanza la temperatura ambiente y se lleva a un matraz aforado de 5 ml, obteniéndose una solución de vesículas 10 mM de DPPC, las que se utilizan para las mediciones en las que el sensibilizador es rosa de bengala. Para las mediciones en las que el sensibilizador corresponde a azul de metileno, se varía la composición de la

solución de inyección, manteniendo las demás condiciones de preparación, de tal forma de obtener una solución de vesículas 9 mM de DPPC y 1 mM de octadecilamina, esta última le otorga carga positiva a la superficie de los agregados y mantiene alejado de la interfase al sensibilizador, que también posee carga positiva.

La incorporación de los flavonoides en la interfase de las vesículas se realiza mediante la adición de alícuotas de bajo volumen de estas sustancias, altamente concentradas, en etanol. Luego se homogeniza y se deja durante 30 min en un baño termostático a 43° C, es decir, sobre la temperatura de transición de fase gel-lípido cristalino, que corresponde a 41° C para DPPC, lo que permite que estos agregados sean más permeables<sup>(202)</sup>.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ESTUDIOS EN MEDIO HOMOGÉNEO

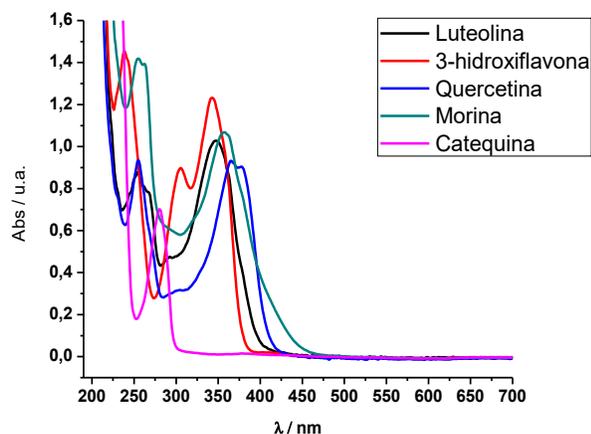
### 6.1. Estequiometría y constantes de asociación de los complejos estudiados

La determinación de la estequiometría y de la constante de asociación de los complejos formados por flavonoides e iones metálicos, se realizó utilizando los métodos de Job y de Benesi–Hildebrand, respectivamente. En todos los experimentos se utilizó metanol como solvente.

En el espectro de absorción UV-Vis, las flavonas se observan dos bandas características en metanol, una correspondiente al sistema conjugado del anillo A o grupo cromona (banda II), y otra que corresponde a la conjugación del anillo B o grupo 2–fenilo (banda I). El flavonoide catequina presenta solo una banda de absorción característica en este solvente (Tabla 6). En la Fig. 14 es posible observar los espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides.

**Tabla 6.** Bandas de absorción UV–Vis de flavonoides en metanol.

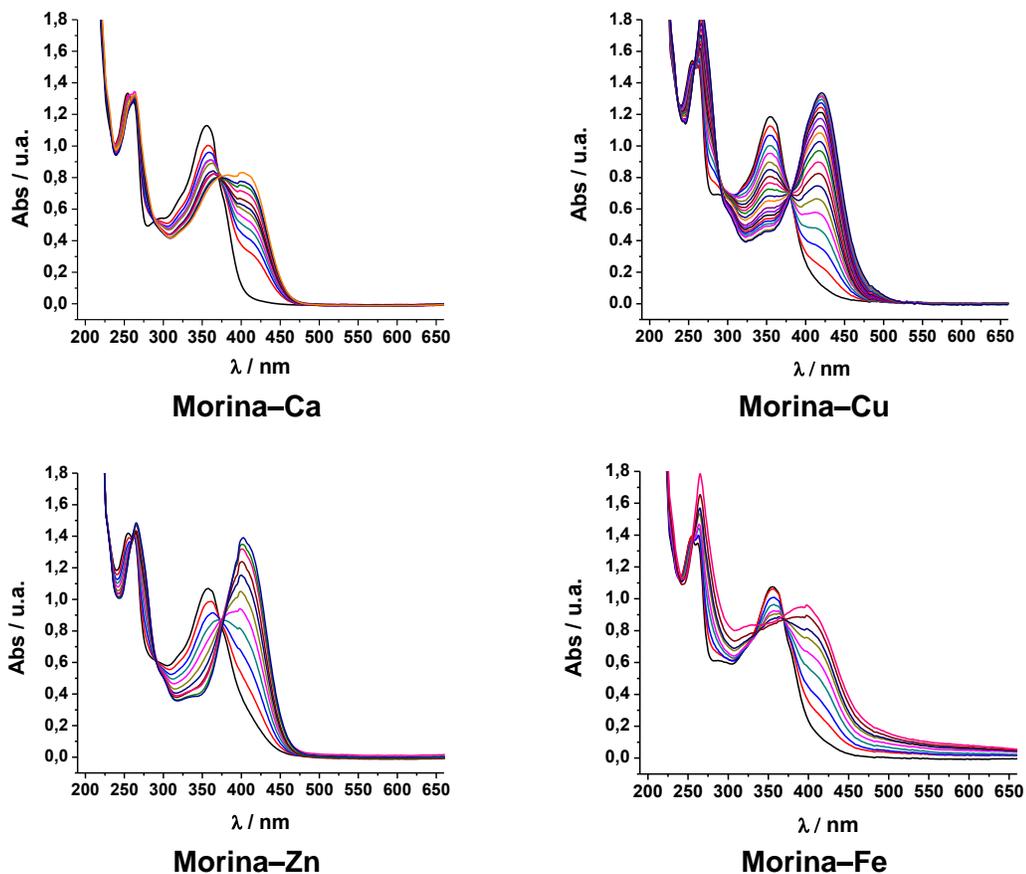
Flavonoide	$\lambda_{\text{banda I}} / \text{nm}$	
	banda I	banda II
Morina	357	254
Quercetina	371	255
3–HF	343	238
Catequina	280	-
Luteolina	347	254



**Figura 14.** Espectros de absorción UV–Vis de flavonoides en metanol.

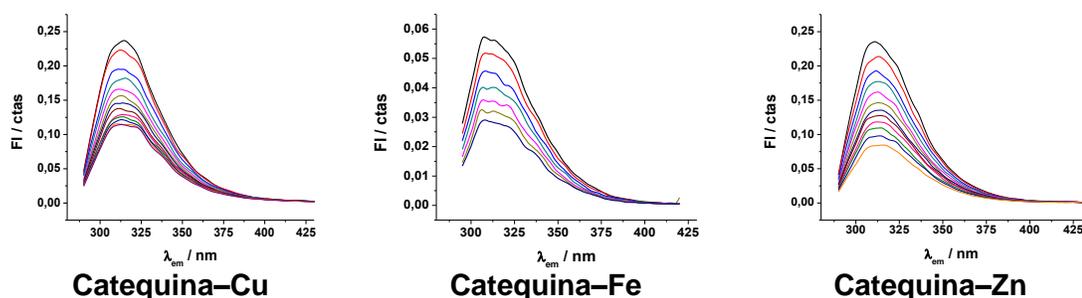
La adición de un ion metálico a la solución de flavonoide genera cambios sustantivos en los espectros de absorción UV-Vis en la mayoría de los flavonoides estudiados, observándose un desplazamiento, dando cuenta de la formación de un complejo. De acuerdo con los resultados, se observa un desplazamiento batocrómico en los espectros de morina, quercetina, 3-hidroxi-flavona y luteolina (Fig. 15), como consecuencia de la disminución de la banda I y la aparición de una nueva señal de absorción a mayores longitudes de onda. En general, la banda II no se ve mayormente afectada por la presencia de un ion metálico. La aparición de una nueva banda de absorción a mayores longitudes de onda es indicativa de una fuerte interacción entre el flavonoide y el ion metálico, compatible con la formación de un complejo de asociación. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 7), se puede observar que la magnitud de este cambio se relaciona con las propiedades del ion metálico. Los corrimientos en las bandas de absorción de los flavonoides cuando se

encuentran formando complejos con iones metálicos, se podrían deber a la extensión del sistema conjugado, resultante de la presencia del ion metálico en la molécula. Se debe tener en consideración que en todos los casos en los que ocurre un corrimiento batocrómico del máximo de absorción, se observa un punto isobéstico, lo que sugiere la formación de un único complejo. Este comportamiento regular no se observa en los espectros UV-Vis cuando el sustrato es Luteolina. Con este compuesto, cuando ocurre la complejación con  $\text{Cu}^{+2}$ , se observan diferencias tanto en la banda I como en la banda II.



**Figura 15.** Espectros de absorción de morina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.

En los experimentos con catequina como sustrato, no se observaron diferencias significativas en la longitud de onda del máximo de absorción, independiente del ión metálico utilizado, y para evaluar la formación de complejos se recurrió a mediciones mediante espectroscopía de fluorescencia (Fig. 16). Estos dos flavonoides, a diferencia de morina, quercetina y 3-hidroxi-flavona, no poseen en su estructura una de las sustituciones donde se produciría preferentemente la complejación (3-OH y 4-oxo).



**Figura 16.** Espectros de fluorescencia de catequina a concentración variable de ión metálico.

Las bandas de absorción de complejos formados por los iones metálicos  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  en general muestran que los coeficientes de extinción son elevados y la separación de la banda correspondiente a la absorción del flavonoide está suficientemente resuelta para permitir la determinación de la estequiometría a través del método de Job sin inconvenientes (Fig. 17). Los complejos formados por catequina y luteolina con estos iones metálicos (excepto el complejo luteolina-Cu) presentan máximos de absorción que son cercanos o están sobre

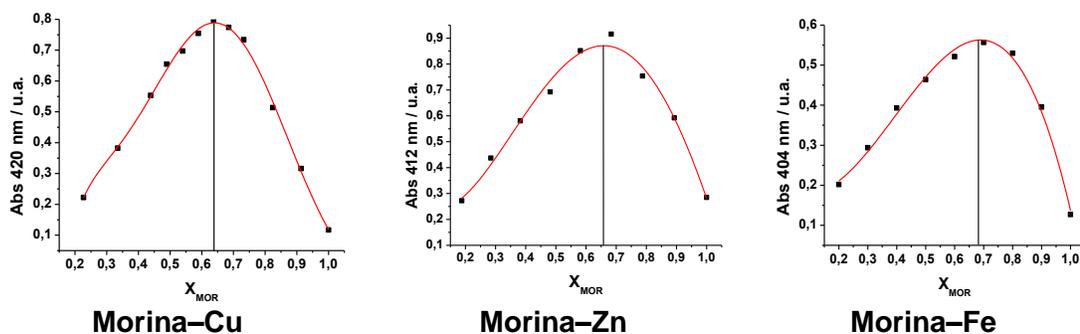
la banda de absorción de los flavonoides sin complejar, lo que dificulta su observación cuando se mide en estado de equilibrio. Debido a esto, para determinar la estequiometría de los complejos formados por catequina y luteolina, se prefirió recurrir al método de Benesi–Hildebrand, analizando los datos experimentales, con las ecuaciones correspondientes a interacciones 1:1 y 2:1 flavonoide–metal. Como se señaló anteriormente, el método, además, permite la determinación de la constante de asociación. Para los complejos formados por catequina fue necesario utilizar espectroscopía de fluorescencia, debido a que las longitudes de onda de los máximos de absorción correspondientes a catequina y sus complejos con iones metálicos diferían solo en aproximadamente 5 nm. Utilizando la emisión fluorescente de catequina ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=311$  nm en metanol) los resultados obtenidos son más confiables.

Los complejos formados con  $Ca^{+2}$  presentan constantes de asociación bajas en comparación con los formados con metales de transición, por lo que también fue necesario establecer el mejor ajuste en las ecuaciones de Benesi–Hildebrand para determinar la estequiometría. No se observó formación de complejos con este ion metálico con los flavonoides luteolina y catequina. Esta diferencia en la asociación de los flavonoides con el metal alcalino terreo podría deberse a la ausencia de orbitales *d* en la capa electrónica externa, respecto de los otros metales utilizados, aun cuando se ha descrito que, de los elementos que componen el grupo II, tanto Magnesio como Calcio muestran tendencia a formar complejos en solución<sup>(203)</sup>. Cuando ocurre la formación del complejo entre un

ligando y un metal de transición, los orbitales d de estos iones se distribuyen en niveles de diferente energía, estabilizando la estructura formada, en acuerdo con la Teoría del Campo Cristalino, situación que no se presenta en iones que no tienen estos orbitales. También se debe considerar que el  $\text{Ca}^{+2}$  se considera un ácido de Lewis, y pertenece al grupo de iones fuertes, lo cual favorece la formación de asociaciones con  $\text{F}^-$  y con ligandos que poseen oxígeno en su estructura, categorizados como bases de Lewis fuertes, de acuerdo con el principio de *Hard and Soft Acids and Bases*<sup>(204,205)</sup>.

La estequiometría de los complejos determinada experimentalmente corresponde a 1:1 para la mayoría de los pares flavonoide–metal, excepto para aquellos formados entre morina y metales de transición; y para 3–hidroxiflavona y  $\text{Fe}^{+2}$ , los que mostraron estequiometría 2:1 (flavonoide:metal). Este resultado sugiere que tanto la estructura del flavonoide, como también la naturaleza del ión metálico determinan la estructura del complejo que se forma. Al respecto, se observan diferencias con estudios realizados bajo condiciones similares a las de este trabajo, donde una de estas es la formación de un único complejo. La formación de complejos en una estequiometría dada no ocurre en solo un paso, si no a través del equilibrio de cada una de las moléculas y/o iones que se asocian, por lo que es posible que en existan complejos con asociaciones que involucren estructuras mayores, sin embargo, están no serían predominantes, por lo que bajo la metodología utilizada solo se observaría la que presenta mayor concentración en solución. Entre los estudios que se pueden comparar con los

análisis y resultados obtenidos en esta tesis, se encuentran los de Bukhari y col., que encontraron una estequiometría de 1:2 (flavonoide:metal) para el complejo quercetina–Cu en metanol, utilizando el método de Job para la obtención de su resultado<sup>(216)</sup>; Panhwar y col., que determinaron la estequiometría del complejo morina–Cu en metanol, a través del método de Job y titulación con EDTA, siendo 1:1<sup>(150)</sup>; y Cornard y col. obtienen un único complejo de estequiometría 1:1 en metanol para la asociación entre 3–hidroxiflavona y  $Zn^{+2}$ <sup>(217)</sup>.



**Figura 17.** Gráficos de Job de complejos formados entre morina y metales de transición.

La interacción flavonoide–metal modifica los espectros de absorción UV-Vis y el mayor cambio corresponde al corrimiento batocrómico de la banda asociada al sistema conjugado del anillo B (banda I), lo que implica que la complejación ocurriría preferentemente en sitios que afectan directamente a este sistema conjugado. Para el caso de quercetina, se encuentra que los valores de las constantes de formación de todos los complejos, excepto con  $Fe^{+2}$ , son similares

a los determinados para 3-hidroxi-flavona, flavonoide que solo posee un sitio de complejación entre los grupos 3-OH y 4-oxo. Este resultado sugiere que ambos sustratos complejarían a los iones metálicos en el mismo sitio y que los grupos hidroxilos presentes en otras posiciones no afectan sustantivamente la capacidad complejante del flavonoide. El flavonoide morina forma complejo 1:1 con  $\text{Ca}^{+2}$  y su constante de asociación es 15 veces mayor que la obtenida para la quercetina. Por otra parte, los complejos formados con metales de transición tienen estequiometría 2:1 flavonoide-metal. Este resultado es indicativo de que el cambio del grupo catecol por un grupo resorcinol en el anillo B modifica la estequiometría del complejo flavonoide-metal, favoreciendo la interacción del metal con los grupos 3-OH y 4-oxo, posiblemente debido a un cambio en la densidad electrónica como consecuencia de la conjugación con el anillo B, cuya banda UV-Vis muestra el mayor desplazamiento cuando se forman los complejos. La absorción de catequina a 280 nm correspondería al sistema conjugado del anillo B; en este caso no se observan efectos electrónicos significativos del anillo A, y la interacción del ion metálico del flavonoide debería involucrar al grupo catecol, que, por las características de la catequina, corresponde al único sitio de probable complejación. En el caso de luteolina, se observan modificaciones importantes en la absorción correspondiente al anillo A cuando se compleja con  $\text{Cu}^{+2}$ , lo que sugiere que la formación de este complejo compromete a los grupos 4-oxo y 5-OH, y no al grupo catecol del anillo B, mientras que para los complejos formados con  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  se observa un cambio

mayor en la banda I. Cuando el sustrato es luteolina, las diferencias observadas en los espectros de absorción son indicativas de que el ion metálico con que interactúa modula al menos parcialmente el sitio de interacción. Además, se encontró que luteolina no forma complejos con el ion  $\text{Ca}^{+2}$ , lo cual confirmaría que la formación de complejos con iones metálicos es altamente favorecida en flavonas que incluyen en su estructura un grupo 4-oxo vecino al sustituyente 3-OH. Esta conclusión resulta de considerar la estructura de luteolina, cuya diferencia más importante con las demás moléculas estudiadas es la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3. Además, los otros sitios posibles para interactuar con  $\text{Ca}^{+2}$  no tendrían la fuerza como base, apropiada para asociarse con este ion metálico.

En forma general, la capacidad de complejación de los flavonoides con iones metálicos sigue el orden MORINA > 3-HIDROXIFLAVONA > QUERCETINA, considerando la molecularidad para los complejos que presentan estequiometría 2:1 (flavonoide:metal). Los flavonoides luteolina y catequina presentan capacidad complejante irregular de acuerdo con el metal con el que ocurre la asociación, lo cual puede deberse a la ausencia o cambio en la orientación de los grupos 3-OH y 4-oxo.

