



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

**REACTIVIDAD DE LOS FLAVONOIDES MORINA Y QUERCETINA FRENTE
A OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE, EN PRESENCIA DE LOS IONES
METÁLICOS Ca^{+2} Y Cu^{+2}**

Memoria para optar al título de Químico

JENNIFER ELIZABETH RODRÍGUEZ RAMÍREZ

Patrocinador de Memoria
Dra. Else Lemp Miranda

Director de Memoria
Dra. Else Lemp Miranda

Santiago, Chile

2017

“La ética no es una colección de normas, es una sensibilidad”

Victoria Camps

A mi hijo, Felipe

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis amigas del Liceo 1, Ñany, Shi-k y Tracy, ellas hicieron que estar ahí no significara solo estudiar, sobre todo en tercero y cuarto. Nunca voy a olvidar las clases de biología, y el infinito temor a que la profe nos pidiera el cuaderno para revisar en qué había quedado la clase pasada. También quiero agradecer a la Milla, por existir y permitirnos existir junto a ella, aunque fuese por tan poco.

A las personas que conocí durante estos años que he pasado en la facultad, Egado, Gustavo, Alejandro y Leyla, de verdad valoro mucho la amistad que he construido con ustedes durante estos años. Agradezco el apoyo y la confianza que me han entregado.

Debo mencionar a quienes me siguieron o me hicieron seguirlos en la locura de participar del Centro de Estudiantes de Química y especialmente en la organización del Congreso de Estudiantes de Química: Navarro, Belén, Parra, Danae, Pelao, Jose, Elías, Iván, Antonio, Andrés, Soffi, Christian, Alejandro (otra vez), Francia, Cristóbal, Carlos, Seba... espero no olvidar a nadie. De verdad que participar de estas instancias ha sido de lo más agotador, pero también de lo más valioso que he vivido.

Debo agradecer también a mis matriarcas, Nico, Anaes, Vivi y Kiki, por ser unas grandes mujeres y amigas, por escucharme, por permitirme escucharlas, por creen en mí. Jamás pensé que podría conocer a personas tan geniales y secas en todo lo que hacen, de las mejores coincidencias de la vida.

Agradezco a los profesores Antonio y Else por permitirme hacer mis unidades de investigación y tesis en el laboratorio, por tenerme paciencia y por el apoyo en todas las circunstancias.

Por último, quiero agradecer infinitamente a mi mamá María, papá Roberto e hijo Felipe. Son las personas más importantes, quienes le dan un sentido a vivir todo esto, a seguir y no detenerme. Los amo, con lo simple y complejo que eso pueda significar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-------------|
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS | vii |
| RESUMEN | viii |
| SUMMARY | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Oxígeno molecular singulete | 2 |
| 1.2. Flavonoides | 7 |
| 1.3. Reactividad de flavonoides y complejos frente a oxígeno molecular singulete | 9 |
| 1.4. Objetivos | 12 |
| 1.4.1. Objetivo general | 12 |
| 1.4.2. Objetivos específicos | 12 |
| 2. MATERIALES | 14 |
| 3. INSTRUMENTACIÓN | 15 |
| 3.1. Espectrómetro para medición resuelta en el tiempo, PicoQuant Fluotime 200 | 15 |
| 3.2. Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 265 | 15 |
| 3.3. Espectrómetro IR Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR | 16 |
| 4. METODOLOGÍA | 17 |
| 4.1. Método de Job | 17 |
| 4.2. Método de Benesi-Hildebrand | 17 |
| 4.3. Fotólisis Estacionaria | 18 |
| 4.4. Espectroscopía resuelta en el tiempo | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5. Síntesis del complejo Morina – Cu | 21 |
| 4.6. Preparación de soluciones | 21 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| 5.1. Determinación de la estequiometría y constante de formación de los complejos formados entre los flavonoides y los iones metálicos | 22 |
| 5.1.1. Determinación de la estequiometría de los complejos formados con ión Cu^{+2} | 22 |
| 5.1.2. Determinación de la estequiometría de los complejos formados con ión Ca^{+2} y constantes de asociación de los complejos formados entre los flavonoides y metales | 28 |
| 5.2. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química, k_r , entre los flavonoides y $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en presencia de iones metálicos | 32 |
| 5.3. Evaluación de la constante de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, k_T , por los flavonoides en presencia de iones metálicos | 36 |
| 6. CONCLUSIONES | 42 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama de energía potencial para oxígeno molecular _____ | 3 |
| Figura 2. Esquema de fotosensibilización del oxígeno molecular singulete ____ | 4 |
| Figura 3. Esquema de desactivación del oxígeno molecular singulete _____ | 5 |
| Figura 4. Reacciones del oxígeno molecular singulete frente a algunos sustratos orgánicos _____ | 6 |
| Figura 5. Estructura química básica de los flavonoides _____ | 7 |
| Figura 6. Estructura química de diferentes subclases de flavonoides _____ | 8 |
| Figura 7. Estructura química de los flavonoides estudiados en esta tesis ____ | 12 |
| Figura 8. División de las bandas de absorción UV-Vis para flavonoides ____ | 23 |
| Figura 9. Espectros de absorción UV-Vis de Morina y Quercetina _____ | 23 |
| Figura 10. Gráfico de Job para Morina – Cu y Quercetina _____ | 24 |
| Figura 11. Posibles sitios de complejación para Morina y Quercetina ____ | 25 |
| Figura 12. Espectros IR de Morina y Morina – Cu _____ | 26 |
| Figura 13. Espectros de absorción UV-Vis de flavonoides con adición de solución de ión metálico _____ | 29 |
| Figura 14. Gráfico de Benesi-Hildebrand para formación de complejos ____ | 31 |
| Figura 15. Espectros UV-Vis de la fotooxidación por $^1\text{O}_2$ _____ | 33 |
| Figura 16. Gráficos del tratamiento de datos de la fotólisis estacionaria según cinética de pseudo primer orden _____ | 34 |
| Figura 17. Derivación de ecuación de Stern-Volmer modificada _____ | 37 |
| Figura 18. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ _____ | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Constantes de velocidad de reacción química k_r y de la desactivación total k_T entre oxígeno molecular singlete y flavonoides _____ | 11 |
| Tabla 2. Asignación de frecuencias IR para Morina y Morina – Cu _____ | 27 |
| Tabla 3. Estequiometría y constantes de asociación de los complejos estudiados _____ | 30 |
| Tabla 4. Constante de velocidad de la reacción química, k_r , para flavonoides y complejos estudiados. _____ | 35 |
| Tabla 5. Solvente y sensibilizador utilizados para las mediciones de las constantes de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ _____ | 37 |
| Tabla 6. Constante de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ k_T por flavonoides y complejos de estequiometrestudiados _____ | 39 |

RESUMEN

En este trabajo se midió y evaluó la reactividad de los flavonoides Morina y Quercetina frente a oxígeno molecular singulete, en presencia de los iones metálicos Ca^{+2} y Cu^{+2} , mediante determinaciones de las constantes de velocidad de reacción química entre los complejos formados y oxígeno excitado, y de las constantes de desactivación total de oxígeno molecular singulete.

Mediante el método de Job se determinó la estequiometría de los complejos Morina – Cu y Quercetina – Cu, siendo 2:1 y 1:1 respectivamente. Los complejos Morina – Ca y Quercetina – Ca presentan estequiometría 1:1, determinada por el método de Benesi – Hildebrand.

Los valores obtenidos para las constantes de asociación entre los flavonoides y los iones metálicos muestran que los complejos formados con Cu^{+2} ($K_{M-Cu}=1,80 \times 10^9 \text{ M}^{-2}$ y $K_{Q-Cu}=22076 \text{ M}^{-1}$) presentan valores mayores a los formados con Ca^{+2} ($K_{M-Ca}=322,4 \text{ M}^{-1}$ y $K_{Q-Ca}=20,24 \text{ M}^{-1}$), y los complejos formados por Quercetina presentan valores menores, en comparación a los formados por Morina frente a un mismo metal.

Las constantes de velocidad de reacción química entre los complejos y oxígeno molecular singulete, se obtuvieron mediante el método de fotólisis estacionaria. Los valores obtenidos muestran un aumento en la reactividad, el

cual podría deberse al aumento de la densidad electrónica en los sitios reactivos del flavonoide, cuando este se encuentra asociado al ion metálico. El complejo Morina – Cu no presenta un aumento significativo. En general, el aumento de la reactividad es mayor cuando los flavonoides forman complejos con Ca^{+2} .

Las constantes de desactivación total de oxígeno molecular singulete por complejos de flavonoides, se determinaron observando el decaimiento de la luminiscencia del $^1\text{O}_2$. En los complejos medidos, se observó que la desactivación total es mayor a la reactividad química, entre tres a cuarenta veces aproximadamente, 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. Este comportamiento es relevante cuando se considera el efecto antioxidante de los flavonoides en sistemas de interés biológico.

SUMMARY

Reactivity of flavonoids Morin and Quercetin towards singlet oxygen, in presence of metal ions Ca^{+2} and Cu^{+2}

In this work, the reactivity of flavonoids Morin and Quercetin towards singlet oxygen was measured and evaluated in the presence of Ca^{+2} and Cu^{+2} metal ions, by measuring both, the chemical reaction rate constants between the metal – flavonoid complexes and excited oxygen, and the total deactivation constants of singlet oxygen.

Using the Job's method, the stoichiometry of Morin – Cu and Quercetin – Cu complexes was determined, being 2:1 and 1:1, respectively. Morin – Ca and Quercetin – Ca complexes have 1:1 stoichiometry, which were determined by the Benesi – Hildebrand method.

Values obtained for the association constant between flavonoids and metal ions show that the complexes formed with Cu^{+2} ($K_{\text{M-Cu}}=1,80 \times 10^9 \text{ M}^{-2}$ and $K_{\text{Q-Cu}}=22076 \text{ M}^{-1}$) have higher values than those formed with Ca^{+2} ($K_{\text{M-Ca}}=322,4 \text{ M}^{-1}$ and $K_{\text{Q-Ca}}=20,24 \text{ M}^{-1}$). In addition, results show that the complexes formed by Quercetin have lower values, in comparison to those formed by Morin with the same metal.

Chemical rate constant for reaction between complexes and singlet oxygen, were obtained by the steady – state photolysis method. Values show an increase in the reactivity of complexes when compared the flavonoid. This result can be explained in terms of electronic density in the reactive sites of the flavonoid, when it is associated whit the metal ion. However Morin – Cu complex does not show a significant increase. In general, the increase of the reactivity is greater when the flavonoids form complexes with Ca^{+2} .

The total quenching rate constants of singlet oxygen by flavonoid complexes were determined by observing the decay of $^1\text{O}_2$ luminescence. From this experiment was observed that the total deactivation rate constant is greater than the chemical reaction rate constant, between the 3 – fold to 40 – fold approximately, indicating that the physical deactivation is the predominant. Moreover, the total rate constant values all complexed flavonoid is always greater than the rate constant for uncomplexed flavonoid. This behavior is relevant when considering the antioxidant effect of flavonoids in systems of biological interest.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son estados parcialmente reducidos del oxígeno molecular¹, por lo tanto, productos normales durante el metabolismo aeróbico², actuando como especies señalizadoras para controlar procesos como la muerte celular y de defensa contra patógenos^{3,4}. Los ROS se encuentran presentes en reacciones enzimáticas, el transporte de electrones en la mitocondria, la transducción de señales, la activación de los factores de transcripción del núcleo, la expresión de genes y la acción antimicrobial de neutrófilos y macrófagos⁵. Sin embargo, las ROS también han tenido un creciente interés en los últimos decenios, debido a su participación en algunas fisiopatologías, como cáncer, artritis y enfermedades neurodegenerativas⁶⁻⁹. Cuando se encuentran en exceso, se produce un desbalance, resultante de la excesiva producción de oxidantes y bajas defensas antioxidantes, denominado estrés oxidativo. Esto conduce a reacciones en cadena, viéndose afectados lípidos, proteínas, polisacáridos y ADN¹⁰, las que permiten que se produzcan las fisiopatologías antes mencionadas.

Los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa en oposición al estrés oxidativo, los que pueden ser enzimáticos, con participación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; y no enzimáticos, entre las que se encuentran moléculas de bajo

peso molecular como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), ubiquinol, carotenoides, flavonoides, entre otras¹¹⁻¹³, las cuales pueden ingresar al organismo a través de la dieta alimenticia o del uso de suplementos alimentarios^{14,15}.