**Tabla 7.** Estequiometría, constante de asociación y banda de absorción UV-Vis principal de los complejos.

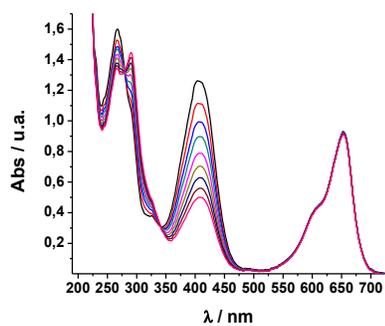
Complejo		$\lambda_{\text{banda I}} / \text{nm}$	$\Delta\lambda / \text{nm}$	Estequiometría (flavonoide:metal)	$K_{\text{FLA-M}}$
<b>Morina</b>	Ca <sup>+2</sup>	407	50	1:1	3,22x10 <sup>2</sup> M <sup>-1</sup>
	Cu <sup>+2</sup>	420	63	2:1	2,25x10 <sup>9</sup> M <sup>-2</sup>
	Zn <sup>+2</sup>	412	55	2:1	1,76x10 <sup>9</sup> M <sup>-2</sup>
	Fe <sup>+2</sup>	404	47	2:1	9,87x10 <sup>8</sup> M <sup>-2</sup>
<b>Quercetina</b>	Ca <sup>+2</sup>	420	49	1:1	2,02x10 <sup>1</sup> M <sup>-1</sup>
	Cu <sup>+2</sup>	441	70	1:1	2,21x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Zn <sup>+2</sup>	429	58	1:1	1,29x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Fe <sup>+2</sup>	434	63	1:1	1,10x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
<b>3HF</b>	Ca <sup>+2</sup>	406	63	1:1	1,52x10 <sup>1</sup> M <sup>-1</sup>
	Cu <sup>+2</sup>	416	73	1:1	2,36x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Zn <sup>+2</sup>	405	62	1:1	1,46x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Fe <sup>+2</sup>	398	55	2:1	9,73x10 <sup>8</sup> M <sup>-2</sup>
<b>Catequina</b>	Ca <sup>+2</sup>	NC	-	-	-
	Cu <sup>+2</sup>	275	5	1:1	7,11x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Zn <sup>+2</sup>	280	0	1:1	3,82x10 <sup>2</sup> M <sup>-1</sup>
	Fe <sup>+2</sup>	280	0	1:1	2,56x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
<b>Luteolina</b>	Ca <sup>+2</sup>	NC	-	-	-
	Cu <sup>+2</sup>	285	31	1:1	8,08x10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup>
	Zn <sup>+2</sup>	420	73	1:1	1,02x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>
	Fe <sup>+2</sup>	425	78	1:1	1,12x10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup>

**NC=** no hay formación de complejo

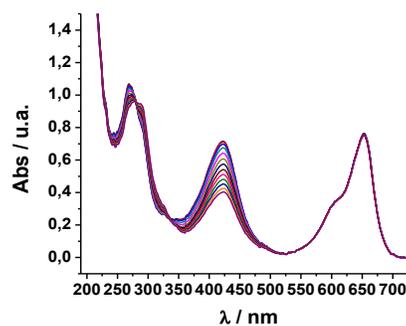
## **6.2. Constante de velocidad de reacción química, $k_r$ , entre los complejos y Oxígeno Molecular Singulete**

La constante de velocidad de reacción química entre los complejos y  $O_2(^1\Delta_g)$  se determinó a través del método de fotólisis estacionaria, utilizando metanol como solvente.

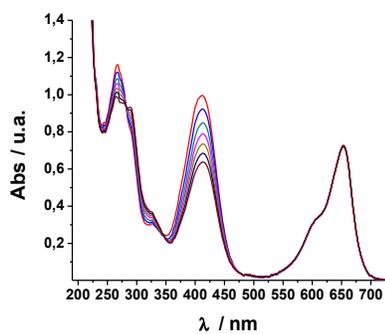
Se midió el consumo de los flavonoides y los complejos mediante espectroscopía UV-Vis o Fluorescencia, a diferentes tiempos de irradiación en presencia de un sensibilizador (Fig. 18) y, a partir de esta información, se evaluaron las constantes de velocidad de reacción química a través del ajuste a una cinética de pseudo primer orden (Fig. 19). Para evaluar la concentración estacionaria del  $O_2(^1\Delta_g)$  en las condiciones experimentales, se realizó una actinometría con 9,10-dimetilantraceno (DMA), cuyo mecanismo de reacción y su reactividad frente a  $O_2(^1\Delta_g)$  es bien conocida, y no presenta dependencia significativa con el solvente<sup>(206)</sup>.



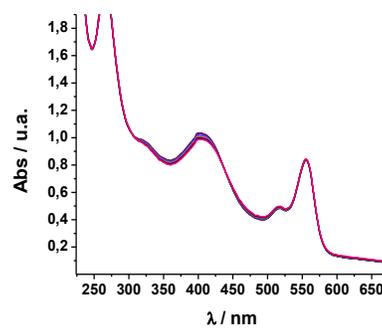
**Morina-Ca**



**Morina-Cu**

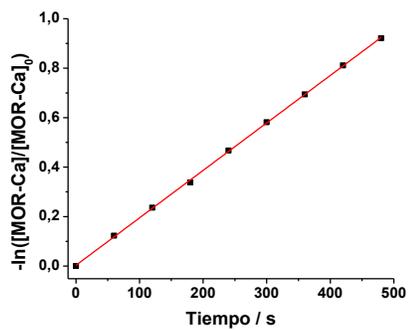


**Morina-Zn**

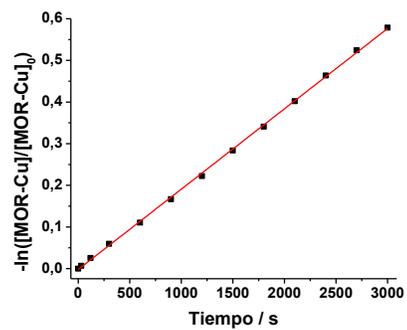


**Morina-Fe**

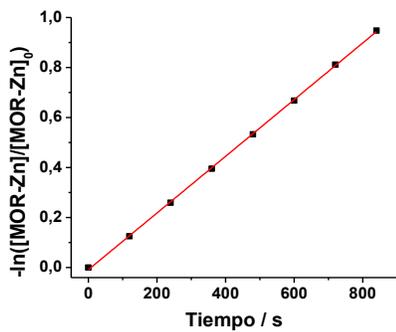
**Figura 18.** Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de morina por  $O_2(^1\Delta_g)$ .



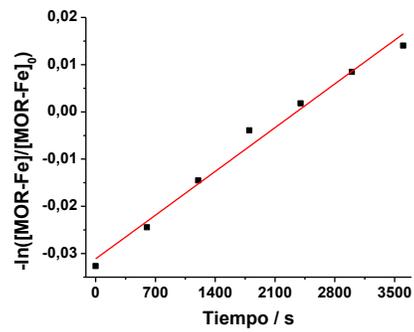
**Morina-Ca**



**Morina-Cu**



**Morina-Zn**



**Morina-Fe**

**Figura 19.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de morina.

**Tabla 8.** Constantes de velocidad de reacción química de los complejos frente a  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Complejo	$k_r / M^{-1} s^{-1} MeOH$	$R^2$	Sensibilizador	
<b>Morina</b>	-	$1,01 \times 10^6$	0,9980	Azul de Metileno
	$Ca^{+2}$	$2,80 \times 10^7$	0,9997	Azul de Metileno
	$Cu^{+2}$	$1,07 \times 10^6$	0,9995	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$4,72 \times 10^6$	0,9988	Azul de Metileno
	$Fe^{+2}$	$5,03 \times 10^5$	0,9880	Rosa de Bengala
<b>Quercetina</b>	-	$2,69 \times 10^5$	0,9962	Rosa de Bengala
	$Ca^{+2}$	$1,89 \times 10^7$	0,9878	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	$2,28 \times 10^7$	0,9990	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$6,72 \times 10^7$	0,9989	Azul de Metileno
	$Fe^{+2}$	B	-	Rosa de Bengala
<b>3-HF</b>	-	B	-	Rosa de Bengala
	$Ca^{+2}$	ND	-	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	$4,57 \times 10^6$	0,9964	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$6,87 \times 10^7$	0,9999	Azul de Metileno
	$Fe^{+2}$	$1,15 \times 10^6$	0,9910	Rosa de Bengala
<b>Catequina</b>	-	B	-	Rosa de Bengala
	$Ca^{+2}$	NC	-	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	B	-	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	B	-	Azul de Metileno
	$Fe^{+2}$	$2,43 \times 10^5$	0,9912	Rosa de Bengala
<b>Luteolina</b>	-	B	-	Rosa de Bengala
	$Ca^{+2}$	NC	-	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	B	-	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$7,08 \times 10^5$	0,9957	Azul de Metileno
	$Fe^{+2}$	$1,17 \times 10^5$	0,9851	Rosa de Bengala

**NC** = no hay formación de complejo; **ND** = no determinado el valor; **B** = bajo el límite de cuantificación del método ( $LC k_r = 1,81 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ )

Los resultados obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química,  $k_r$ , entre los complejos y  $O_2(^1\Delta_g)$  se muestran en la Tabla 8. Se observa que todos los complejos formados por quercetina presentan aumentos entre 1 y 2 órdenes de magnitud respecto del flavonoide sin complejar, a excepción del complejo formado con  $Fe^{+2}$ , para el cual se observó una constante de reacción bajo el límite de cuantificación y, por lo tanto, es más baja que la del flavonoide libre. Los complejos formados con 3-hidroxi flavona presentan valores mayores que el flavonoide sin complejar, sin embargo, no se puede cuantificar la magnitud de este aumento ya que la constante de reacción química del flavonoide libre es muy baja y no se puede observar por el cambio en las medidas espectroscópicas en igualdad de condiciones para el método de fotólisis estacionaria. Excepcionalmente, no se determinó el valor de la constante para el complejo 3HF-Ca, ya que los resultados experimentales producen valores posiblemente sobreestimados; esto se podría deber a interacciones entre el complejo y el sensibilizador utilizado, las que no se presentan con el flavonoide o el ion metálico libre, por sí solos. El flavonoide morina presenta un aumento de un orden de magnitud para el complejo formado con  $Ca^{+2}$ , pero los complejos formados con metales de transición, que presentan estequiometría 2:1, no muestran cambios significativos en la constante, e incluso, para el complejo formado con  $Fe^{+2}$ , el valor de la constante de velocidad de reacción química es menor que la del flavonoide sin complejar, reduciendo su valor a la mitad aproximadamente. Luteolina y el complejo formado con  $Cu^{+2}$ , presentan valores bajos para la

constante de velocidad de reacción química, por lo que no es posible determinarlas a través del método de fotólisis estacionaria debido a que se encuentran bajo el límite de cuantificación para el método; solo fue posible determinar este valor para los complejos formados con  $Zn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ . En el caso de catequina, se observa que, tanto para el flavonoide sin complejar como para los complejos formados con  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ , no es posible obtener los valores de las constantes, los que igualmente se encuentran bajo el límite de cuantificación del método, mientras que sí se observa un aumento en el complejo formado con  $Fe^{+2}$ .

Los cambios observados en la reactividad química de los complejos estudiados, respecto de los flavonoides sin complejar, podrían ser resultado de un cambio en la densidad electrónica del sitio reactivo de estas moléculas, que correspondería al doble enlace del anillo C<sup>(189,191,194)</sup>. Un aumento de densidad electrónica produciría una mayor efectividad en la interacción entre el complejo y el  $O_2(^1\Delta_g)$ , especie reconocida por su carácter electrofílico<sup>(207)</sup>. De esta forma, es posible observar que en la gran mayoría de los complejos estudiados existe un aumento en la reactividad química luego de ocurrida la complejación, y estos complejos corresponden a aquellos que presentan sustituciones que modifican en mayor medida la densidad electrónica en sitios cercanos al doble enlace del anillo C y que, además, participan en el proceso de asociación con los iones metálicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la presencia del doble enlace en el anillo C y del grupo 3-OH en el flavonoide, son fundamentales para dar cuenta de la magnitud de la constante de velocidad de reacción química, tanto del flavonoide libre como de los complejos formados con diferentes iones metálicos. Además, la presencia de otros grupos hidroxilos en la estructura de la molécula aumentan significativamente la reactividad de  $O_2(^1\Delta_g)$  con complejos que tienen estequiometría 1:1. De acuerdo con lo anterior, se observan valores mayores a  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para morina, quercetina y sus complejos (excepto el complejo quercetina-Fe), que poseen el grupo 3-OH y doble enlace en el anillo C, además de cuatro hidroxilos extra en sus estructuras, difiriendo solo en la posición de uno de estos en el anillo B; mientras que 3-hidroxiavona, que solo tiene un grupo hidroxilo en posición 3, presenta un valor bajo, de orden 5, de la constante de velocidad de reacción química del flavonoide libre, y mayor que orden 6 para los complejos con los diferentes iones metálicos. El flavonoide luteolina, que posee un doble enlace en el anillo C y cuatro grupos hidroxilos en su estructura, pero no tiene la sustitución 3-OH (estructura química comparable con quercetina excepto por la sustitución en la posición 3), tiene constantes de velocidad, correspondientes al flavonoide y a los complejos, indicativos de una baja reactividad, siendo solo determinable el valor para los complejos formados con  $Zn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ , los que se encuentran cercanos a  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Para la catequina no fue posible medir las constantes de velocidad ni en ausencia ni en presencia de iones metálicos, excepto para el complejo formado con  $Fe^{+2}$ , debido a su baja

reactividad, por lo que la interacción entre los complejos formados con este flavonoide y  $O_2(^1\Delta_g)$  no se produciría a través de interacción química, resultado compatible con la ausencia del doble enlace del anillo C en su estructura.

Los complejos formados entre morina y los metales de transición  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  no presentan cambios significativos en la reactividad química frente a oxígeno excitado; estos complejos se asocian con estequiometría 2:1 respecto a morina, lo que, aparentemente, no genera cambios drásticos en la densidad electrónica del doble enlace del anillo C, ya que el ion metálico modifica la densidad electrónica simultáneamente en dos moléculas en sentidos opuestos. La disminución de la reactividad química del complejo quercetina-Fe y morina-Fe respecto del flavonoide libre, se puede explicar a que este ion presenta casi todos los orbitales *d* desapareados, lo cual impide que se acople de manera adecuada a la molécula, lo que se traduce en un impedimento para atraer electrones hacia el sitio de interacción flavonoide-metal. En los demás flavonoides, el ion  $Fe^{+2}$  produce aumentos discretos en la reactividad, a excepción de catequina, donde el complejo catequina-Fe es el que presenta el mayor aumento en reactividad. Este flavonoide es estructuralmente distinto a los demás, ya que no posee doble enlace en el anillo C ni el grupo oxo en la posición cuatro, por lo que la complejación solo se puede producir en el grupo catecol de anillo B, parte de la molécula donde se produciría la interacción con  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Los complejos formados entre los flavonoides quercetina, 3–hidroxiflavona y luteolina, y  $Zn^{+2}$ , presentan constantes de velocidad de reacción química mayores cuando se compara con otros iones para el mismo flavonoide, a excepción de catequina, lo cual se podría deber a que este ion posee sus orbitales *d* completos; esto permite una mejor distorsión de estos en la estructura<sup>(208)</sup>, lo que mejora el desplazamiento de electrones en el complejo desde otros sitios de la molécula hacia el catión, posibilitando la obtención de una mayor densidad electrónica en el entorno del sitio de complejación, lo que incluye al doble enlace del anillo C del flavonoide.

Para los flavonoides luteolina y catequina se midió la constante de velocidad de reacción química en presencia de  $Ca^{+2}$ , con el fin de observar si la presencia del ion afectaba la reactividad de estas moléculas frente a oxígeno excitado, aun no formando complejos. Los experimentos mostraron que no hubo cambios en la velocidad de fotooxidación de los flavonoides, lo cual da cuenta de que la presencia de este catión no afecta la reactividad cuando no hay complejación.

Las mediciones para la determinación de las constantes de velocidad de reacción química se realizaron en condiciones de equilibrio, por lo tanto, en solución se encuentra presente el flavonoide libre y complejado. En el método de fotólisis estacionaria, esto conduce a disminuir la concentración estacionaria de  $O_2(^1\Delta_g)$ , debido a la reacción paralela de esta especie con el flavonoide libre. Para compensar este efecto, el equilibrio se desplazó hacia la formación del complejo,

agregando exceso de ion metálico, lo que resulta apropiado debido a que las constantes de formación de complejo indican que su formación está favorecida y, además, las constantes de velocidad de reacción química del flavonoide libre son sustantivamente menores respecto de las observadas para el flavonoide complejo en la mayoría de los casos. Los iones estudiados no interactúan ni física ni químicamente con el  $O_2(^1\Delta_g)$ , por lo que la adición en exceso de estos no afecta la concentración estacionaria de la especie excitada.

### **6.3. Constante de velocidad de desactivación total de Oxígeno**

#### **Molecular Singulete, $k_T$ , por los complejos**

La constante de velocidad de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $k_T$ , por los complejos, se determinó a través del método de espectroscopía resuelta en el tiempo, utilizando metanol como solvente.

Para evaluar  $k_T$ , se derivó una Ecuación de Stern–Volmer modificada que permite correlacionar linealmente el cambio observado del tiempo de vida con el aumento en la concentración del ion metálico. Considerando que las mediciones se realizaron en solución, donde se establece equilibrio entre los flavonoides y los iones, la velocidad de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$  está dada por la ecuación 8.

$$k_D = k_d + k_T^{Fla}[Fla] + k_T^{Fla-M}[Fla - M] \quad \text{Ecuación (8)}$$

Los términos de esta ecuación se reordenan de modo tal para obtener una ecuación lineal con intercepto igual a uno (ecuación 10).

$$k_D - k_d = k_T^{Fla}[Fla] + k_T^{Fla-M}[Fla - M] \quad \text{Ecuación (9)}$$

$$\frac{k_D - k_d}{k_T^{Fla}[Fla]} = 1 + \frac{k_T^{Fla-M}[Fla - M]}{k_T^{Fla}[Fla]} \quad \text{Ecuación (10)}$$

Finalmente, de la relación entre las concentraciones en solución del flavonoide, el ion metálico y el complejo, se obtiene la ecuación 11, con la concentración del ion metálico como variable independiente, que permite obtener la constante de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$  del complejo.

$$\frac{k_D - k_d}{k_T^{Fla}[Fla]} = 1 + \frac{k_T^{Fla-M}K_{Fla-M}}{k_T^{Fla}}[M] \quad \text{Ecuación (11)}$$

donde

$k_D$  velocidad de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$ ;

$k_d$  constante de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el solvente;

$k_T^{Fla}$  constante de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el flavonoide;

$k_T^{Fla-M}$  constante de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$  por el complejo;

$K_{Fla-M}$  constante de asociación entre el flavonoide y el ion metálico;

$[Fla]$  concentración del flavonoide en solución, y;

[*M*] concentración del ion metálico en solución.