1.1. Oxígeno molecular singulete

El oxígeno molecular singulete [$O_2(^1\Delta_g)$] pertenece a las especies reactivas del oxígeno, siendo un agente oxidante no radicalario que corresponde al estado excitado de más baja energía del oxígeno molecular, encontrándose a 22,5 Kcal sobre el estado basal, que 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 spin triplete, mientras que, en el primer estado excitado, tiene todos sus electrones apareados, presentando multiplicidad de spin singulete. Esto hace que presente una química muy diferente al oxígeno molecular triplete o basal, siendo sustantivamente más reactivo¹⁶. El oxígeno molecular presenta un segundo estado singulete excitado [$O_2(^1\Sigma_g)$], ubicado a 37,5 Kcal por sobre el estado basal (Fig. 1), presentando un tiempo de vida intrínseco en fase gas de 7,1 segundos, mientras que el del primer estado excitado es igual a 2700 segundos¹⁷. Sin embargo, en fases condensadas este

estado decae rápidamente al primer estado excitado, por lo que no es partícipe de los procesos que allí ocurren.

El oxígeno molecular singlete puede ser generado en solución mediante diferentes mecanismos, por ejemplo, absorción directa de energía por oxígeno en estado basal, técnica que actualmente no es muy utilizada debido a que es un proceso poco eficiente; descarga de microondas a través de una corriente de oxígeno gaseoso; reacción química entre peróxido de hidrógeno e ión hipoclorito o hipobromito; sensibilización por radiólisis de pulso y fotosensibilización.

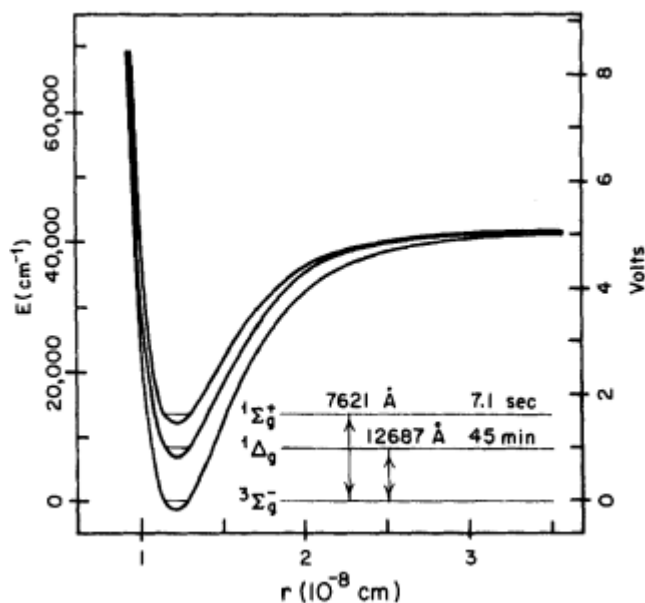


Figura 1. Diagrama de energía potencial para oxígeno molecular en estado basal triplete y dos primeros estados electrónicamente excitados¹⁷

La fotosensibilización es el método comúnmente utilizado para la generación de oxígeno molecular singulete. Consiste en la transferencia de energía desde un sensibilizador fotoexcitado al oxígeno en estado basal. Para que una molécula sea un buen sensibilizador, debe presentar un alto coeficiente de absorción a la longitud de onda de excitación, estados tripletes con tiempos de vida largo y energía superior a la del estado excitado del oxígeno, además de no reaccionar químicamente con oxígeno molecular singulete, para evitar su consumo durante la fotosensibilización. El primer estado singulete excitado del sensibilizador se genera por absorción directa de energía; desde este estado puede realizar la transferencia de energía directamente al oxígeno en estado basal, lo cual puede ocurrir a tiempos de vida largos del estado excitado, o bien decaer al estado basal o por cruce entre sistemas llegar al estado triplete (Fig. 2).

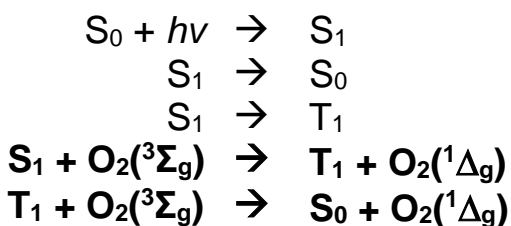


Figura 2. Esquema del proceso de fotosensibilización del oxígeno molecular singulete

La desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio puede ocurrir por emisión radiativa a 1270 nm, por interacción física con el solvente y por reacción física o química con moléculas presentes (Fig. 3).

La desactivación radiativa, definida por la constante $k_{\Delta P}$, corresponde al decaimiento de oxígeno molecular singulete desde el estado excitado hasta el estado basal, presentando emisión fosforescente a 1270 nm.

La desactivación física con el solvente, definida 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 isotópica¹⁸, tomando valores desde 4 μ s en agua, y alcanzando 628 μ s en benceno perdeuterado y 110 milisegundos en triclorofluorometano¹⁹⁻²¹.

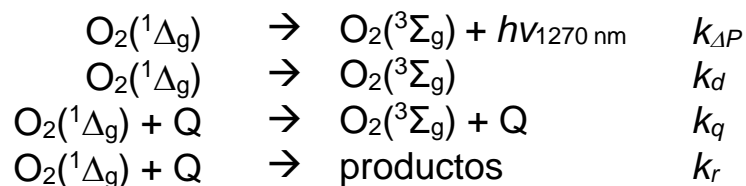


Figura 3. Esquema de desactivación del oxígeno molecular singulete

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 reacciona²². La interacción de esta especie excitada con diferentes sustratos ha sido

ampliamente estudiada y utilizada en síntesis orgánica para obtener productos o intermediarios de reacción, por ejemplo, en adiciones a doble enlace C=C para obtener intermediarios de tipo hidroperóxido, endoperóxido o dioxetano²³, reacción con aminas secundarias para obtener iminas²⁴, oxidación de fenoles, aminas y sulfuros²⁵, fotooxigenación de heterociclos^{23, 26}, entre otras (Fig. 4).

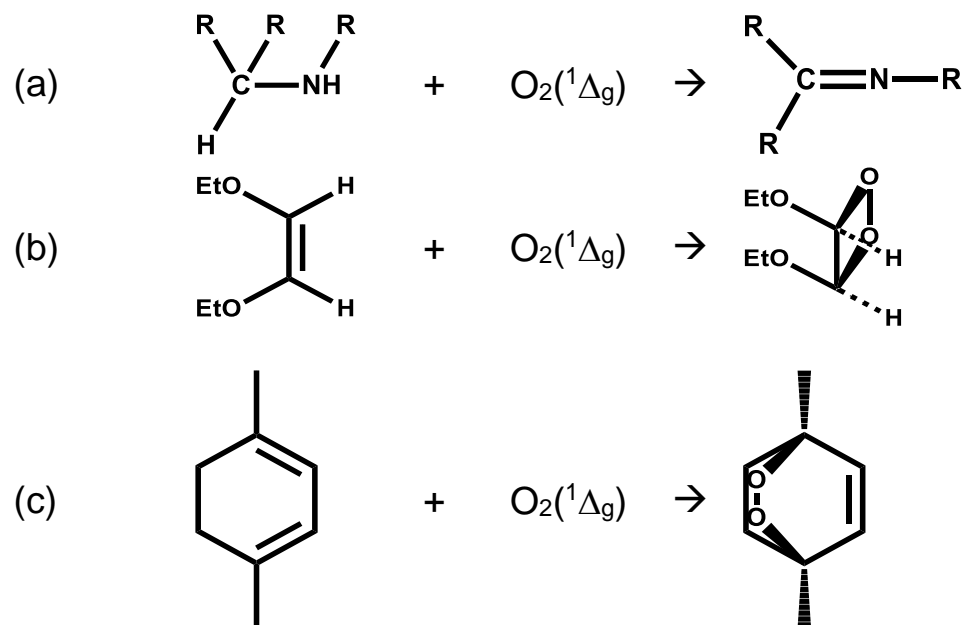


Figura 4. Reacciones del oxígeno molecular singulete frente a algunos sustratos orgánicos: (a) amina secundaria; (b) adición [2+2]; (c) adición [2+4]

1.2. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente presentes en frutas, vegetales y algunos productos elaborados como té, vino y chocolate. Son reconocidos por su capacidad antioxidante que ejercen un rol protector frente a enfermedades cardiacas, cáncer y diferentes patologías; además de presentar efecto antiinflamatorio y antialérgico²⁷. Presentan una estructura química básica de 2-fenil-benzo- γ -pirona (Fig. 5), la que puede presentar diferentes sustituciones en los anillos A y B²⁸. Modificaciones en el anillo heterocíclico C, da lugar a diferentes subclases de flavonoides, por ejemplo, flavonas, isoflavonas, neoflavonas, flavanonas, chalconas, flavanoles y antocianidinas (Fig. 6). Se han identificado más de 8000 compuestos con estructura de flavonoide. Este gran número de compuestos se debe a las variadas combinaciones de múltiples grupos hidroxilo y metoxilo en su esqueleto básico²⁹.

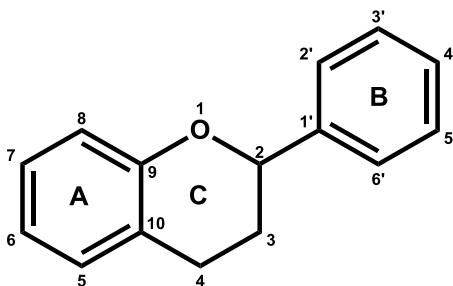


Figura 5. Estructura química básica de los flavonoides

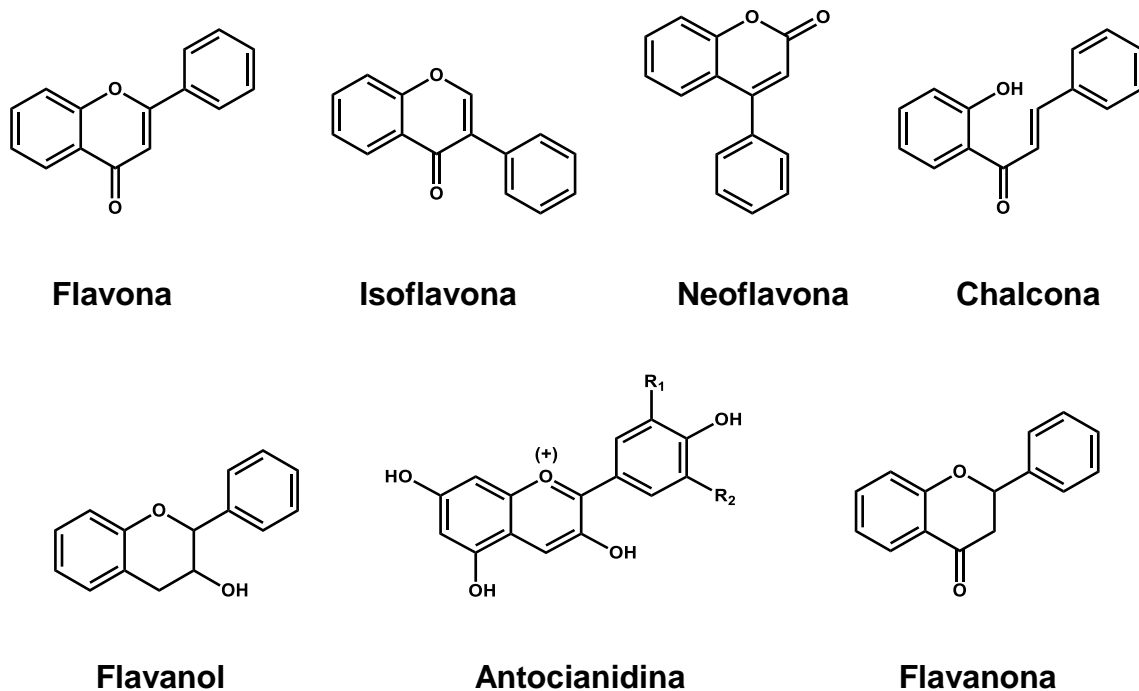


Figura 6. Estructura química de diferentes subclases de flavonoides

La acción antioxidante de los flavonoides ha sido ampliamente estudiada frente a diferentes moléculas oxidantes de tipo radicalario³⁰⁻³², en los que se ha encontrado dependencia con la estructura del flavonoide. Entre los mecanismos propuestos para la acción antioxidante de estos compuestos se encuentra la abstracción de hidrógeno, transferencia de electrones y complejación con iones metálicos³³⁻³⁵. La complejación de flavonoides con iones metálicos inhibe las reacciones en las que estos metales participan y generan radicales, tales como las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss. 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 aumenta su capacidad antioxidante y modifica su acción biológica³⁶.