En el equipo de espectroscopía resuelta en el tiempo se mide el tiempo de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  ( $\tau_D = 1/k_D$ ) a concentración variable del ion metálico y concentración inicial fija de flavonoide, por medidas de la emisión infrarroja a 1270 nm, característica del decaimiento de esta especie excitada. Estos datos se ajustan a la ecuación de Stern-Volmer modificada (Ecuación 11), y de la pendiente se obtiene el valor de la constante de desactivación total de Oxígeno Molecular Singlete por el complejo. Previamente es necesario conocer los valores de constantes de desactivación total del flavonoide libre, que se obtiene midiendo el tiempo de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$  en solución a concentración variable de flavonoide, ajustando estos datos a la ecuación de Stern–Volmer; y la constante de formación entre flavonoides e iones metálicos, obtenida a través del método de Benesi–Hildebrand.

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos para las constantes de velocidad de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $k_T$ , por los complejos estudiados. Los complejos que presentan mayor aumento en la constante de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$ , respecto del flavonoide libre, son quercetina y 3–hidroxiflavona, siendo estos de alrededor de dos órdenes de magnitud. Morina también presenta un aumento significativo para el complejo formado con con el ion  $Ca^{+2}$ , el cual es mayor a un orden de magnitud. La característica común entre estas tres

moléculas de flavonoide y los complejos mencionados es la presencia del doble enlace en el anillo C, el grupo 3-OH y estequiometría 1:1. Los complejos formados con estos mismos flavonoides, pero de estequiometría 2:1 no muestran aumentos significativos para la desactivación de la especie excitada. Para el flavonoide luteolina se observa un aumento en la constante de desactivación total comparable con quercetina, morina y 3-hidroxi-flavona, cuando el complejo es formado con  $Zn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ , mientras que si la complejación ocurre con  $Cu^{+2}$ , el aumento es menor y similar a los observados para los complejos formados con catequina, que presentan aumentos en las constantes de desactivación total menores a un orden de magnitud. Una excepción se encuentra para el complejo formado con  $Fe^{+2}$ , que es cerca de 25 veces más reactivo que el flavonoide libre. Los resultados obtenidos para los flavonoides se correlacionan con los valores obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química, que muestran un comportamiento menos predictivo, debido a la ausencia de sustituciones relevantes para la interacción con  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Los complejos formados por morina y 3-hidroxi-flavona con el ion  $Fe^{+2}$  tienen estequiometría 2:1 en las condiciones experimentales empleadas, por lo que para realizar la medida de la constante de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$  se estimó conveniente realizar la síntesis de estos. Los productos aislados correspondientes a estos complejos presentan una baja solubilidad en metanol, por lo que solo fue posible realizar medidas cualitativas en condiciones de

equilibrio. Para ambos complejos, cuando se mantiene constante la concentración inicial del flavonoide y se aumenta la del ion, se presenta una disminución en el tiempo de vida de la especie excitada. Esta información deja en evidencia que la asociación con el metal produce una mejoría en la capacidad desactivante de las moléculas de flavonoide, sin embargo, no fue posible encontrar una ecuación que describiera el comportamiento experimental observado.

La relación entre las constantes de velocidad de reacción química y constantes de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$ , muestra que la fracción de desactivación que corresponde a la formación de productos es alrededor de 3% para morina, excepto cuando el metal es el ion  $Zn^{+2}$ , donde la reactividad química es de alrededor del 20%; entre 20% a 25% para quercetina, excepto para el complejo formado con el ion  $Zn^{+2}$ , que tiene un porcentaje menor a 7% para la reactividad; menor a 1% para luteolina y catequina; y un comportamiento irregular para 3-hidroxiflavona. Estos resultados evidencian que la desactivación del  $O_2(^1\Delta_g)$  ocurre en gran medida a través de la vía de desactivación física, excepto para el complejo 3HF-Zn, en el que se observa un porcentaje de reactividad química superior al 50%. De acuerdo con los valores de las constantes de desactivación física, obtenidas a partir de la diferencia entre las constantes de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$  y de velocidad de reacción química, la desactivación física muy probablemente ocurre a través de la formación de un

exciplexo singlete con carácter de transferencia de carga, el cual se estabiliza mediante transferencia de carga desde el complejo a la molécula de oxígeno. Los procesos siguientes involucrarían un decaimiento al estado triplete para finalmente disociarse en el complejo y en oxígeno molecular en estado basal<sup>(81)</sup>.

Los resultados obtenidos sugieren que hay dos factores importantes que determinan la reactividad total de los complejos flavonoide-metal; a) la estructura del flavonoide, donde la presencia del doble enlace en el anillo C y el grupo 3-OH contribuye a un gran aumento en la constante de desactivación del oxígeno excitado; por el contrario, la reactividad es relativamente independiente del número de grupos hidroxilos en los anillos A y B; b) la naturaleza del ion que forma el complejo y su estequiometría, donde  $Zn^{+2}$  promueve los mayores aumentos de reactividad para los complejos que tienen estequiometría 1:1. El ion  $Zn^{+2}$  tiene orbitales *d*, los que probablemente están involucrados en la interacción con la molécula de flavonoide al momento de formar el complejo, sin embargo, tiene características que lo asimilan más a cationes del grupo II y no a metales de transición, porque los orbitales de la capa *d* están completos, resultando en un efecto similar al discutido anteriormente para dar cuenta del aumento en la reactividad química de los complejos formados con  $Zn^{+2}$ , es decir, la distorsión de estos orbitales, lo que facilitaría el desplazamiento de electrones en el complejo, aumentando la densidad electrónica en el entorno del sitio de complejación.

Otro aspecto importante a considerar durante el desarrollo de esta investigación es la interacción de flavonoides e iones metálicos con el sensibilizador utilizado para la generación del  $O_2(^1\Delta_g)$ . Se observó que el sensibilizador rosa de bengala interacciona con los iones metálicos  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ; los sensibilizadores azul de metileno y tetrafenilporfina sulfonato interaccionan con el ion  $Ca^{+2}$ ; y el sensibilizador azul de metileno interacciona con el flavonoide morina cuando se encuentra a altas concentraciones. Esta información es relevante, ya que las interacciones de iones metálicos y flavonoides con estos sustratos disminuyen su concentración efectiva en solución y/o modifican el rendimiento cuántico de generación del  $O_2(^1\Delta_g)$  de estas y, por tanto, podría cambiar la concentración estacionaria de la especie excitada, lo cual es un problema en particular cuando se requieren hacer mediciones en estado estacionario. Por otra parte, en mediciones resueltas en el tiempo, la medición no es afectada de forma importante por las interacciones sustrato-sensibilizador, ya que por lo general los sensibilizadores se utilizan en bajas concentraciones y una leve disminución en la concentración de estos, solo produce una disminución en la intensidad inicial de la señal de emisión infrarroja, teniendo bajo efecto en la concentración del sustrato. En efecto, para evidenciar la interacción entre un sustrato y un sensibilizador, se pueden observar cambios en la intensidad de la absorción a la longitud de onda de mayor absorción o cambios en la forma de la banda de absorción del sensibilizador y/o a través de cambios en la intensidad inicial de la señal de emisión infrarroja del oxígeno molecular singulete.

**Tabla 9.** Constante de velocidad de desactivación total del O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) por flavonoides y complejos.

Complejo		$k_T / M^{-1} s^{-1} \text{ MeOH}$	R <sup>2</sup>	$k_q / M^{-1} s^{-1} \text{ MeOH}$	$k_r/k_T / \%$	Sens
<b>Morina</b>	-	4,06 x 10 <sup>7</sup>	0,9991	3,96 x 10 <sup>6</sup>	2,48	TPP Zn
	Ca <sup>+2</sup>	7,70 x 10 <sup>8</sup>	0,9977	7,49 x 10 <sup>8</sup>	3,65	RB
	Cu <sup>+2</sup>	3,73 x 10 <sup>7</sup>	0,9972	3,63 x 10 <sup>7</sup>	2,87	TPP Zn
	Zn <sup>+2</sup>	2,31 x 10 <sup>7</sup>	0,9871	1,84 x 10 <sup>7</sup>	20,44	TPP Zn
	Fe <sup>+2</sup>	>	-	-	-	RB
<b>Quercetina</b>	-	9,95 x 10 <sup>5</sup>	0,9823	7,26 x 10 <sup>5</sup>	27,03	RB
	Ca <sup>+2</sup>	1,38 x 10 <sup>8</sup>	0,9743	1,07 x 10 <sup>8</sup>	22,17	RB
	Cu <sup>+2</sup>	1,22 x 10 <sup>8</sup>	0,9988	9,92 x 10 <sup>7</sup>	18,67	MB
	Zn <sup>+2</sup>	7,71 x 10 <sup>8</sup>	0,9961	7,66 x 10 <sup>8</sup>	6,12	MB
	Fe <sup>+2</sup>	6,63 x 10 <sup>8</sup>	*	-	-	RB
<b>3HF</b>	-	3,61 x 10 <sup>5</sup>	*	-	-	RB
	Ca <sup>+2</sup>	1,68 x 10 <sup>7</sup>	0,9892	-	-	RB
	Cu <sup>+2</sup>	8,91 x 10 <sup>7</sup>	0,9948	5,70 x 10 <sup>7</sup>	7,58	MB
	Zn <sup>+2</sup>	1,30 x 10 <sup>8</sup>	0,9961	3,51 x 10 <sup>7</sup>	61,05	MB
	Fe <sup>+2</sup>	>	-	-	-	RB
<b>Catequina</b>	-	6,84 x 10 <sup>6</sup>	0,9911	-	-	TPP Zn
	Ca <sup>+2</sup>	NC	-	-	-	-
	Cu <sup>+2</sup>	3,35 x 10 <sup>7</sup>	0,9851	-	-	TPP Zn
	Zn <sup>+2</sup>	4,36 x 10 <sup>7</sup>	0,9962	-	-	TPP Zn
	Fe <sup>+2</sup>	1,85 x 10 <sup>8</sup>	0,9782	1,85 x 10 <sup>8</sup>	0,13	RB
<b>Luteolina</b>	-	4,05 x 10 <sup>5</sup>	0,9389	-	-	TPP Zn
	Ca <sup>+2</sup>	NC	-	-	-	-
	Cu <sup>+2</sup>	1,59 x 10 <sup>6</sup>	0,9920	-	-	TPP Zn
	Zn <sup>+2</sup>	1,34 x 10 <sup>8</sup>	0,9954	1,33 x 10 <sup>8</sup>	0,53	TPP Zn
	Fe <sup>+2</sup>	5,18 x 10 <sup>7</sup>	0,9967	5,17 x 10 <sup>7</sup>	0,22	RB

**ND** = no determinado; **NC** = no hay formación de complejo; Sensibilizadores: **TPP Zn** = tetrafenilporfina de zinc; **RB** = rosa de bengala; **MB** = azul de metileno; (\*) = medición entre 2 puntos; Error = 2.4%

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ESTUDIOS EN MEDIO MICROHETEROGÉNEO**

### **7.1. Determinación de los coeficientes de partición de flavonoides**

Se determinaron los coeficientes de partición octanol/agua y octanol/buffer fosfato pH 7,4 de los flavonoides estudiados.

Determinar el coeficiente de partición de los flavonoides corresponde a una buena aproximación para medir la hidrofobicidad de moléculas en sistemas hidrofílico-lipofílicos, como lo son los sistemas compartimentalizados<sup>(209)</sup>. Sin embargo, se debe tener en consideración que estos experimentos no pueden mimetizar completamente la naturaleza de la interfase formada entre las moléculas de agua y los grupos polares de los fosfolípidos que constituyen los liposomas en el medio microheterogéneo, y tampoco representan la fuerte interacción iónica de las moléculas cargadas con la cabeza polar de estos lípidos<sup>(210)</sup>.

Los coeficientes de partición se midieron determinando la absorbancia de los flavonoides en octanol antes del reparto y, después de alcanzado el equilibrio de distribución, la absorbancia remanente en la fase orgánica y la absorbancia en la fase acuosa. Los resultados obtenidos y el tratamiento de los datos se incluyen

en la tabla 10, para los repartos octanol/agua y en la tabla 11 para los repartos octanol/buffer fosfato pH 7,4.

**Tabla 10.** Concentración inicial (i) y final (f) del flavonoide en la fase orgánica, y coeficiente de partición octanol/agua.

Flavonoide	Abs <sub>i</sub>	Conc <sub>i</sub>	Abs <sub>f</sub>	Conc <sub>f</sub>	% en fase octanol	logP
Quercetina	0,46633	7,84 x 10 <sup>4</sup>	0,41953	7,04 x 10 <sup>4</sup>	89,8	0,95
Morina	0,39282	7,56 x 10 <sup>4</sup>	0,34682	6,67 x 10 <sup>4</sup>	88,3	0,88
3-hidroxi flavona	0,81206	1,78 x 10 <sup>3</sup>	0,80126	1,76 x 10 <sup>3</sup>	98,9	1,95
Luteolina	0,79708	1,32 x 10 <sup>3</sup>	0,76595	1,27 x 10 <sup>3</sup>	96,4	1,43
Catequina	0,42551	4,32 x 10 <sup>2</sup>	0,27678	2,80 x 10 <sup>3</sup>	64,8	0,26

**Tabla 11.** Concentración inicial (i) y final (f) del flavonoide en la fase orgánica, y coeficiente de partición octanol/buffer pH 7,4.

Flavonoide	Abs <sub>i</sub>	Conc <sub>i</sub>	Abs <sub>f</sub>	Conc <sub>f</sub>	% en fase octanol	logP
Quercetina	0,44186	7,44 x 10 <sup>4</sup>	0,38807	6,48 x 10 <sup>4</sup>	87,1	0,83
Morina	0,50136	9,68 x 10 <sup>4</sup>	0,38334	7,38 x 10 <sup>4</sup>	76,5	0,51
3-hidroxi flavona	0,99494	2,18 x 10 <sup>3</sup>	0,96705	2,12 x 10 <sup>3</sup>	97,2	1,54
Luteolina	0,65013	1,08 x 10 <sup>3</sup>	0,63254	1,05 x 10 <sup>3</sup>	97,4	1,57
Catequina	0,57379	5,80 x 10 <sup>3</sup>	0,37045	3,75 x 10 <sup>3</sup>	64,6	0,26

Los resultados muestran que en todos los casos existe una disminución de la concentración final de flavonoide en la fase orgánica, indicando que una fracción de la sustancia se desplaza hacia la fase acuosa. Los coeficientes de partición son una medida que indica la proporción del desplazamiento de las sustancias entre las fases, siendo menor cuando mayor es el desplazamiento hacia la fase

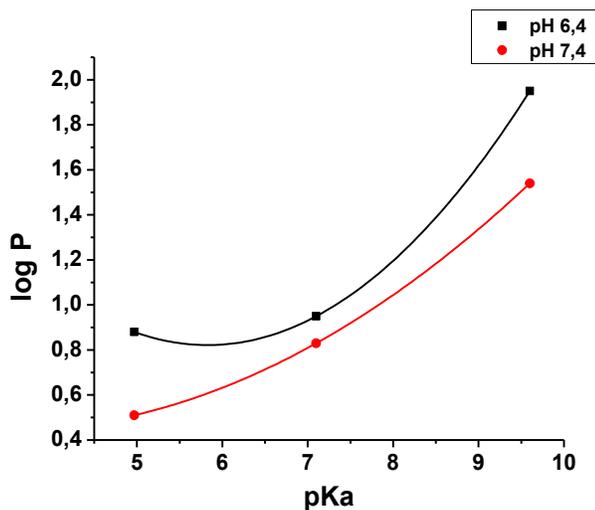
acuosa. Los resultados obtenidos indican que catequina y morina tienen los menores coeficientes de partición, tanto para las medidas en agua ultrapura como en buffer pH 7,4. Además, morina muestra la mayor variación de logP cuando se comparan los valores obtenidos en medio acuoso, con tampon pH 7. En medio tamponado, la disolución de morina está favorecida respecto de agua ultrapura. Finalmente, los valores más altos para el coeficiente de partición corresponden a luteolina y 3-hidroxiflavona, lo que implica que ambas moléculas tienen un comportamiento marcadamente hidrofóbico, al permanecer en gran medida en la fase orgánica.

**Tabla 12.** Valores de pKa reportados en la literatura para los flavonoides estudiados.

<b>Flavonoide</b>	<b>pKa<sub>1</sub></b>	<b>pKa<sub>2</sub></b>	<b>pKa<sub>3</sub></b>
<b>Quercetina</b> <sup>(211)</sup>	7,10 ± 0,12	9,09 ± 0,11	11,12 ± 0,36
<b>Morina</b> <sup>(211)</sup>	4,97 ± 0,03	8,37 ± 0,08	10,18 ± 0,12
<b>3-hidroxiflavona</b> <sup>(212)</sup>	9,6	-	-
<b>Luteolina</b> <sup>(213)</sup>	7,06	-	-
<b>Catequina</b> <sup>(211)</sup>	8,68 ± 0,23	9,70 ± 0,24	11,55 ± 0,20

La diferencia fundamental entre los dos tipos de experimentos realizados está en el pH de la fase acuosa. Para el agua ultrapura se midió un pH = 6,4 y el buffer fosfato presenta pH = 7,4. Bajo estas condiciones, resulta importante considerar los valores para los pKa de las moléculas, los que se incluyen en la tabla 12. A pH 6,4 los flavonoides están en gran medida protonados debido a que su pKa es superior a 7, a excepción de morina para la cual se ha reportado un pKa =4,9.