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 y han propuesto el sitio del flavonoide donde ocurre la complejación^{28,37-39}. Sin embargo, son pocos los estudios en los cuales se mide la reactividad de flavonoides y los complejos que forma con diferentes cationes metálicos, frente a oxígeno molecular singulete [$O_2(^1\Delta_g)$].

1.3. Reactividad de flavonoides y complejos frente a oxígeno molecular singulete

En el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, se ha medido la reactividad de algunos flavonoides frente a $O_2(^1\Delta_g)$, encontrándose que son buenos desactivantes de esta especie reactiva, y podrían ser antioxidantes aún más valiosos para proteger sistemas en condiciones de estrés oxidativo, conclusiones similares a las descritas por otros autores⁴⁰⁻⁴¹. Además, se analizó la dependencia de los valores de las constantes de velocidad con estructura molecular en términos de descriptores globales y funciones Fukui condensadas, 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 exciplejos que genera productos de reacción, evoluciona a través de un hidroperóxido y/o un endoperóxido intermediario producido por ataque del oxígeno singulete al doble enlace del anillo C del flavonoide, sin embargo, sólo 1-5% del exciplejo evoluciona para dar productos de reacción, lo que implica que los flavonoides desactivan oxígeno molecular singulete principalmente a través un proceso físico (Tabla 1). En el curso de estos estudios, se encontró que varios iones metálicos, Cu^{+2} , Ca^{+2} y Mg^{+2} aumentan la reactividad del flavonoide quercetina con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en aproximadamente un orden de magnitud y que este efecto podría atribuirse a la formación de un complejo de asociación entre el flavonoide y el ión del metal⁴⁶.

García et al.⁴² han estudiado el comportamiento de 3,3'-dihidroxiavona y su complejo con La(III) como desactivadores de las especies reactivas del oxígeno, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) fotogenerados por riboflavina. En este trabajo informan que la 3,3'-dihidroxiavona y el complejo reaccionan con oxígeno molecular singulete y anión radical superóxido por un mecanismo complejo. La flavona desactiva al oxígeno molecular singulete predominantemente por la vía física, hecho que constituye una propiedad deseable para los antioxidantes, puesto que este se recupera después del proceso y, por lo tanto, una molécula de antioxidante puede desactivar muchas moléculas de especie reactiva. La quelación con metal mejora en gran medida la capacidad de la flavona como un desactivador de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Tabla 1. Constantes de velocidad de reacción química, k_r , y de la desactivación total, k_T , entre oxígeno molecular singulete y flavonoides⁴³

| Flavonoide | $k_r / 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ | $k_T / 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ | k_r / k_T (%) |
|--------------|--|--|-----------------|
| | EtOH | D ₂ O, pD=7,4 | |
| 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 |

De acuerdo a lo expuesto, resulta importante conocer la interacción de flavonoides que forman complejos con iones metálicos, los que mejoran la capacidad antioxidante de estas moléculas orgánicas en comparación a la no complejada, frente a oxígeno molecular singulete, especie excitada que podría estar involucrada en diversas fisiopatologías derivadas del estrés oxidativo.

Los flavonoides estudiados en esta tesis corresponden a Morina (2-(2',4'-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) y Quercetina (2-(3',4'-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) (Fig. 7), los que pertenecen a la subclase de las flavonas. Presentan igual número de grupos hidroxilo, sin embargo, hay diferencias en su estructura. La Morina es sustituida en la posición 2' con la posición 3' libre, mientras que la quercetina presenta

sustitución en la posición 3' con la posición 2' libre. Los iones metálicos utilizados fueron Ca^{+2} y Cu^{+2} , partícipes de diferentes procesos vitales en sistemas vivos.

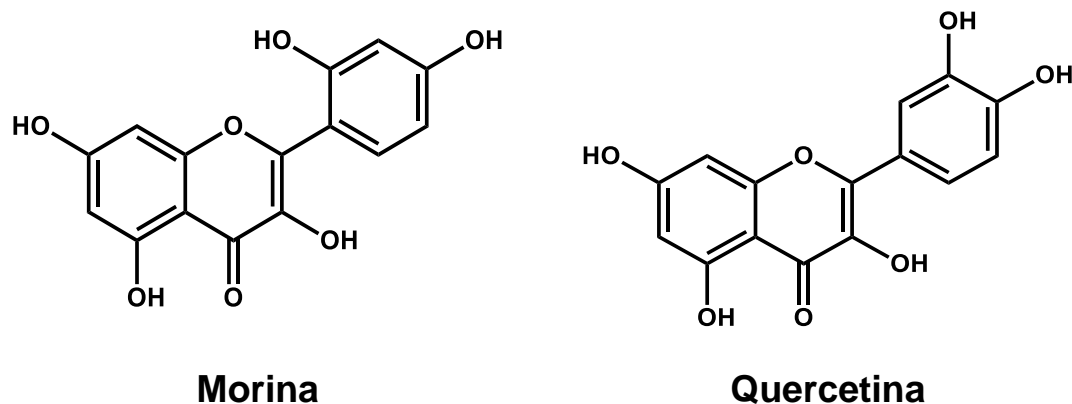


Figura 7. Estructura química de los flavonoides estudiados en esta tesis

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la reactividad de los flavonoides Morina y Quercetina frente a oxígeno molecular singlete en presencia de los iones metálicos Ca^{+2} y Cu^{+2}

1.4.2. Objetivos específicos

- I. Determinar la estequiometría de los complejos formados entre los flavonoides y los iones metálicos.
- II. Determinar la constante de reacción para la formación de complejos entre los flavonoides y los iones metálicos.

- III. Determinar la constante de reacción química de los flavonoides frente a oxígeno molecular singulete, en presencia de los iones metálicos.
- IV. Determinar la constante de desactivación total de oxígeno molecular singulete por los flavonoides, en presencia de los iones metálicos.