Esto quiere decir que la estructura en general está no cargada, por lo que la polarización de cargas dentro de la molécula determinará su tendencia a pasar desde la fase orgánica a la acuosa, mientras que morina, al tener una fracción de moléculas desprotonadas, es más hidrofílica. Esto conduce a que, a menor pH, los valores de los coeficientes de partición sean mayores debido a la baja ionización, mientras que al aumentar el pH las moléculas se desprotonan y tienden a ser más hidrofílicas. En efecto, entre los flavonoides que presentan doble enlace en el anillo C, grupo cetónico en la posición 4 y grupo hidroxilo en la posición 3, es posible observar un comportamiento tendencial entre el pKa y los coeficientes de partición de estas moléculas a los diferentes pH estudiados (Fig. 20).



**Figura 20.** Relación entre pKa y coeficiente de partición (log P) de flavonoles a diferente pH del medio acuoso.

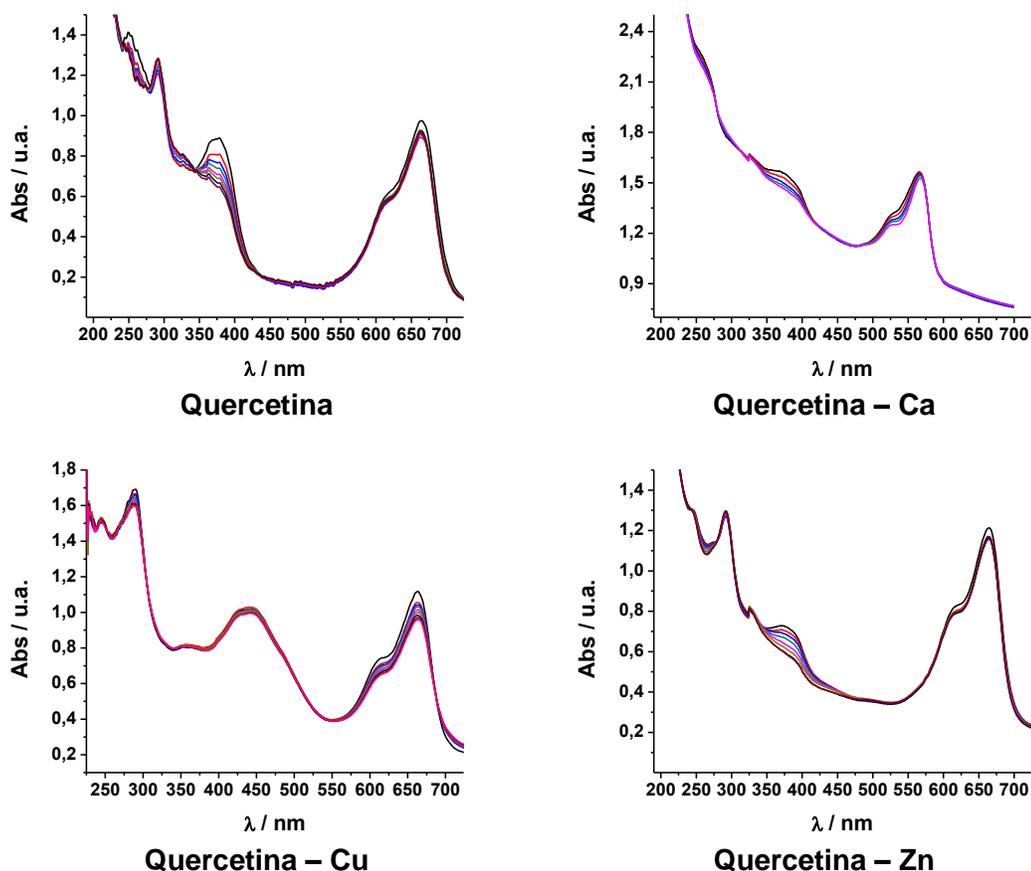
Luteolina presenta coeficientes de partición altos, comparables con los observados para la 3-hidroxi flavona, sin embargo, su pKa es menor y cercano al de quercetina, lo que muestra la relevancia de la sustitución 3-OH de la estructura en la hidrofobicidad de la molécula, por sobre el número de grupos hidroxilos totales. Catequina tiene a ambos pH el mismo coeficiente de partición, lo que se puede explicar por el hecho de que su pKa es 8,68, por lo que en ambas condiciones la molécula se encuentra en su forma protonada. Es posible que, en el caso de la catequina, la separación intramolecular de carga entre los anillos catecol y resorcinol sea más importante, lo que le confiere polaridad a la molécula y, por lo tanto, mayor hidrofiliidad.

## **7.2. Constantes de velocidad de reacción química, $k_r$ , entre los complejos y Oxígeno Molecular Singulete**

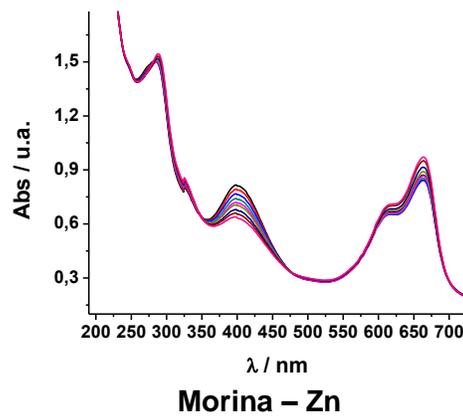
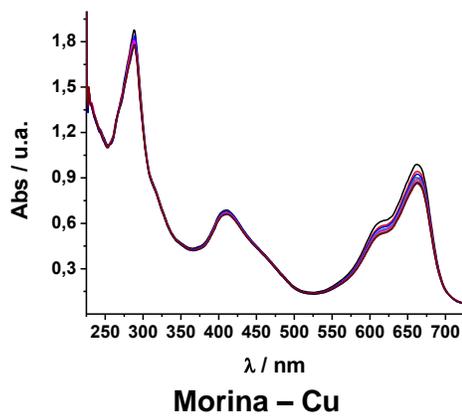
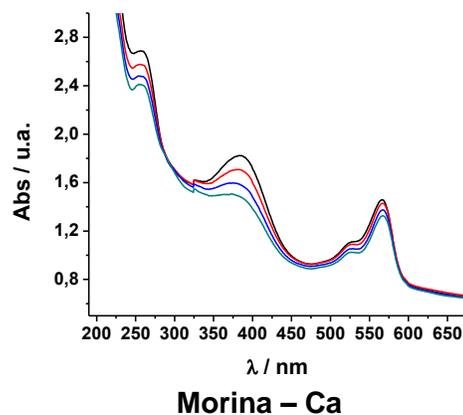
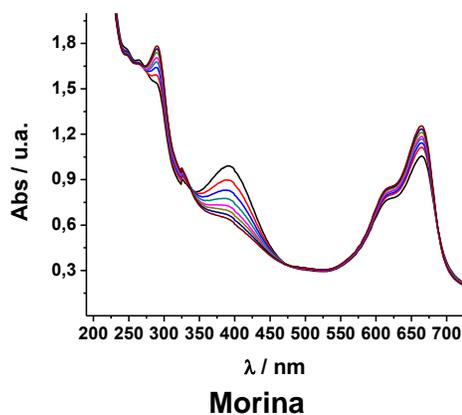
La constante de velocidad de reacción química entre los complejos y  $O_2(^1\Delta_g)$  en medio microheterogeneo se determinó a través del método de fotólisis estacionaria.

Se midió el consumo de los flavonoides y los complejos mediante espectroscopía UV-Vis (Fig. 21, 22), a diferentes tiempos de irradiación, en presencia de un sensibilizador y, a partir de estos datos, se evaluaron las constantes de velocidad de reacción química a través del ajuste a una cinética de pseudo primer orden (Fig. 23, 24). Para evaluar la concentración estacionaria

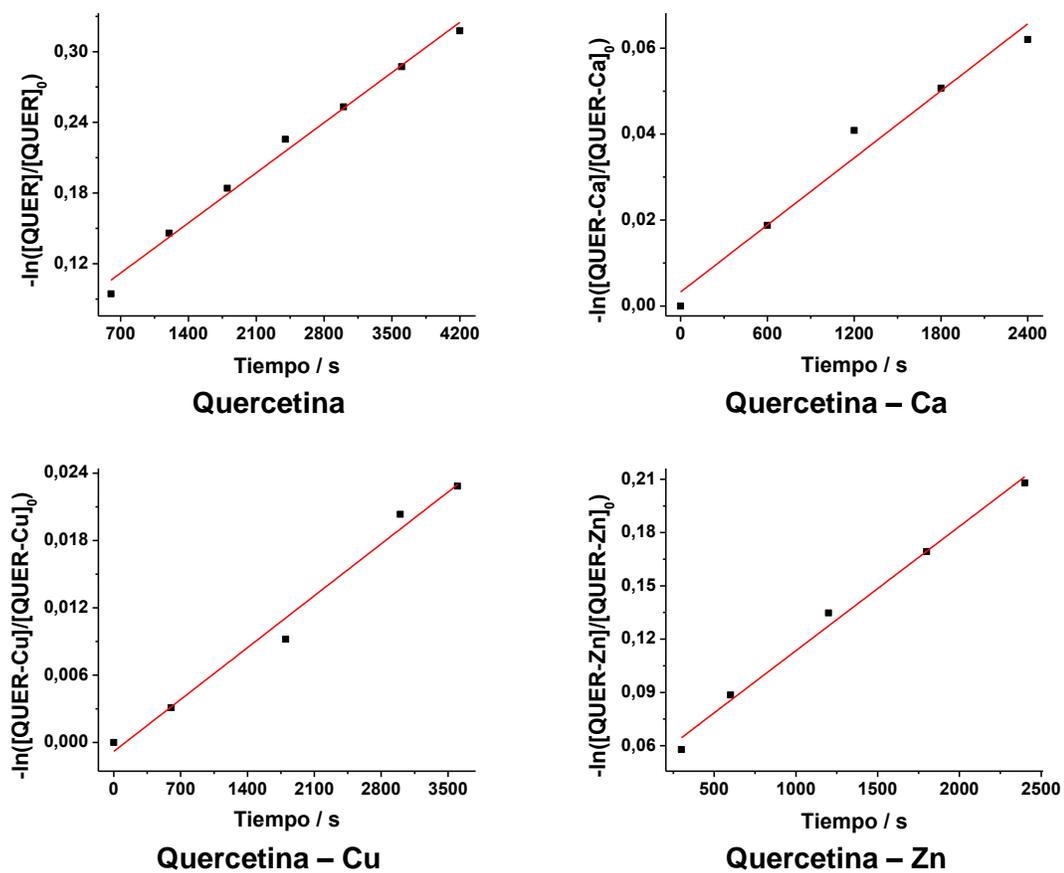
de  $O_2(^1\Delta_g)$  en las condiciones experimentales, se realizó una actinometría con 9,10-dimetilantraceno (DMA), que como se señaló anteriormente, su mecanismo de reacción y su reactividad con  $O_2(^1\Delta_g)$  es conocida, no presenta variaciones en su valor para un solvente dado<sup>(214)</sup>. Además, el DMA tiene un coeficiente de partición  $\log P = 5,788$ <sup>(215)</sup>, indicativo de una alta hidrofobicidad, por lo que su desactivación será representativa de la concentración del  $O_2(^1\Delta_g)$  en la interfase lipídica y zonas más profundas de la bicapa.



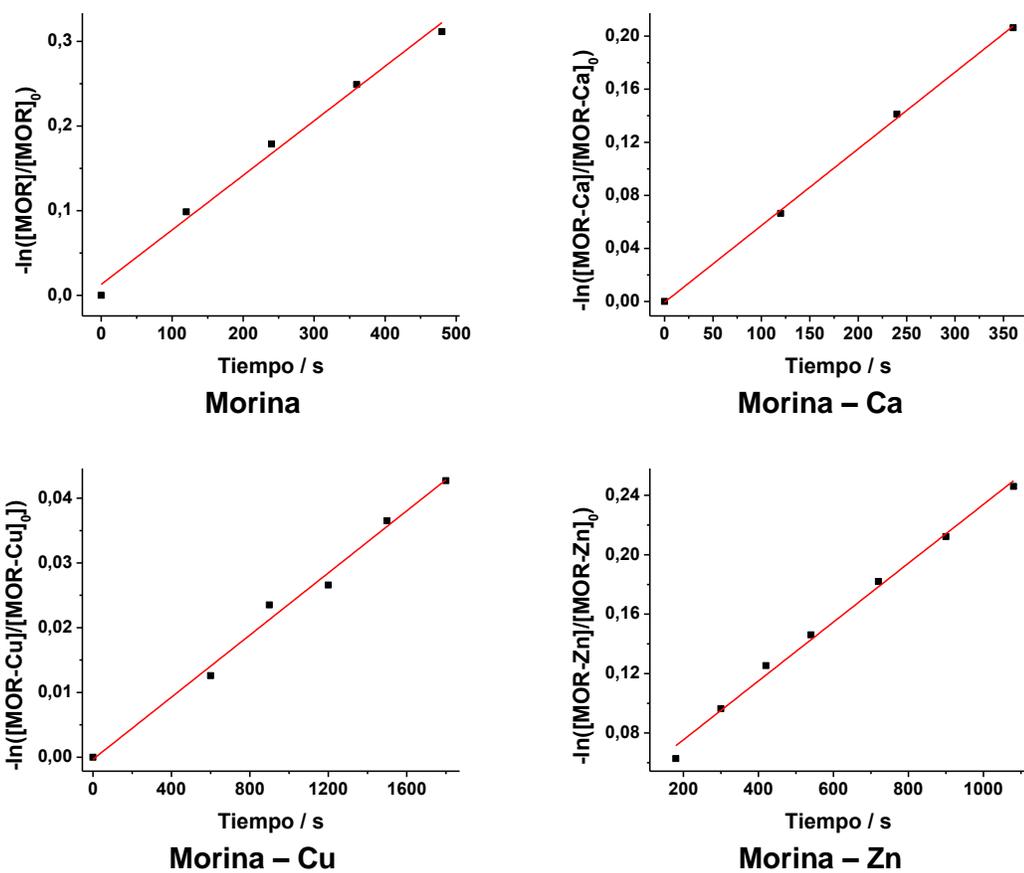
**Figura 21.** Espectros UV-Vis de la reacción de fotooxidación entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y complejos de quercetina en liposomas de DPPC.



**Figura 22.** Espectros UV-Vis de la reacción de fotooxidación entre  $O_2(^1\Delta_g)$  y complejos de morina en liposomas de DPPC.



**Figura 23.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos de quercetina en liposomas de DPPC.



**Figura 24.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos de morina en liposomas de DPPC.

**Tabla 13.** Constantes de velocidad de reacción química de los complejos frente a  $O_2(^1\Delta_g)$  en liposomas de DPPC.

Complejo		$k_r / M^{-1} s^{-1} DPPC$	$R^2$	Sensibilizador
Morina	-	$1,39 \times 10^7$	0,9890	Azul de Metileno
	$Ca^{+2}$	$3,30 \times 10^7$	0,9989	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	$5,16 \times 10^5$	0,9882	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$4,26 \times 10^6$	0,9923	Azul de Metileno
Quercetina	-	$1,36 \times 10^6$	0,9895	Azul de Metileno
	$Ca^{+2}$	$1,46 \times 10^6$	0,9652	Rosa de Bengala
	$Cu^{+2}$	$1,42 \times 10^5$	0,9806	Azul de Metileno
	$Zn^{+2}$	$1,50 \times 10^6$	0,9890	Azul de Metileno

Los resultados obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química,  $k_r$ , entre los complejos y  $O_2(^1\Delta_g)$  en liposomas de DPPC, se muestran en la Tabla 13. Se observa que el valor experimental de la constante de velocidad de reacción química de morina con  $O_2(^1\Delta_g)$  es mayor respecto de quercetina en un orden de magnitud aproximadamente. Cuando ambos flavonoides forman complejos con  $Ca^{+2}$ , se observa un aumento en la constante, el que es mayor para el complejo morina–Ca, respecto del flavonoide libre. Cuando se observa la reactividad de los complejos formados con  $Cu^{+2}$ , los dos flavonoides estudiados muestran una disminución en la constante reactiva, siendo más significativa para el complejo formado con morina. En los complejos formados con  $Zn^{+2}$  el comportamiento difiere, presentándose una disminución en el valor

de la constante para el complejo formado con morina, mientras que con quercetina la reactividad aumenta ligeramente.

Al comparar los resultados obtenidos para la constante de velocidad de reacción química de los flavonoides y los complejos flavonoide–metal con  $O_2(^1\Delta_g)$ , en medio homogéneo y microheterogéneo, se aprecia que los flavonoides libres son más reactivos en el entorno lipídico, obteniéndose valores mayores en un orden de magnitud respecto de los valores medidos en metanol, sin embargo, los cambios que ocurren en la reactividad una vez los complejos se forman son menos significativos y menos predecibles. Esto se puede deber a que la interfase lipídica es una zona apolar y los iones metálicos corresponden a átomos cargados que no tendrían gran afinidad por este medio, lo que resulta en un menor ingreso y, por lo tanto, menor formación de complejos, en consecuencia, una menor fracción de moléculas de flavonoide estarían formando asociaciones con los iones y los cambios en la constante serían más discretos. Por otra parte, al generarse zonas con mayor densidad electrónica, se producirían cambios conformacionales que ocultarían estos sitios con el objetivo de disminuir la energía potencial en el entorno de la estructura, lo que conduce a que las constantes reactivas de los complejos flavonoide–metal sean, en gran medida, menores a sus pares en medio homogéneo polar, independiente de que el complejo observado tenga una constante de velocidad de reacción química

con  $O_2(^1\Delta_g)$  mayor respecto del flavonoide libre en el mismo medio, debido a que el acercamiento está más restringido.