2. MATERIALES

- Quercetina Dihidrato (Sigma Aldrich)
- Morina Hidrato (Sigma Aldrich)
- CaCl_2 anhidro para análisis (Merck)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para análisis (Merck)
- $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ para análisis (Merck)
- Metanol para análisis (Merck)
- Metanol Monodeuterado (Sigma Aldrich)
- Azul de Metileno (Merck)
- 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfina zinc
- Rosa de Bengala (Fluka)

Todos los solventes y reactivos se utilizaron sin purificación previa.

3. INSTRUMENTACIÓN

3.1. Espectrómetro para medición resuelta en el tiempo, PicoQuant Fluotime 200

El detector del equipo recibe la radiación emitida por la muestra en el cercano-IR, que corresponde al decaimiento del oxígeno molecular singulete al estado basal triplete. Para la excitación se usó un láser Nd:YAG bombeado por diodo, trabajando a 2.5 kHz de frecuencia máxima de repetición a 532 nm y un láser de estado sólido bombeado por diodo que trabaja a 5 kHz de frecuencia máxima de repetición a 657 nm. Este equipo es controlado por el software NanoHarp y las señales de emisión resuelta en el tiempo se analizan con el software de análisis de datos FluoFit 4.0.

3.2. Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 265

El espectrofotómetro permite obtener espectros de absorción UV-Vis en tiempos cortos, debido a que posee detector de arreglo de diodos. Está conectado a un computador y es controlado por el software UV Lab.

3.3. Espectrómetro IR Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR

El espectrómetro permite obtener espectros de absorción IR. Está conectado a un computador y es controlado por el software OMNIC.

4. METODOLOGÍA

4.1. Método de Job

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

4.2. Método de Benesi – Hildebrand

El método de Benesi – Hildebrand se utilizó para determinar la constante de equilibrio para la formación de complejos a través de medidas espectrofotométricas. En este método se fija la concentración de uno de los reaccionantes, mientras el otro se encuentra a una concentración más alta. La ecuación que describe la dependencia del cambio en la propiedad medida con la concentración se puede escribir de las siguientes formas:

Para la formación de complejos con estequiometría 1:1

$$\frac{1}{\Delta P} = \frac{1}{b\Delta\varepsilon[Fla]_0 K_{11}} \frac{1}{[M^{+X}]} + \frac{1}{b\Delta\varepsilon[Fla]_0}$$

Para la formación de complejos con estequiometría 1:2

$$\frac{1}{\Delta P} = \frac{1}{b\Delta\varepsilon[Fla]_0 K_{12}} \frac{1}{[M^{+X}]^2} + \frac{1}{b\Delta\varepsilon[Fla]_0}$$

Donde

ΔP cambio en la propiedad medida (absorbancia o fluorescencia)

$[Fla]_0$ concentración de Flavonoide, constante

$[M^{+X}]$ concentración analítica del ión metálico.

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

K_{11} constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1

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

4.3. Fotólisis Estacionaria

El método de fotólisis estacionaria se utilizó para determinar las constantes de velocidad de reactividad química entre el flavonoide complejoado y el oxígeno molecular singulete. Típicamente, se irradia una celda de cuarzo que contiene el fotosensibilizador y la sustancia a medir. La iluminación se realiza a diferentes tiempos, realizando medidas de absorbancia a 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 utilizado corresponde a un porta celda protegido de la luz ambiente, con una abertura que permite el paso de la radiación proveniente de la fuente de radiación; una ampolleta halógena de 50 W que sirve de fuente de radiación, ubicada a una distancia tal del portacelda que permita seguir el consumo del flavonoide y un filtro de corte de 500 nm que permite excitar selectivamente el sensibilizador a la longitud de onda correspondiente.

Considerando los procesos elementales por los cuales $O_2(^1\Delta_g)$ se genera y reacciona con el flavonoide, la velocidad de consumo del flavonoide estará dada por la ecuación

$$-\frac{d[Q]}{dt} = k_r [^1O_2][Q]$$
$$k_{exp} = k_r [^1O_2]$$

Si consideramos que la concentración de $O_2(^1\Delta_g)$ es prácticamente constante, entonces la velocidad se expresa como una cinética de pseudo primer orden y el valor de constante de velocidad experimental, k_{exp} , se puede obtener del gráfico de la dependencia del $\ln([Q]_0/[Q])$ v/s tiempo. En igualdad de condiciones se repite el experimento con un actinómetro que reacciona solo químicamente con $O_2(^1\Delta_g)$ y cuya constante de velocidad reactiva es conocida, obteniéndose la

concentración estacionaria del oxígeno excitado, permitiendo obtener el valor de k_r para el sustrato de interés.

4.4. Espectroscopía resuelta en el tiempo

En el equipo de espectroscopía resuelta en el tiempo, se obtiene el valor del tiempo de vida del oxígeno molecular singlete a diferentes concentraciones de desactivante, midiendo su emisión infrarroja a 1270 nm. La disminución de la luminiscencia del oxígeno molecular excitado con el tiempo, se puede ajustar de acuerdo a un modelo de decaimiento exponencial del tipo:

$$I = I_0 e^{-k_D t}$$

En consecuencia, de los valores de k_D en ausencia y presencia de un dado desactivante aplicando la ecuación de Stern – Volmer, se obtiene la constante de desactivación total, k_T .

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_T \tau_0 [Q]$$

$$k_D = \frac{1}{\tau} \quad y \quad k_T = k_q + k_r$$

4.5. Síntesis del complejo Morina – Cu

La síntesis del complejo Morina – Cu se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Zhang et al.⁴⁴. En un balón de fondo redondo de 100 mL con 3 bocas, un agitador magnético, un condensador de reflujo y una trampa de CaCl₂, se agrega Morina (0,001 mol) y etanol absoluto (7 – 10 mL). El balón se calienta a 50°C en un baño de agua. Cuando el sólido se disuelve, se agrega etóxido de sodio (0,03 mL). Después de 3 – 4 minutos se agrega rápidamente acetato de cobre (0,7 mmol), y la solución se lleva a reflujo con agitación durante 8 horas. Luego la mezcla se enfría a temperatura ambiente, se agrega 70 mL de agua y se deja reposar durante 48 horas. Se filtra, lavando el sólido tres veces con mezcla etanol – agua 1:3 y varias veces con agua para eliminar el ión metálico. El producto sólido es secado al vacío por 48 horas. Rendimiento 93%.