Los flavonoides 3–hidroxiflavona y luteolina no se consideraron para las mediciones en medio microheterogéneo debido a que son altamente hidrofóbicos, por lo que al disolverlos en una pequeña alícuota de etanol y agregarlos a la fase acuosa, estos sustratos precipitaban y, por lo tanto, no se logró la incorporación dentro del liposoma, aun aumentando la temperatura sobre los 40°C. El flavonoide catequina presenta coeficientes de extinción muy bajos, por lo que para lograr medirlo por espectroscopía UV-Vis en el liposoma, se requerían concentraciones muy altas, lo que afecta la estabilidad del sistema compartimentalizado.

### **7.3. Cambio en el tiempo de vida del Oxígeno Molecular Singulete**

En condiciones de medio microheterogéneo, no fue posible determinar las constantes de asociación de los complejos estudiados, ya que se produce alta dispersión en la emisión debido a la presencia de los liposomas de tamaño superior a los 100 nm, y en base a esto, no fue posible derivar una ecuación que diera cuenta de la constante de desactivación total del  $O_2(^1\Delta_g)$  en el sistema compartimentalizado, en presencia de iones metálicos formando complejos con flavonoides. Sin embargo, sí se realizó una determinación cualitativa de la

capacidad para desactivar  $O_2(^1\Delta_g)$  de los complejos estudiados en este medio, respecto de los flavonoides libres. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para los tiempos de decaimiento de la emisión infrarroja a 1270 nm característica del  $O_2(^1\Delta_g)$ , en medio microheterogéneo en presencia de: (i) liposomas de DPPC (preparados con octadecilamina para la generación de  $O_2(^1\Delta_g)$  con azul de metileno) ; (ii) liposomas de DPPC con flavonoides incluidos y; (iii) liposomas de DPPC con flavonoides incluidos y adición de solución de ion metálico. En todos los casos, la composición de solvente corresponde a una mezcla 1:1 de  $H_2O:D_2O$ , con el fin de lograr mayores tiempos de vida que permitieran medir con precisión las diferencias entre las condiciones descritas previamente.

**Tabla 14.** Valores experimentales para el tiempo de decaimiento de emisión infrarroja de  $O_2(^1\Delta_g)$  ( $\tau_D$ ) por flavonoides y complejos flavonoide–metal, incluidos en liposomas de DPPC.

Liposoma	$\tau_D / \mu s$	Flavonoide	$\tau_D / \mu s$	Ion metálico	$\tau_D / \mu s$
DPPC	35,026	Quercetina (0,15 mM)	32,698	Ca <sup>+2</sup> (50 mM)	31,702
		Morina (0,15 mM)	30,055	Ca <sup>+2</sup> (50 mM)	25,84
DPPC (ODA)	35,757	Quercetina (0,1 mM)	33,76	Cu <sup>+2</sup> (0,5 mM)	17,829
				Zn <sup>+2</sup> (2mM)	31,828
		Morina (0,1 mM)	32,14	Cu <sup>+2</sup> (0,5 mM)	9,95
				Zn <sup>+2</sup> (5 mM)	34,42

De los valores experimentales obtenidos para el tiempo de vida de emisión infrarroja del  $O_2(^1\Delta_g)$ , se puede observar que la presencia de los flavonoides incluidos en los liposomas genera una disminución en este valor. Si se considera

la pendiente inicial de esta disminución para el cálculo de la constante de desactivación total de  $O_2(^1\Delta_g)$ , de acuerdo a la ecuación de Stern–Volmer, se obtienen valores experimentales de  $k_T^{MOR(lip)} = 3,15 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$  y  $k_T^{QUER(lip)} = 1,51 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ , lo que corresponde a un 50% y a un 90% de desactivación del  $O_2(^1\Delta_g)$ , respectivamente, a través de un proceso físico. Luego, cuando se agrega solución de ión metálico al medio que contiene liposomas con flavonoides incluidos, en gran parte de los casos estudiados se observa una disminución en los tiempos de vida del  $O_2(^1\Delta_g)$ . Si se considera que la concentración total de flavonoide, correspondiente a la suma de moléculas de flavonoide libre y flavonoide complejado, es constante, se puede deducir que la disminución en el tiempo de vida se debe esencialmente a que la molécula asociada al ión metálico tiene una capacidad desactivante mayor en comparación a la molécula libre. El efecto de la disminución en el tiempo de vida es discreto cuando en el medio se agrega solución de los iones metálicos  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . Para el ion  $Ca^{+2}$ , esta disminución se correlaciona con el aumento en la constante de velocidad de reacción química, la cual aumenta para ambos flavonoides estudiados, siendo más evidente cuando el sustrato es morina que cuando es quercetina. Los cambios observados con  $Zn^{+2}$  también se correlacionan con la constante de velocidad de reacción química medida en medio microheterogeneo, donde se observó un aumento en la reactividad para el complejo formado con quercetina, lo que se traduce en un menor tiempo de vida para  $O_2(^1\Delta_g)$ , mientras que al ocurrir la complejación con morina, se presentó una disminución en la reactividad

química y, en consecuencia, un aumento en el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$ . El efecto más importante se observa en los complejos de quercetina y morina formados con  $Cu^{+2}$ , los que presentan las mayores disminuciones en la constante de velocidad de reacción química, pero, a la vez, la mayor disminución en el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$ , obteniéndose valores para  $\tau_D$  bajo los 20  $\mu s$  para el complejo formado con quercetina y 10  $\mu s$  para el complejo formado con morina. En este caso, también se debe tener en cuenta que la concentración del ión  $Cu^{+2}$  utilizada es bastante baja en comparación a los experimentos realizados para determinar el tiempo de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  en presencia de complejos formados con los iones metálicos  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ , por lo que el efecto de este ion es mucho más marcado. Considerando esta información, se puede suponer que para los complejos quercetina-Cu y morina-Cu, la desactivación por la vía física corresponde a más del 90% y 50%, respectivamente, de las interacciones totales con  $O_2(^1\Delta_g)$ . Este hallazgo resulta importante si se considera que en sistemas biológicos la concentración de  $Cu^{+2}$  se encuentra a nivel traza, donde se podría suponer que esta situación puede limitar el efecto antioxidante de estos complejos sobre el  $O_2(^1\Delta_g)$ .

## 8. CONCLUSIONES

Los flavonoides que forman complejos con todos los iones metálicos seleccionados fueron morina, quercetina y 3-hidroxi-flavona, los que presentan como característica común la presencia del grupo 3-OH y el doble enlace en el anillo C; luteolina y catequina no formaron complejos con el ion  $\text{Ca}^{+2}$  y para los demás flavonoides considerados se obtuvieron constantes de asociación relativamente bajas con este ion, lo cual muestra la importancia de las sustituciones del flavonoide, así como también de la estructura electrónica interna del ion con el que ocurre la complejación.

Las constantes de desactivación total de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  tienen valores entre  $10^7$  y  $10^8$   $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  para la mayoría de los complejos en medio homogéneo. Esto es relevante, ya que los flavonoides son sustancias biodisponibles a través de la dieta alimenticia y podrían interactuar con iones metálicos presentes en diferentes sitios de los organismos vivos, entre los que se incluyen medio intracelular, extracelular y la bicapa lipídica de las células. Los resultados sugieren que los flavonoides estudiados en general son mejores antioxidantes cuando están en presencia de macro o microelementos.

Se observa que todos los flavonoides y los complejos medidos, desactivan al  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  tanto en medio homogéneo como microheterogéneo. La desactivación total de esta especie excitada ocurre en gran medida a través de un proceso

físico, lo cual es de gran importancia en sistemas en condiciones de estrés oxidativo, ya que la molécula desactivante se recupera, y por lo tanto puede desactivar a otras moléculas de la especie excitada, además disminuye la formación de productos potencialmente dañinos para los sistemas biológicos.

Los iones metálicos son capaces de penetrar en la bicapa de los liposomas de DPPC y permiten la formación de complejos con los flavonoides. Para la reactividad química con  $O_2(^1\Delta_g)$  se obtuvieron valores experimentales menores que en medio homogéneo. Es de relevancia el efecto que genera la complejación con  $Cu^{+2}$  en este medio, donde el resultado final evidencia una desactivación a través de un proceso físico por sobre el 90% de las interacciones entre el complejo quercetina-Cu y  $O_2(^1\Delta_g)$ .

Al comparar las mediciones realizadas en sistemas homogéneo y microheterogéneo, es posible observar diferencias en reactividad química, las cuales se pueden deber principalmente al medio que rodea a las moléculas que desactivan  $O_2(^1\Delta_g)$ , que presenta condiciones de medio apolar.

En condiciones reales, el efecto más importante está dado por el ion  $Ca^{+2}$ , debido a que su concentración en medio extracelular puede llegar a 3 mM, por lo que existe mayor posibilidad de encuentro de este ion con moléculas de flavonoides presentes. Los complejos formados con este ion metálico, en todos los experimentos presentó un aumento en la reactividad. Para los demás iones, el efecto que producirían en la reactividad de los flavonoides es mucho menor,

ya que su concentración es a nivel traza y se encuentran en gran medida asociados a otras biomacromoléculas.

Los procesos en los que participan moléculas antioxidantes, como las estudiadas en esta tesis, son de gran interés debido a que el estrés oxidativo está asociado a diferentes enfermedades, así como al envejecimiento y la expectativa de vida. Se espera que esta investigación sea un aporte a la comprensión de los mecanismos de acción de estas moléculas y en cómo el oxígeno molecular singlete puede ser parte de las reacciones que desencadenan estos estados oxidativos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Thannickal V. J., Fanburg B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279(6): L1005-L1028.
2. Falkowski P. G., Godfrey L. V. 2008. Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1504): 2705-2716.
3. Blankenship R. E. 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis research* 33(2): 91-111.
4. Halliwell B., Cross C. E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives* 102(suppl 10): 5-12.
5. Kepp K. P. 2017. Heme: From quantum spin crossover to oxygen manager of life. *Coordination Chemistry Reviews* 344: 363-374.
6. Engelking L. R. 2015. Oxidative Phosphorylation. En: *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. 3<sup>era</sup> edición. Academic Press. pp. 219-224.
7. Cole L. Kramer P. R. 2016. The Cell. En: *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Academic Press. pp. 3-10.
8. Petterson S., Kuchta C., Snyder-Mackler L. 2007. Aerobic Metabolism during Exercise. En: DONATELLI R. *Sports-Specific Rehabilitation*. Churchill Livingstone. pp: 65-85.
9. Glater E.E., Schwarz T.L. 2009. Mitochondrial Organization and Transport in Neurons. En: SQUIRE L. *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press. pp. 903-911.
10. Hammond C. 2015. Neurons. En: *Cellular and Molecular Neurophysiology*. 4<sup>ta</sup> edición. Academic Press. pp. 3-23.
11. Demirel Y. 2014. Thermodynamics and Biological Systems. En: *Nonequilibrium Thermodynamics*. 3<sup>era</sup> edición. Elsevier. pp. 485-562.
12. LeMond G., Hom M. 2015. Amazing Mitochondria. En: *The Science of Fitness*. Academic Press. pp. 39-50.

13. Zelickson B.R., Ballinger S.W., Dell'Italia L.J., Zhang J., Darley-Usmar V.M. 2013. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Interactions with Mitochondria and Pathophysiology. En: LENNARZ W. J., LANE M. D. Encyclopedia of Biological Chemistry. 2<sup>da</sup> edición. Academic Press. pp. 17-22.
14. Touyz R. M. 2012. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. En: ROBERTSON D., BIAGGIONI I., BURNSTOCK G., LOW P. A., PATON J. F. R. Primer on the Autonomic Nervous System. 3era edición. Academic Press. pp. 335-338.
15. Huang S., Zhang X., Liu Y., Gui J., Wang R., Han L., Jia H., Du L. 2019. Phosphinate-based mitochondria-targeted fluorescent probe for imaging and detection of endogenous superoxide in live cells and in vivo. *Talanta* 197: 239-248.
16. Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* 33(12): S498-S501.
17. Circu M. L., Aw T. Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 48(6): 749-762.
18. Downey J. M. 1990. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annual Review of Physiology* 52(1): 487-504.
19. Tanaka H., Okada T., Konishi H., Tsuji T. 1993. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research* 285(6): 352–355.
20. Babusyte A., Jeroch J., Stakauskas R., Sakalauskas R. 2009. The production of reactive oxygen species in peripheral blood neutrophils is modulated by airway mucous. *Open Medicine* 4(2): 245-252.
21. Mittler R. 2017. ROS are good. *Trends in plant science* 22(1): 11-19.
22. Ochoa C. D., Wu R. F., Terada L. S. 2018. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Molecular aspects of medicine* 63: 18-29.
23. Ristow M. 2014. Unraveling the Truth About Antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature Medicine* 20(7): 709–711.

24. Rasheed N., Azzouz D., Sung C. M., Dinic F., Babi J., Liu K., Csizmadia I. G. 2017. Weighing the Beneficial and Detrimental Consequences of Reactive Oxygen Species and their Role in Diseases. *University of Toronto Journal of Undergraduate Life Sciences* 11(1): 36-40.
25. Brieger K., Schiavone S., Miller J., Krause K. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly* 142: w13659.
26. Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress* 1-8.
27. Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry* 10(23): 2495-2505.
28. Cederbaum A. I., Lu Y., Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology* 83(6): 519-548.
29. Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552(2): 335-344.
30. Lushchak V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions* 224: 164-175.
31. Chiarello D. I., Abad C., Rojas D., Toledo F., Vázquez C. M., Mate A., Sobrevia L., Marín R. 2018. Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*.
32. Rani N., Dhingra R., Arya D. S., Kalaivani M., Bhatla N., & Kumar R. 2010. Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclamptic patients. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 36(6): 1189-1194.
33. Agarwal A., Saleh R. A., Bedaiwy M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79(4): 829-843.
34. Niedzielska E., Smaga I., Gawlik M., Moniczewski A., Stankowicz P., Pera J., Filip M. 2016. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology* 53(6): 4094-4125.
35. Cui H., Kong Y., Zhang H. 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012: 646354.

36. Finkel T., Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809): 239.
37. Saed G. M., Diamond M. P., Fletcher N. M. 2017. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 145(3): 595-602.
38. Chikara S., Nagaprashantha L. D., Singhal J., Horne D., Awasthi S., Singhal S. S. 2018. Oxidative stress and dietary phytochemicals: role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters* 413: 122-134.
39. Organización Mundial de la Salud. 2018. Cáncer [en línea] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [consulta: 02 marzo 2019].
40. Andrisic L., Dudzik D., Barbas C., Milkovic L., Grune T., & Zarkovic N. 2018. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox biology* 14: 47-58.
41. Messina M. J. 1991. Oxidative stress status and cancer: Methodology applicable for human studies. *Free Radical Biology and Medicine* 10(3-4): 175-176.
42. Klaunig J. E., Wang Z., Pu X., & Zhou S. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 254(2): 86-99.
43. Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B. 1995. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 24(2): 663-677.
44. Kasha M., Kahn A. U. 1970. The Physics, Chemistry, and Biology, of Singlet Molecular Oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 171(1): 5-23.
45. Matheson I. B. C., Lee J. 1979. Chemical Reaction Rates of Amino Acids With Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 29(5): 879–881.
46. Evans D. F., Tucker J. N. 1976. Reactivity of the ( $^1\Delta_g$ )<sub>2</sub> and  $^1\Delta_g$  states of oxygen produced by direct laser excitation. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72: 1661-1666.

47. Carlsson D. J., Suprunchuk T., Wiles D. M. 1974. The quenching of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by transition metal chelates. *Canadian Journal of Chemistry* 52(22): 3728-3737.
48. Corey E. J., Taylor W. C. 1964. A study of the peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules. *Journal of the American Chemical Society* 86(18): 3881-3882.
49. Khan A. U., Kasha M. 1963. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *The Journal of Chemical Physics* 39(8): 2105-2106.
50. Foote C. S., Wexler S. 1964. Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 86(18): 3879-3880.
51. Wang S., Gao R., Zhou F., Selke M. 2004. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry* 14(4): 487-493.
52. Gorman A. A., Rodgers M. A. J. 1981. Singlet molecular oxygen. *Chemical Society Reviews* 10(2): 205-231.
53. DeRosa M. C., Crutchley R. J. 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* 233: 351-371.
54. Redmond R. W., Gamlin J. N. 1999. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochemistry and Photobiology* 70(4): 391-475.
55. McGarvey D. J., Szekeres P. G., Wilkinson F. 1992. The efficiency of singlet oxygen generation by substituted naphthalenes in benzene. Evidence for the participation of charge-transfer interactions. *Chemical physics letters* 199(3-4): 314-319.
56. Olea A. F., Wilkinson F. 1995. Singlet oxygen production from excited singlet and triplet states of anthracene derivatives in acetonitrile. *The Journal of Physical Chemistry* 99(13): 4518-4524.
57. Wilkinson F., Abdel-Shafi A. A. 1999. Mechanism of quenching of triplet states by molecular oxygen: Biphenyl derivatives in different solvents. *The Journal of Physical Chemistry A* 103(28): 5425-5435.
58. Gutiérrez I., Bertolotti S. G., Biasutti M. A., Soltermann A. T., García, N. A. 1997. Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen. *Canadian journal of chemistry* 75(4): 423-428.

59. Alegría A. E., Ferrer A., Santiago G., Sepúlveda E., Flores W. 1999. Photochemistry of water-soluble quinones. Production of the hydroxyl radical, singlet oxygen and the superoxide ion. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 127(1-3) 57-65.
60. Kimel S., Tromberg B. J., Roberts W. G., Berns M. W. 1989. Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines. *Photochemistry and photobiology* 50(2): 175-183.
61. Demirbaş Ü., Bayrak R., Dilber G., Menteşe E., Akçay H. T. 2019. Novel triazole substituted phthalocyanines showing high singlet oxygen quantum yields. *Journal of Luminescence* 206: 199-204.
62. Demas J. N., Harris E. W., McBride R. P. 1977. Energy transfer from luminescent transition metal complexes to oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 99(11): 3547-3551.
63. García-Fresnadillo D., Georgiadou Y., Orellana G., Braun A. M., Oliveros E. 1996. Singlet-Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) Production by Ruthenium (II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water. *Helvetica Chimica Acta* 79(4): 1222-1238.
64. Tanielian C., Wolff C., & Esch M. 1996. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. *The Journal of Physical Chemistry* 100(16): 6555-6560.
65. Yanık H., Göksel M., Yeşilot S., Durmuş M. 2016. Novel phthalocyanine–BODIPY conjugates and their photophysical and photochemical properties. *Tetrahedron Letters* 57(26): 2922-2926.
66. Şenkuytu E., Eçik E. T. 2017. Novel fully-BODIPY functionalized cyclotetraphosphazene photosensitizers having high singlet oxygen quantum yields. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 182: 26-31.
67. Duong H. D., Vo-Dinh T., Rhee J. I. 2019. Synthesis and functionalization of gold nanostars for singlet oxygen production. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 69: 233-240.
68. Mafukidze D. M., Nyokong T. 2019. A comparative study of the singlet oxygen generation capability of a zinc phthalocyanine linked to graphene quantum dots through  $\pi$ - $\pi$  stacking and covalent conjugation when embedded in

- asymmetric polymer membranes. *Journal of Molecular Structure* 1180: 307-317.
69. Badger R. M., Wright A. C., Whitlock R. F. 1965. Absolute Intensities of the Discrete and Continuous Absorption Bands of Oxygen Gas at 1.26 and 1.065  $\mu$  and the Radiative Lifetime of the  $^1\Delta_g$  State of Oxygen. *The Journal of Chemical Physics* 43(12): 4345–4350.
70. Hurst J. R., McDonald J. D., Schuster G. B. 1982. Lifetime of singlet oxygen in solution directly determined by laser spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 104(7): 2065-2067.
71. Scurlock R. D., Nonell S., Braslavsky S. E., Ogilby P. R. 1995. Effect of Solvent on the Radiative Decay of Singlet Molecular Oxygen ( $^1\Delta_g$ ). *The Journal of Physical Chemistry* 99(11): 3521–3526.
72. Ogilby P. R., Foote C. S. 1983. Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g$ ). *Journal of the American Chemical Society* 105(11): 3423-3430.
73. a) Lide D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85° edición. CRC Pres. 6-157.  
b) Lide D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85° edición. CRC Pres. 6-162.  
c) Lide D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85° edición. CRC Pres. 9-48.  
d) Lide D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 85° edición. CRC Pres. 9-50.
74. Merkel P. B., Kearns D. R. 1972. Remarkable solvent effects on the lifetime of  $^1\Delta_g$  oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 94(3): 1029–1030.
75. Foote C. S., Denny R. W. 1971. Chemistry of singlet oxygen. XIII. Solvent effects on the reaction with olefins. *Journal of the American Chemical Society* 93(20): 5168-5171.
76. Schmidt R., Brauer H. D. 1987. Radiationless deactivation of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by solvent molecules. *Journal of the American Chemical Society* 109(23): 6976–6981.
77. Bregnhøj M., Westberg M., Jensen F., Ogilby P. R. 2016. Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-

- transfer interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 18(33): 22946–22961.
78. Davies M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3): 761-770.
79. Aubry J. M., Mandard-Cazin B., Rougee M., Bensasson R. V. 1995. Kinetic studies of singlet oxygen [4+ 2]-cycloadditions with cyclic 1, 3-dienes in 28 solvents. *Journal of the American Chemical Society* 117(36): 9159-9164.
80. Liang J. J., Gu C. L., Kacher M. L., Foot, C. S. 1983. Chemistry of singlet oxygen. 45. Mechanism of the photooxidation of sulfides. *Journal of the American Chemical Society* 105(14): 4717-4721.
81. Gollnick K., Lindner J. H. E. 1973. Photosensibilisierte oxygenierung von aminen. Mechanismus der reaktion von singulett-sauerstoff mit aminen. *Tetrahedron Letters* 14(21): 1903-1906.
82. Schweitzer C., Schmidt R. 2003. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical reviews* 103(5): 1685-1758.
83. Clennan E. L., Pace A. 2005. Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron* 61(28): 6665-6691.
84. Ohloff, G. 1975. Singlet oxygen: A reagent in organic synthesis. En: *Organic Synthesis*. Butterworth-Heinemann. pp. 481-502.
85. Jiang G., Chen J., Huang J. S., Che C. M. 2009. Highly efficient oxidation of amines to imines by singlet oxygen and its application in ugi-type reactions. *Organic Letters* 11(20): 4568-4571.
86. Okamoto M. 1992. The contribution by diffusion to the cycloaddition reactions of singlet oxygen with furans in solution under high pressure. *The Journal of Physical Chemistry* 96(1): 245-248.
87. Wasserman H. H., Frechette R., Rotello V. M., Schulte G. 1991. Singlet oxygen reactions of 2-carbalkoxy-3-methoxypyrrroles. *Tetrahedron letters* 32(51): 7571-7574.
88. Zhang X., Khan S. I., Foote C. S. 1993. Sensitized photooxygenations of 3-vinylindole derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* 58(27): 7839-7847.

89. Gollnick K., & Koegler S. 1988. (4+ 2)-cycloaddition of singlet oxygen to oxazoles formation of oxazole endoperoxides. *Tetrahedron letters* 29(9): 1003-1006.
90. Ruiz-González R., Zanocco R., Gidi Y., Zanocco A. L., Nonell S., Lemp, E. 2013. Naphthoxazole-Based Singlet Oxygen Fluorescent Probes. *Photochemistry and Photobiology* 89(6): 1427–1432.
91. Umezawa N., Tanaka K., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T. 1999. Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen. *Angewandte Chemie International Edition* 38(19): 2899–2901.
92. Song B., Wang G., Tan M., Yuan J. 2006. A Europium(III) Complex as an Efficient Singlet Oxygen Luminescence Probe. *Journal of the American Chemical Society* 128(41): 13442–13450.
93. Russell G. A. 1957. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons. Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. *Journal of the American Chemical Society* 79(14): 3871–3877.
94. Howard J. A., Ingold K. U. 1968. Self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 90(4): 1056–1058.
95. Rosen H., Klebanoff S. J. 1977. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Journal of Biological Chemistry* 252(14): 4803-4810.
96. Kellogg E. W., Fridovich I. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *Journal of biological chemistry* 250(22): 8812-8817.
97. Kanofsky J. R., Sima P. 1991. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *Journal of Biological Chemistry* 266(14): 9039-9042.
98. Miyamoto S., Martinez G. R., Martins A. P. B., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. 2003. Direct Evidence of Singlet Molecular Oxygen [ $O_2(^1\Delta_g)$ ] Production in the Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Peroxynitrite. *Journal of the American Chemical Society* 125(15): 4510–4517.
99. Di Mascio P., Bechara E. J. H., Medeiros M. H. G., Briviba K., Sies H. 1994. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 355(3): 287–289.

100. Cilento G., Adam W. 1995. From free radicals to electronically excited species. *Free Radical Biology and Medicine* 19(1): 103-114.
101. Cadenas E., Sies H. 2000. Formation of electronically excited states during the oxidation of arachidonic acid by prostaglandin endoperoxide synthase. En: *Methods in enzymology*. Academic Press. pp. 67-77.
102. Cadenas, E., Sies H., Nastainczyk W., Ullrich V. 1983. Singlet oxygen formation detected by low-level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G2 to H2. *Hoppe-Seyler s Zeitschrift für Physiologische Chemie* 364(1): 519-528.
103. Kanofsky J. R. 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-biological interactions* 70(1-2): 1-28.
104. Miyamoto S., Martinez G. R., Medeiros M. H., Di Mascio, P. 2014. Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* 139: 24-33.
105. Hatz S., Lambert J. D., Ogilby P. R. 2007. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6(10): 1106-1116.
106. Skovsen E., Snyder J. W., Lambert J. D., Ogilby P. R. 2005. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *The Journal of Physical Chemistry B* 109(18): 8570-8573.
107. Moan J. 1990. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 6(3): 343-344.
108. Gorman A. A., Rodgers M. A. 1992. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 14(3): 159-176.
109. Egorov S. Y., Zinukov S. V., Kamalov V. F., Koroteev N. I., Krasnovskii Jr A. A., Toleutaev B. N. 1988. Singlet-oxygen photosensitized luminescence kinetics with nanosecond time resolution. *Optics and Spectroscopy* 65: 530-533.
110. Kanofsky J. R. 1991. Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts. *Photochemistry and photobiology* 53(1): 93-99.

111. Lee P. C. C., Rodgers M. A. J. 1987. Laser Flash Photokinetic Studies of Rose Bengal Sensitized Photodynamic Interactions of Nucleotides and DNA. *Photochemistry and Photobiology* 45(1): 79–86.
112. Sies H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 299(3-4): 183-191.
113. Decuyper-Debergh D., Piette J., Laurent C., Van de Vorst A. 1989. Cytotoxic and genotoxic effects of extracellular generated singlet oxygen in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research Letters* 225(1-2): 11-14.
114. Piette J. 1990. Mutagenic and genotoxic properties of singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 4(3): 335–339.
115. Agnez-Lima L. F., Melo J. T., Silva A. E., Oliveira A. H. S., Timoteo A. R. S., Lima-Bessa K. M., Martinez G., Madeiros M., Di Mascio P., Galhardo R., Menck C. F. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 751(1): 15-28.
116. Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 91(3): S14–S22.
117. Pandolfi P. P., Sonati F., Rivi R., Mason P., Grosveld F., Luzzatto L. 1995. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO journal* 14(21): 5209-5215.
118. Xia L., Nordman T., Olsson J. M., Damdimopoulos A., Björkhem-Bergman L., Nalvarte I., Ericksson L., Arnér E., Spyrou G., Björnstedt M. 2003. The Mammalian Cytosolic Selenoenzyme Thioredoxin Reductase Reduces Ubiquinone A NOVEL MECHANISM FOR DEFENSE AGAINST OXIDATIVE STRESS. *Journal of Biological Chemistry* 278(4): 2141-2146.
119. Matés J. M., Pérez-Gómez C., De Castro I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry* 32(8): 595-603.
120. Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration* 82(2): 291-295.

121. Portugal M., Barak V., Ginsburg I., Kohen R. 2007. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomedicine & pharmacotherapy* 61(7): 412-422.
122. Guerra-Araiza C., Álvarez-Mejía A. L., Sánchez-Torres S., Farfan-García E., Mondragón-Lozano R., Pinto-Almazán R., Salgado-Ceballos H. 2013. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radical Research* 47(6-7): 451–462.
123. Darr D., Combs S., Dunston S., Manning T., Pinnell S. 1992. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *British Journal of Dermatology* 127(3): 247-253.
124. Niki E., Tsuchiya J., Tanimura R., Kamiya Y. 1982. Regeneration of Vitamin E From  $\alpha$ -chromanoxyl Radical by Glutathione and Vitamin C. *Chemistry Letters* 11(6): 789–792.
125. McCay P. B. 1985. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annual review of nutrition* 5(1): 323-340.
126. Steenvoorden D. P. T., Beijersbergen van Henegouwen G. M. J. 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41(1-2): 1–10.
127. Fryer M. J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (alpha-tocopherol). *Plant, Cell and Environment* 15(4): 381–392.
128. Krinsky N. I., Deneke S. M. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *Journal of the National Cancer Institute* 69(1): 205-210.
129. Dillard C. J., German J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(12): 1744–1756.
130. Liu R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition* 78(3): 517S-520S.
131. Liu R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition* 134(12): 3479S-3485S.
132. Ross J. A., Kasum C. M. 2002. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition* 22(1): 19–34.

133. Pietta P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035–1042.
134. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572–584.
135. Havsteen B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96(2-3): 67–202.
136. Brodowska K. M. 2017. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research* 7(2): 108-123.
137. Leopoldini M., Marino T., Russo N., Toscano M. 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A* 108(22): 4916-4922.
138. Croft K. D. 1998. The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854(1 TOWARDS PROLO): 435–442.
139. Sun B., Fukuhara M. 1997. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology* 122(1-2): 61–72.
140. Leung H. W. C., Kuo C. L., Yang W. H., Lin C. H., Lee H. Z. 2006. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 534(1-3): 12-18.
141. Zhu Q. Y., Huang Y., Chen Z. Y. 2000. Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *The Journal of nutritional biochemistry* 11(1): 14-21.
142. Iio M., Ono Y., Kai S., Fukumoto M. 1986. Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. *Journal of nutritional science and vitaminology* 32(6): 635-642.
143. Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A., Pifferi G. 1994. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology and Medicine* 16(5): 547-553.

144. Olszanecki R., Gebaska A., Kozlovski V. I., Gryglewski R. J. 2002. Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53(4): 571-584.
145. Lotito S. B., Frei B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine* 41(12): 1727-1746.
146. Yeh S. L., Wang W. Y., Huang C. H., Hu M. L. 2005. Pro-oxidative effect of  $\beta$ -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 16(12): 729-735.
147. Leopoldini M., Russo N., Toscano M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125(2): 288-306.
148. Afanas' ev I. B., Ostrachovich E. A., Korkina L. G. 1998. Effect of rutin and its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *FEBS letters* 425(2): 256-258.
149. Moridani M. Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P. J. 2003. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine* 34(2): 243-253.
150. Panhwar Q. K., Memon S., Bhangar M. I. 2010. Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu (II)–morin complex. *Journal of molecular structure* 967(1-3): 47-53.
151. Dehghan G., Khoshkam Z. 2012. Tin (II)–quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. *Food Chemistry* 131(2): 422-426.
152. van Acker S. A., van Balen G. P., van den Berg D. J., Bast A., van der Vijgh W. J. 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology* 56(8): 935-943.
153. Mladěnka P., Zatloukalová L., Filipský T., Hrdina, R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 49(6): 963-975.
154. Gutierrez A. C., Gehlen M. H. 2002. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al<sup>3+</sup>. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 58(1): 83-89.

155. De Souza RFV., De Giovanni WF. 2005. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochim Acta Part A* 61: 1985–1990.
156. Cornard J. P., Merlin J. C. 2002. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al (III). *Journal of Inorganic Biochemistry* 92(1): 19-27.
157. Mira L., Fernandez M., Santos M., Rocha R., Florêncio M., Jennings K. R. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* 36(11): 1199-1208.
158. Fernandez M. T., Mira M. L., Florencio M. H., Jennings K. R. 2002. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry* 92(2): 105-111.
159. Hajji H. E., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. 2006. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free radical research* 40(3): 303-320.
160. Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 16(6): 845-850.
161. Cao G., Sofic E., Prior R. L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22(5): 749-760.
162. Yen G. C., Duh P. D., Tsai H. L., Huang S. L. 2003. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67(6): 1215-1222.
163. Bayrakçeken F., Aktaş S., Toptan M., Ünlügedik A. 2003. High resolution electronic absorption spectra of anisole and phenoxyl radical. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 59(1): 135-138.
164. Galati G., Chan T., Wu B., O'Brien P. J. 1999. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chemical research in toxicology* 12(6): 521-525.

165. Hodnick W. F., Duval D. L., Pardini R. S. 1994. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochemical pharmacology* 47(3): 573-580.
166. Goldman R., Claycamp G. H., Sweetland M. A., Sedlov A. V., Tyurin V. A., Kisin E. R., Tyurina Y. Y., Ritov V. B., Wenger S. L., Grant S. G., Kagan, V. E. 1999. Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9-10): 1050-1063.
167. Sahu S. C., Gray G. C. 1996. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer letters* 104(2): 193-196.
168. Maeta K., Nomura W., Takatsume Y., Izawa S., Inoue, Y. 2007. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(2): 572-580.
169. Nakagawa H., Hasumi K., Woo J. T., Nagai K., Wachi M. 2004. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe (II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* 25(9): 1567-1574.
170. Hertog M. G., Feskens E. J., Kromhout D., Hollman P. C., Katan M. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342(8878): 1007–1011.
171. Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger-Gateau P., Dartigues J.-F. 2000. *European Journal of Epidemiology* 16(4): 357–363.
172. Hertog M. G., Sweetnam P. M., Fehily A. M., Elwood P. C., Kromhout D. 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65(5): 1489–1494.
173. Hollman P. C. H. 2004. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42(sup1): 74–83.
174. Kuhnau J. 1976. Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics* 24:117–191.