4.6. Preparación de soluciones

La preparación de soluciones de flavonoides y de sales inorgánicas, se realizó de acuerdo al rango de concentraciones que permiten la medida en los equipos de espectroscopía resuelta en el tiempo y UV-Vis, las que se encuentran en el orden de 2 mM para Morina, Quercetina y CuSO₄, y entre 20 y 300 mM para CaCl₂.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la estequiometría y constante de formación de los complejos formados entre los flavonoides y los iones metálicos

5.1.1. Determinación de la estequiometría de los complejos formados con ión Cu^{+2}

Mediante el método de Job se determinaron las estequiometrías de los complejos de Morina – Cu y Quercetina – Cu, utilizando metanol como solvente.

Los flavonoides presentan dos bandas de absorción características en metanol^{28,35,39}, una a 254 nm para Morina y 255 nm para Quercetina, correspondientes al sistema conjugado del anillo A o sistema benzoil (banda II), y una centrada en 357 nm y 371 nm, para Morina y Quercetina respectivamente, que corresponden al sistema conjugado del anillo B o sistema cinamoil (banda I) (Fig. 8). En la Figura 9 es posible observar los espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides Morina y Quercetina. La adición de CuSO_4 provoca un corrimiento batocrómico de 357 nm a 420 nm y de 371 nm a 441 nm para los complejos Morina – Cu y Quercetina – Cu respectivamente, lo que se debe a la extensión de la conjugación en el sistema cuando el ión metálico se asocia al flavonoide.

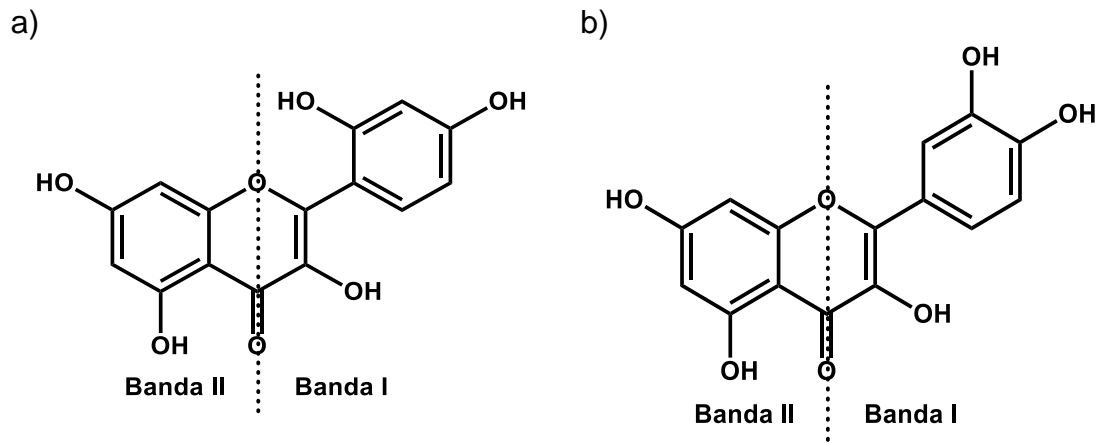


Figura 8. División de las bandas de absorción UV-Vis para flavonoides

a) Morina; b) Quercetina

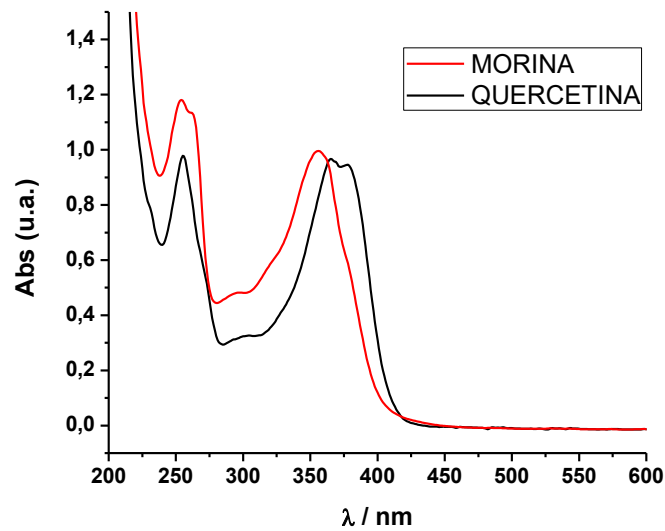


Figura 9. Espectros de absorción UV-Vis de Morina y Quercetina

El gráfico de absorbancia del complejo flavonoide – metal versus la fracción molar del flavonoide, presenta un máximo de absorción a $X_{MOR}=0,66$ y $X_{QUER}=0,5$, confirmando que la estequiometría del complejo Morina – Cu es 2:1 (Fig. 10.a) y la del complejo Quercetina – Cu es 1:1 (Fig. 10.b). De acuerdo a los corrimientos en los espectros de absorción UV-Vis de los flavonoides asociados al metal, se observa que el sistema cinamoil (banda I) se perturba en mayor medida. A partir de esto, se puede identificar que los posibles sitios de complejación para Morina, se encuentran entre el carbonilo en la posición 4 y el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición 3, del anillo C, y entre el oxígeno en la posición 1 del anillo C y el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición 2' del anillo B; mientras que para Quercetina, se encuentran entre el carbonilo en la posición 4 y el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición 3, del anillo C, y entre los oxígenos de los grupos hidroxilo en la posición 3' y 4' del anillo B (Fig. 11).