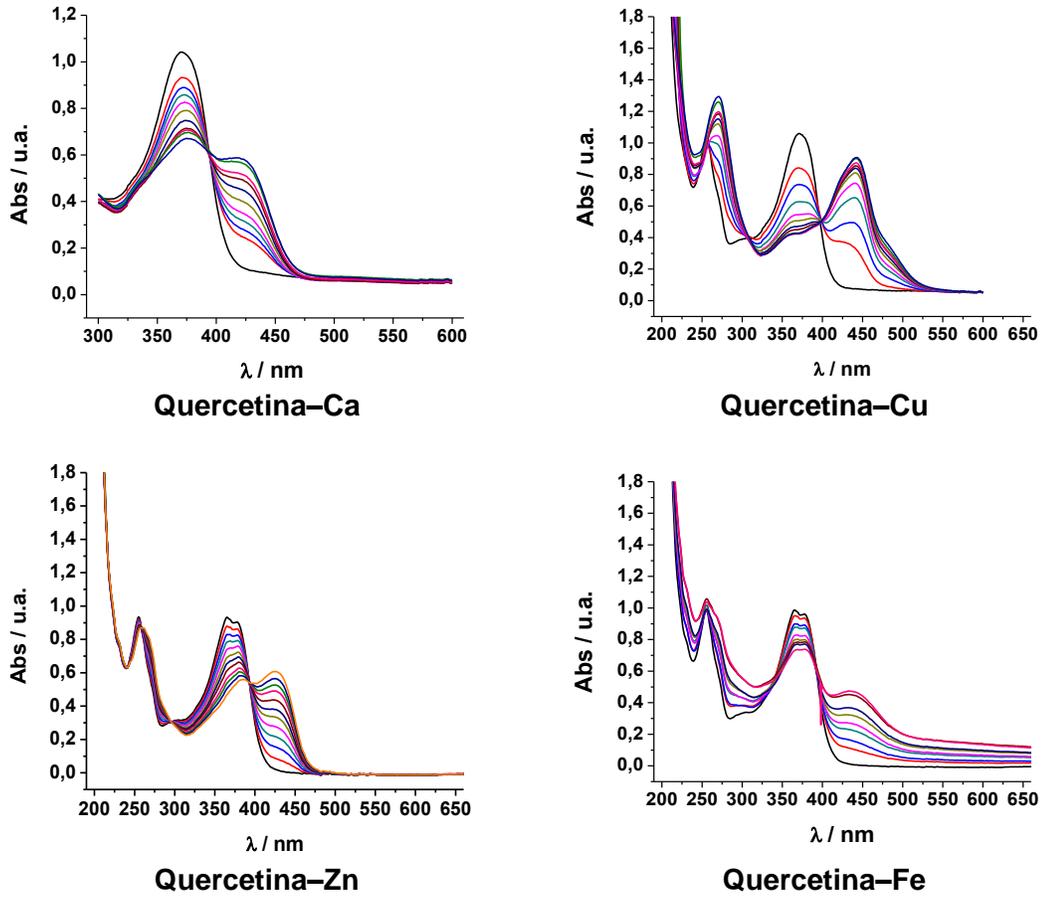
175. Hollman P. C., Van Trijp J. M., Buysman M. N., vd Gaag M. S., Mengelers M. J., De Vries J. H., Katan M. B. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS letters* 418(1-2): 152-156.
176. Donovan J. L., Bell J. R., Kasim-Karakas S., German J. B., Walzem R. L., Hansen R. J., Waterhouse A. L. 1999. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *The Journal of nutrition* 129(9): 1662-1668.
177. Choi Y. A., Yoon Y. H., Choi K., Kwon M., Goo S. H., Cha J. S., Choi M. K., Lee H. S., Song I. S. 2015. Enhanced oral bioavailability of morin administered in mixed micelle formulation with PluronicF127 and Tween80 in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38(2): 208-217.
178. Maret W. 2016. The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. *International journal of molecular sciences* 17(1): 66.
179. Crichton R. 2019. An Overview of the Role of Metals in Biology. En: *Biological Inorganic Chemistry*. 3<sup>era</sup> edición. Academic Press. pp. 1-18.
180. Orvig C., Abrams M. J. 1999. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chemical Reviews* 99(9): 2201–2204.
181. Theophanides T. 1984. Metal ions in biological system. *International Journal of Quantum Chemistry* 26(5): 933–941.
182. Crichton R. 2019. Calcium – Cellular Signalling. En: *Biological Inorganic Chemistry*. 3<sup>era</sup> edición. Academic Press. pp. 315–337 .
183. Martin B., Richardson F. S. 1979. Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Quarterly Reviews of Biophysics* 12(02): 181–209.
184. Crichton R. 2019. Zinc – Lewis Acid and Gene Regulator. En: *Biological Inorganic Chemistry*. 3<sup>era</sup> edición. Academic Press. pp. 339-362.
185. Krężel A., Maret, W. 2016. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of biochemistry and biophysics* 611: 3-19.
186. Crichton R. 2019. Iron: Essential for Almost All Life. En: *Biological Inorganic Chemistry*. 3<sup>era</sup> edición. Academic Press. pp. 363–404.

187. Kohgo Y., Ikuta K., Ohtake T., Torimoto Y., Kato J. 2008. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International journal of hematology* 88(1): 7–15.
188. Stern B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T. C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T. 2007. Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 10(3): 157–222.
189. O'Dell B. L. 1976. *Biochemistry of Copper*. Medical Clinics of North America 60(4): 687–703.
190. Morales J., Günther G., Zanocco A. L., Lemp E. 2012. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical–experimental study. *PLoS One* 7(7): e40548.
191. De Rosso V. V., Morán Vieyra F. E., Mercadante A. Z., Borsarelli C. D. 2008. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radical Research* 42(10): 885–891.
192. Pereira G. K., Donate P. M., Galembeck S. E. 1997. Effects of substitution for hydroxyl in the B-ring of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 392: 169-179.
193. Mukai K., Nagai S., Ohara K. 2005. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution. *Free Radical Biology and Medicine* 39(6): 752–761.
194. Turnaire C., Croux S., Maurette M., Beck I., Hocquaux M., Braun A. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 19: 205–215.
195. Nagai S., Ohara K., Mukai K. 2005. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *Journal Physical Chemistry B* 109: 4234–4240.
196. Montenegro M. A., Nazareno M. A., Borsarelli C. D. 2007. Kinetic study of the photosensitized oxygenation of the flavanone naringin and its chalcone. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 186(1): 47–56.

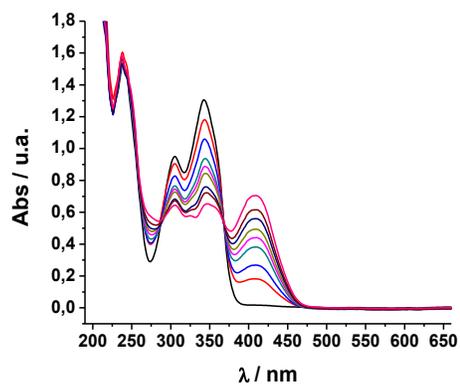
197. Sandoval A., C. 2012. Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singlete y flavonoides: efecto del medio. Memoria de Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
198. Ferrari G. V., Montaña M. P., Dimarco F., Debattista N. B., Pappano N. B., Massad W. A., García N. A. 2013. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 124: 42–49.
199. Muñoz V. A., Ferrari G. V., Montaña M. P., Miskoski S., García N. A. 2016. Effect of  $\text{Cu}^{+2}$  complexation on the scavenging ability of chrysin towards photogenerated singlet molecular oxygen ( $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ). Possible biological implications. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 162: 597-603.
200. Renny J. S., Tomasevich L. L., Tallmadge E. H., Collum D. B. 2013. Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. Angewandte Chemie International Edition 52(46): 11998-12013.
201. Scott R. L. 1956. Some comments on the Benesi-Hildebrand equation. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 75(7): 787-789.
202. Yatvin M. B., Weinstein J. N., Dennis W. H., Blumenthal R. 1978. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. Science 202(4374): 1290-1293.
203. Cotton F. A., Wilkinson G. 1980. Beryllium and the Group II Elements: Mg, Ca, Sr, Ba, Ra. En: Advance Inorganic Chemistry. 4<sup>ta</sup> edición. Estados Unidos, Wiley. pp. 271-288.
204. Pearson R. G. 1968. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. Journal of Chemical Education 45(9): 581.
205. Pearson R. G. 1968. Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories. Journal of Chemical Education 45(10): 643.
206. Castro, R. E. 2009. Efecto solvente en la reacción entre Oxígeno Molecular Singlete y antracenos sustituidos. Tesis (Doctor en Química). Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
207. Matysik J., Alia Bhalu B., Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science: 525-532.

208. Cotton F. A., Wilkinson G. 1980. Zinc, Cadmium and Mercury. En: Advance Inorganic Chemistry. 4<sup>ta</sup> edición. Estados Unidos, Wiley. pp. 589-616.
209. Leo A., Hansch C., Elkins D. 1971. Partition coefficients and their uses. Chemical reviews 71(6): 525-616.
210. Seydel, J. K. 2002. Octanol–water partitioning versus partitioning into membranas. Darmstad, Germany, Wiley-VCH. pp. 39-50.
211. Herrero-Martínez J. M., Sanmartin M., Rosés M., Bosch, E., Ràfols C. 2005. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. Electrophoresis 26(10): 1886-1895.
212. Wolfbeis O. S., Leiner M., Hochmuth P., Geiger H. 1984. Absorption and fluorescence spectra, pKa values, and fluorescence lifetimes of monohydroxyflavones and monomethoxyflavones. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie 88(8): 759-767.
213. Lemańska K., van der Woude H., Szymusiak H., Boersma M. G., Gliszczyńska-Świgło A., Rietjens I. M., Tyrakowska, B. 2004. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin—a mechanistic insight. Free radical research 38(6): 639-647.
214. Lemp E. M. 1991. Reacción de Oxígeno Molecular Singulete en fase homogénea y en soluciones de vesículas sintéticas. Tesis (Doctora en Química). Santiago, Chile, Universidad de Santiago, Facultad de Ciencias.
215. Toropov A. A., Toropova A. P., Raska Jr I. 2008. QSPR modeling of octanol/water partition coefficient for vitamins by optimal descriptors calculated with SMILES. European journal of medicinal chemistry 43(4): 714-740.
216. Bukhari S. B., Memon S., Mahroof-Tahir M., Bhangar M. I. 2009. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 71(5): 1901–1906.
217. Cornard J. P., Dangleterre L., Lapouge C. 2006. DFT and TD-DFT investigation and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Zn(II)–3-hydroxyflavone complex. Chemical Physics Letters, 419(1-3): 304–308.

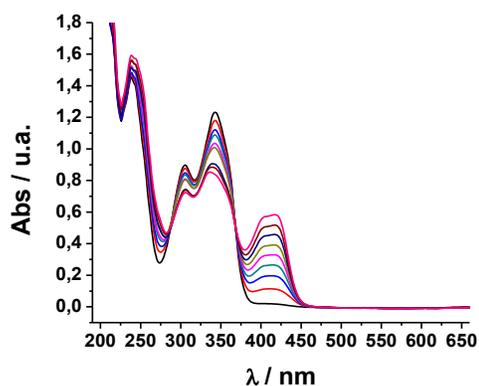
## 10. ANEXOS



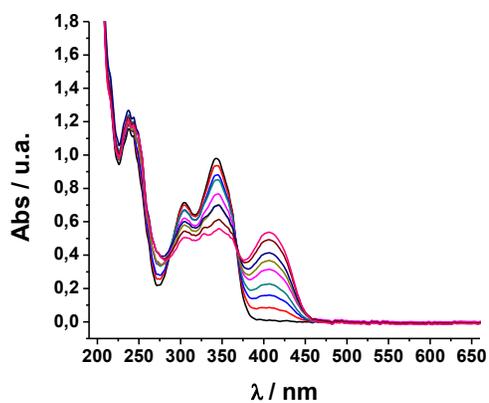
**Figura 25.** Espectros de absorción de quercetina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.



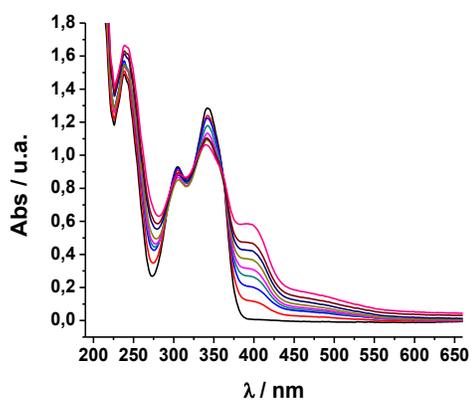
**3HF-Ca**



**3HF-Cu**

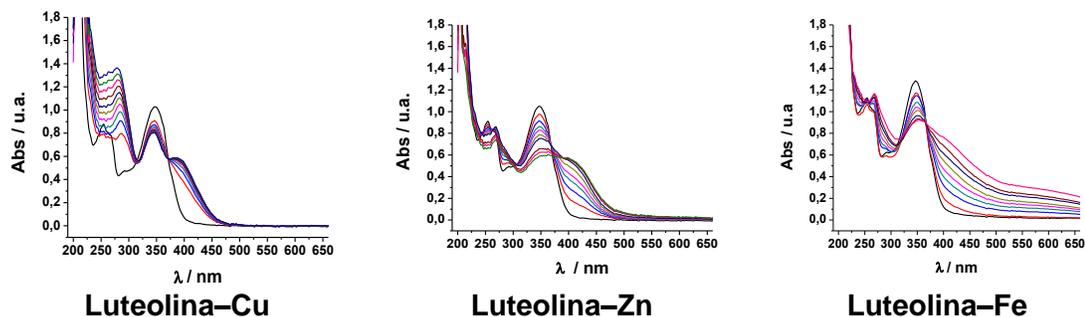


**3HF-Zn**

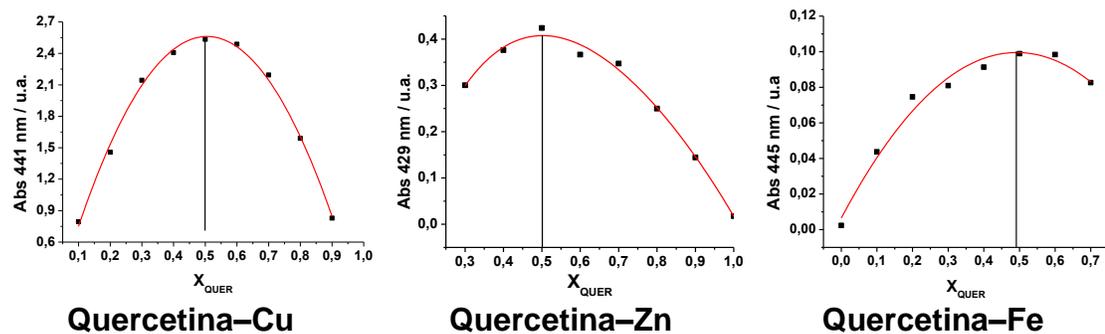


**3HF-Fe**

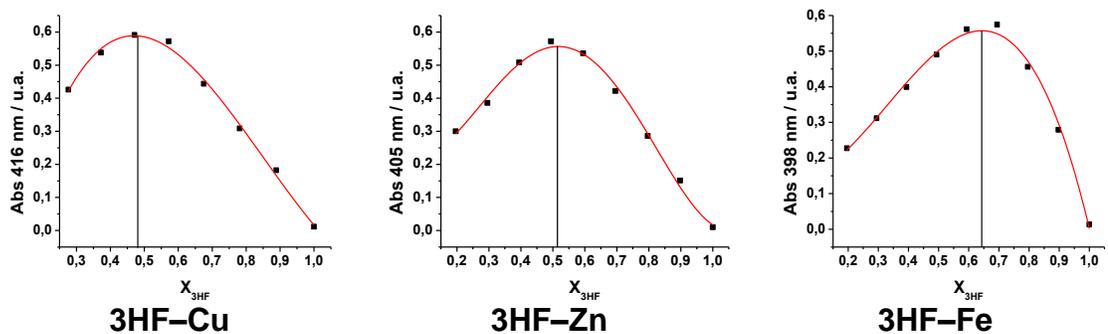
**Figura 26.** Espectros de absorción de 3-hidroxiflavona sin complejar y a concentración variable de ión metálico.



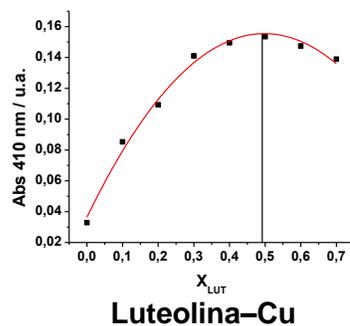
**Figura 27.** Espectros de absorción de luteolina sin complejar y a concentración variable de ión metálico.



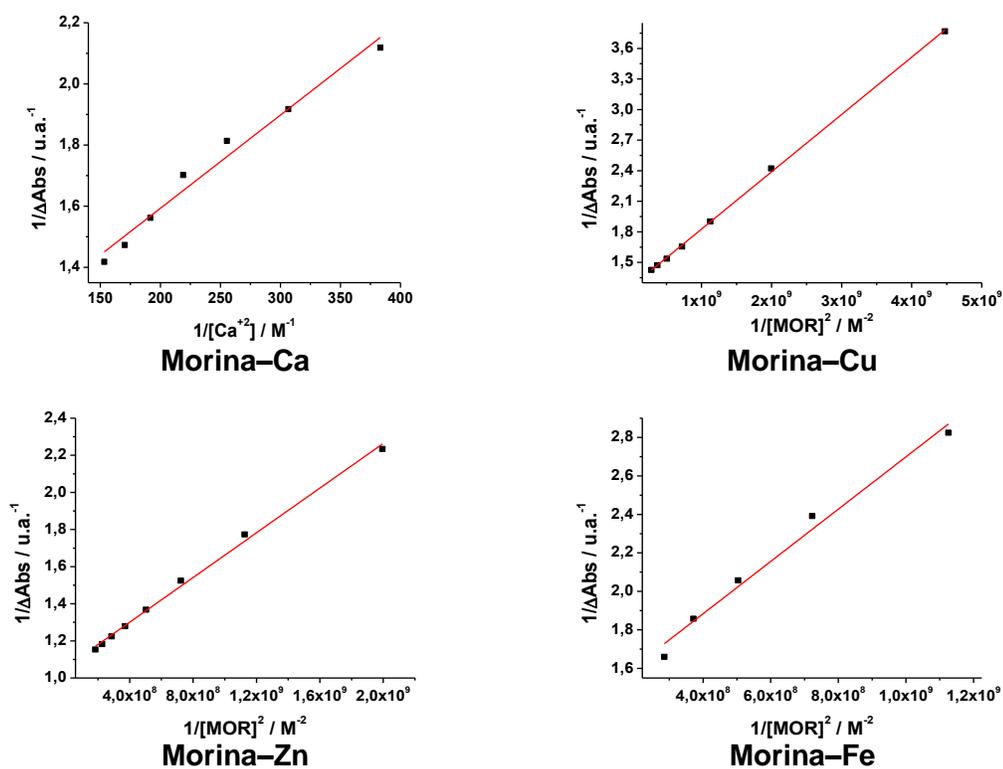
**Figura 28.** Gráficos de Job de complejos formados entre quercetina y metales de transición.



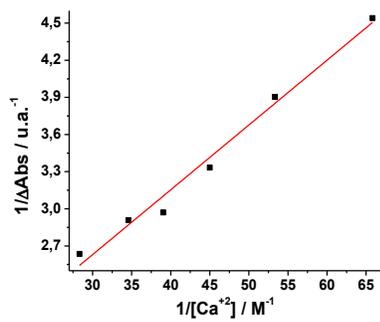
**Figura 29.** Gráficos de Job de complejos formados entre 3-hidroxi flavona y metales de transición.



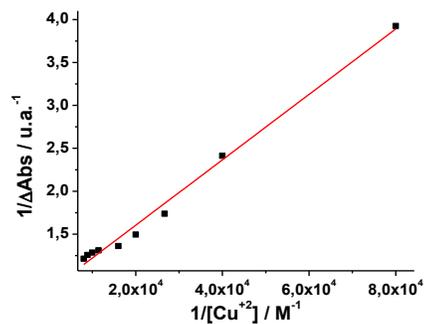
**Figura 30.** Gráfico de Job de complejo formado entre luteolina y  $\text{Cu}^{+2}$ .



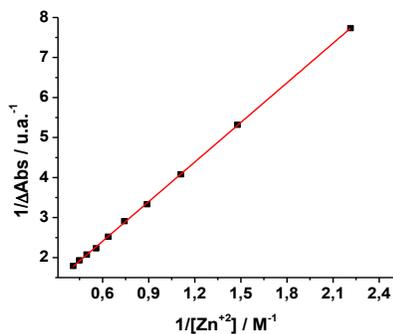
**Figura 31.** Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi-Hildebrand para los complejos formados con morina.



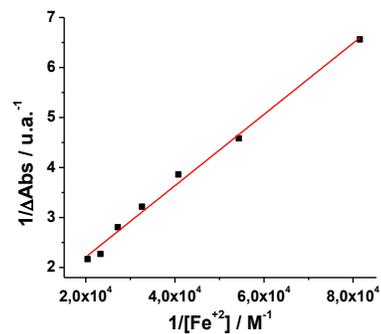
**Quercetina-Ca**



**Quercetina-Cu**

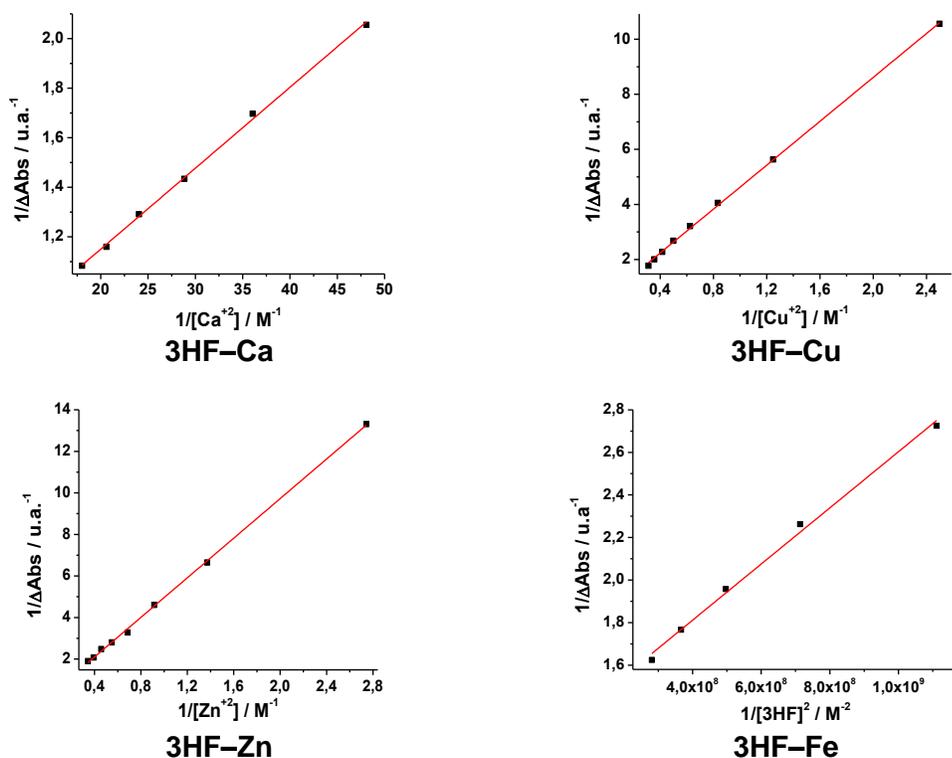


**Quercetina-Zn**

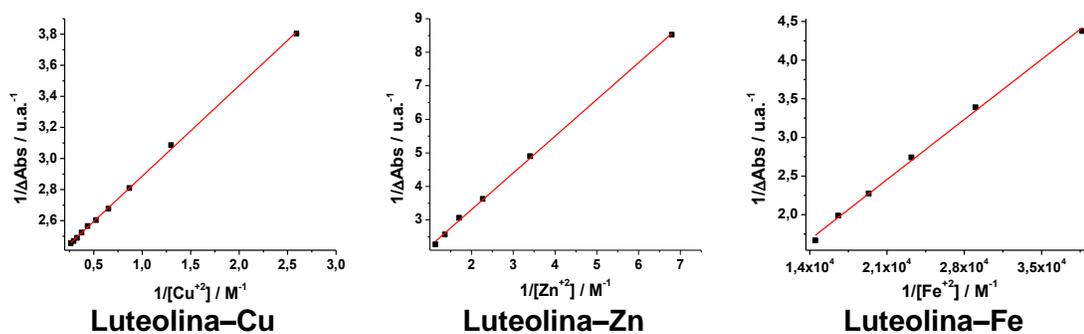


**Quercetina-Fe**

**Figura 32.** Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi-Hildebrand para los complejos formados con quercetina.



**Figura 33.** Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con 3–hidroxiflavona.



**Figura 34.** Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi–Hildebrand para los complejos formados con luteolina.

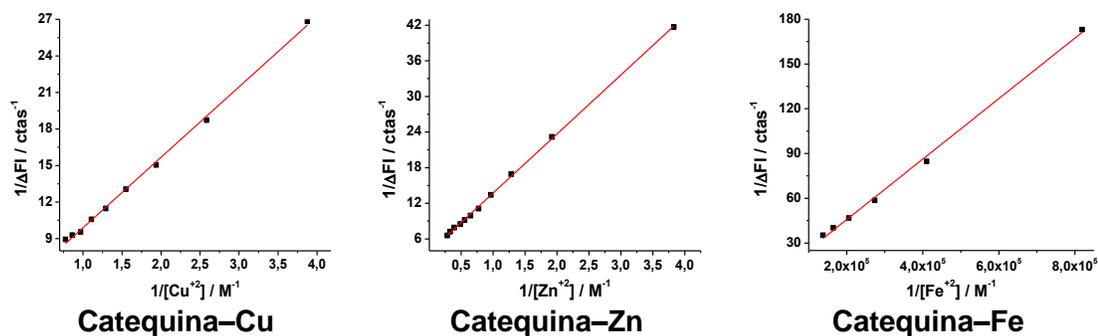


Figura 35. Gráficos de ajuste de datos a ecuación de Benesi-Hildebrand para los complejos formados con catequina.

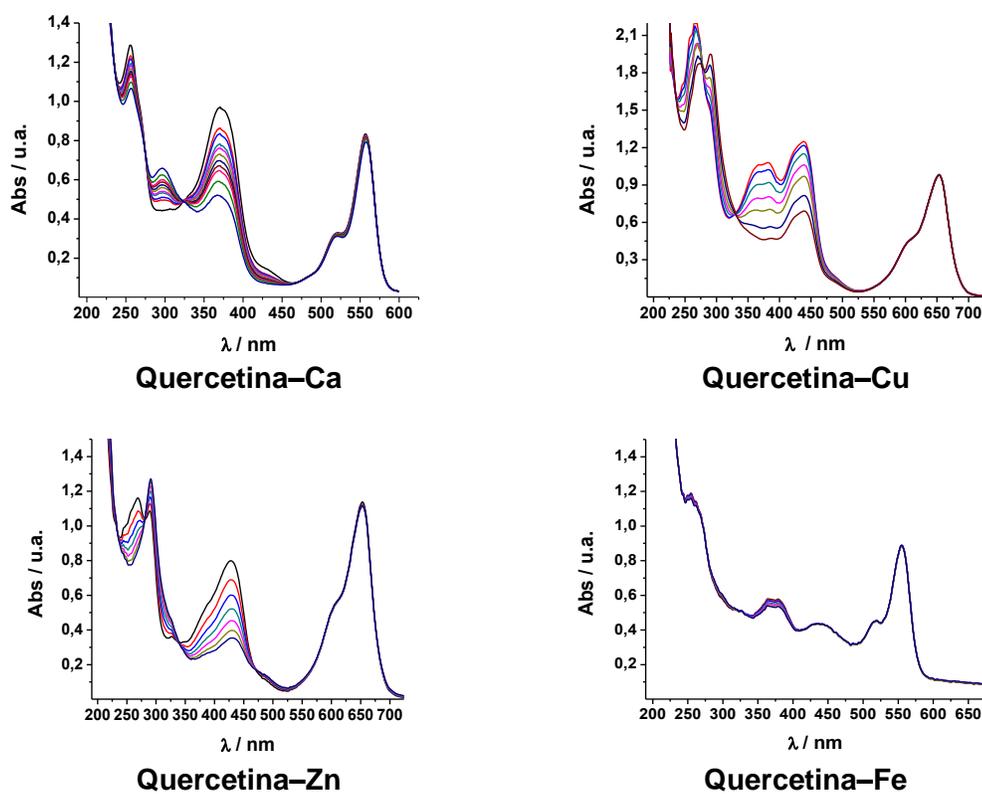
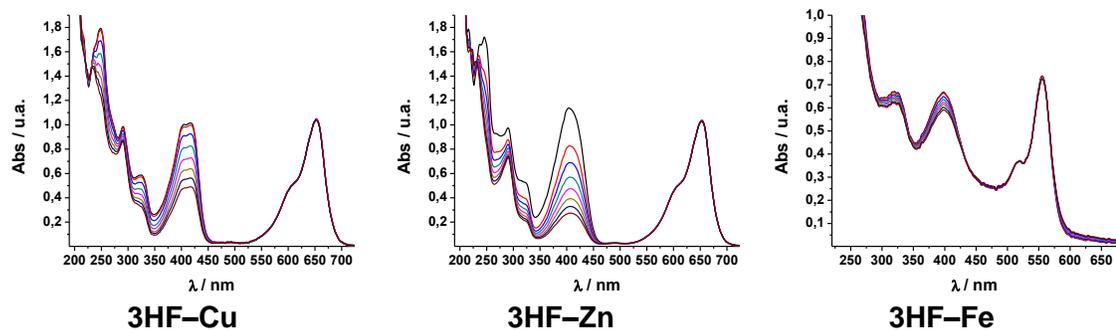
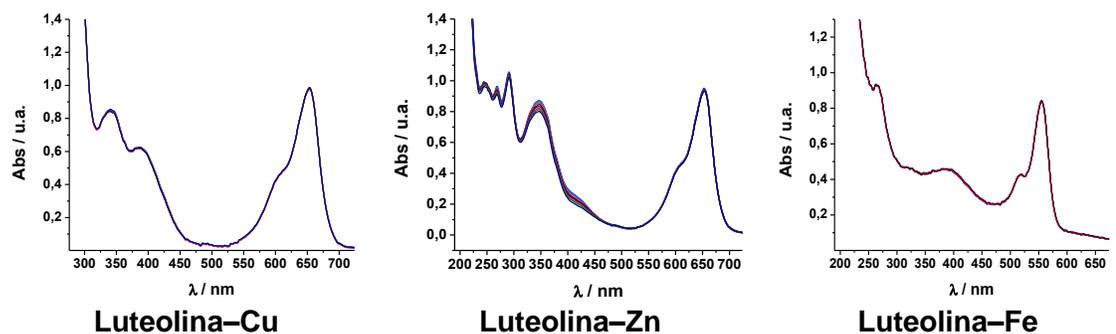


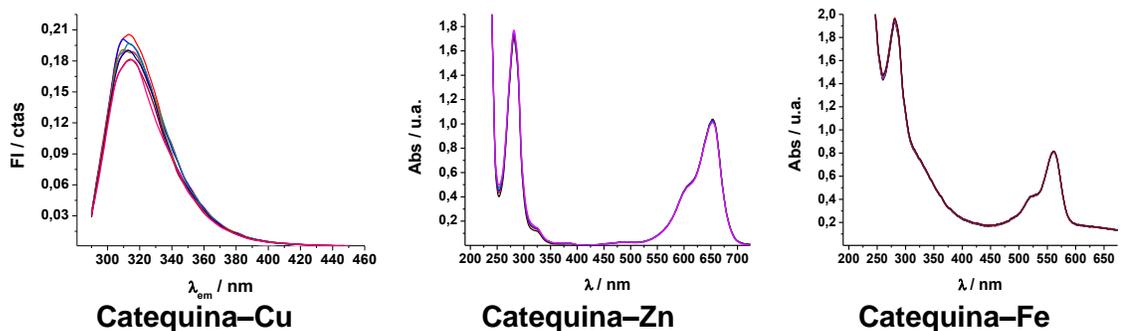
Figura 36. Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de quercetina por  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ .



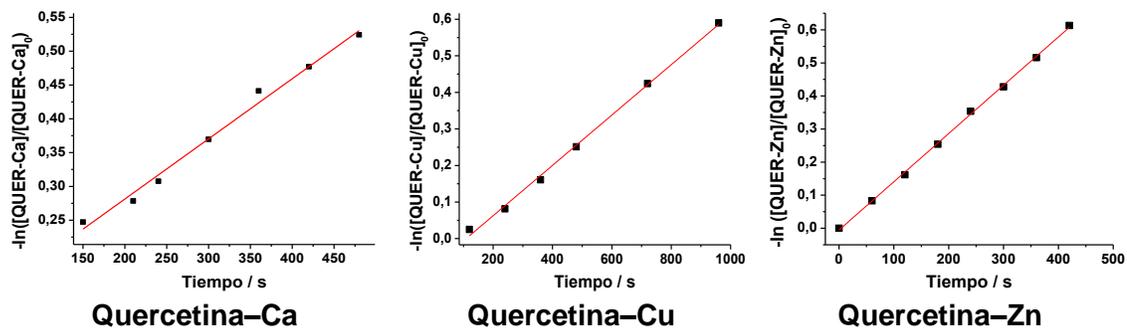
**Figura 37.** Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de 3-hidroxiflavona por  $O_2(^1\Delta_g)$ .



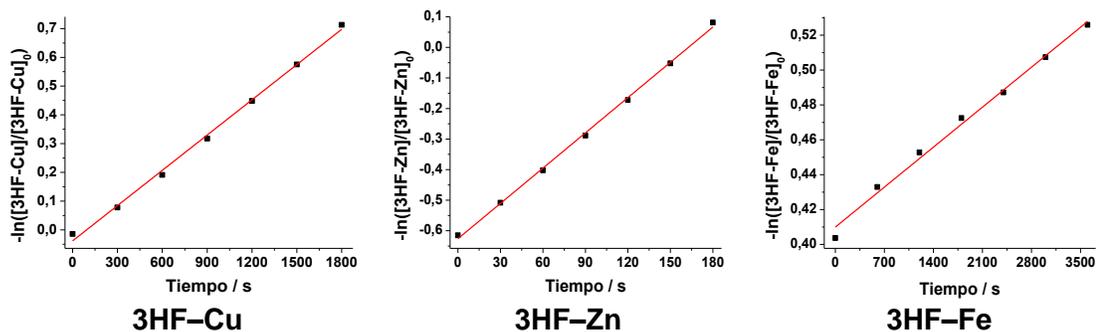
**Figura 38.** Espectros UV-Vis observados en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de luteolina por  $O_2(^1\Delta_g)$ .



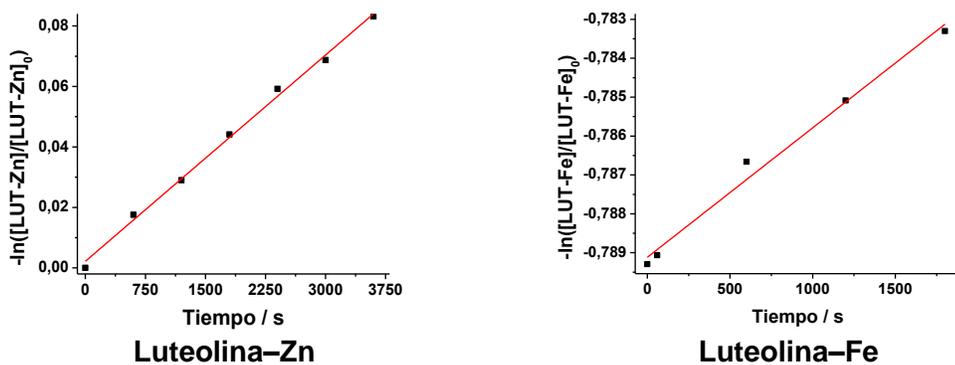
**Figura 39.** Espectros de fluorescencia y UV-Vis obtenidos en la reacción de fotooxidación de complejos metálicos de catequina por  $O_2(^1\Delta_g)$ .



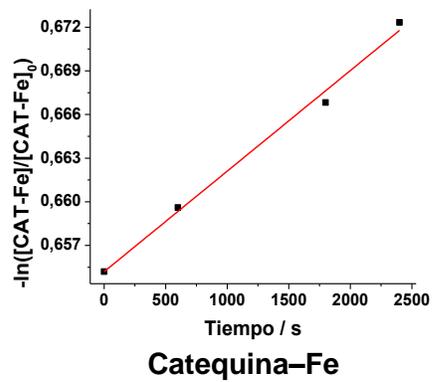
**Figura 40.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de quercetina.



**Figura 41.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de 3-hidroxi flavona.



**Figura 42.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación de complejos metálicos de luteolina.



**Figura 43.** Tratamiento cinético de pseudo primer orden para la fotooxidación del complejo catequina-Fe.