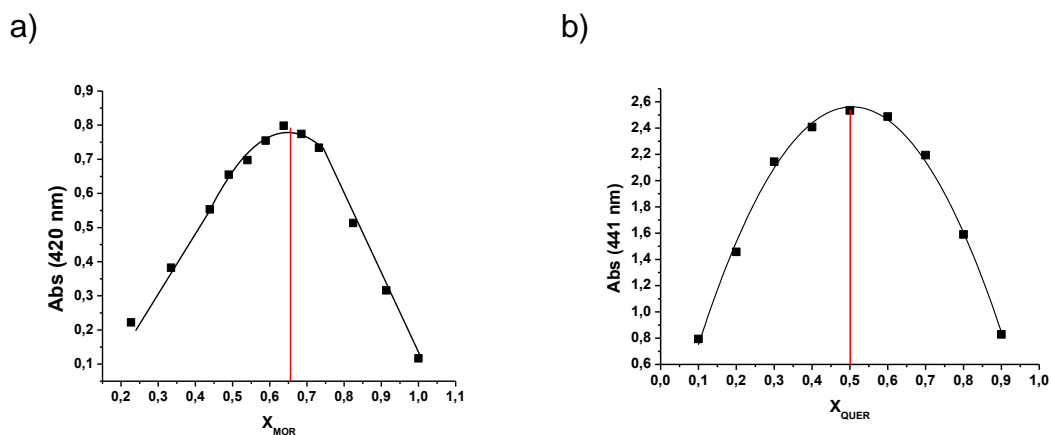


Figura 10. Gráfico de Job para a) Morina – Cu (λ_{ABS} 420 nm); b) Quercetina – Cu (λ_{ABS} 441 nm)

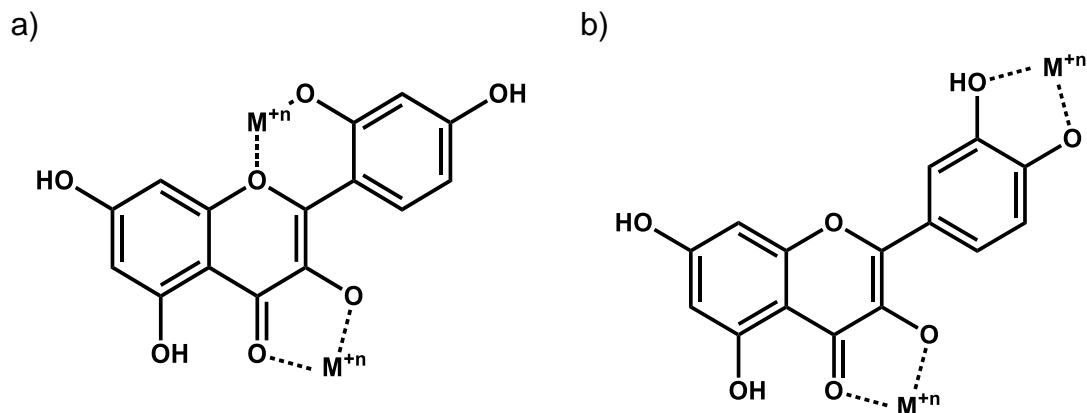


Figura 11. Posibles sitios de complejación para a) Morina; b) Quercetina

Se realizó la síntesis del complejo Morina – Cu para realizar estudios estructurales de este, que indicarán la posición en la que el metal se asocia al flavonoide. Se utilizó espectroscopía IR para la determinación de los posibles sitios de complejación. En la Figura 12 se observan los espectros IR obtenidos para la Morina y el complejo Morina – Cu. La asignación de las bandas principales del espectro se muestra en la Tabla 2. Es posible observar que la frecuencia $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo carboxilo cambia de 1663 cm^{-1} cuando no está complejado, a 1651 cm^{-1} cuando el flavonoide está asociado al metal. Se observan ligeros cambios en las bandas correspondientes a la deformación O – H y estiramiento C – O y la aparición de una nueva banda a 523 cm^{-1} que correspondería a la frecuencia $\nu(\text{M} - \text{O})$. Esta información obtenida del espectro daría cuenta de que la complejación ocurre entre el carbonilo de la posición 4 y uno de los grupos hidroxilo cercano, 3 – OH. La prevalencia de este grupo podría deberse a la formación de un anillo de 5 miembros, cuando la coordinación del metal ocurre

en este sitio, mientras que el otro hidroxilo cercano, 5 – OH, formaría un anillo de 6 miembros, a pesar de que su pK_a es mayor⁴⁵.

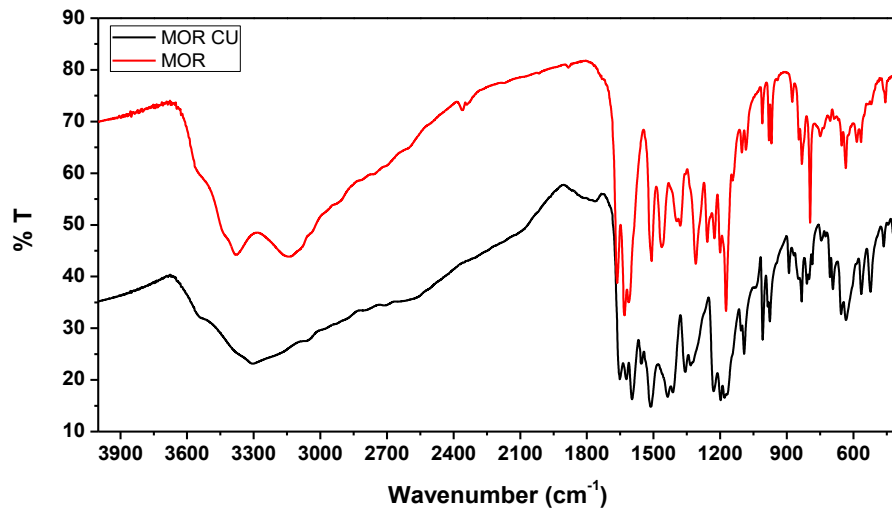


Figura 12. Espectros IR de Morina y Morina – Cu

Tabla 2. Asignación de frecuencias IR para Morina y Morina – Cu

| Grupo | Morina⁴⁴ / cm⁻¹ | Morina / cm⁻¹ | Morina – Cu / cm⁻¹ |
|--------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|
| Stretching | 3370 | 3378 | |
| OH | 3187 | 3142 | 3304 |
| Stretching | | | |
| C=O | 1662 | 1663 | 1651 |
| | 1629 | 1630 | 1621 |
| Stretching | 1613 | 1612 | 1596 |
| C=C | 1508 | 1508 | 1512 |
| | 1459 | 1463 | 1436 |
| Deformación | 1379 | 1379 | 1357 |
| C – OH | 1310 | 1309 | 1323 |
| | 1258 | 1257 | - |
| | 1227 | 1225 | 1229 |
| Stretching | 1201 | 1200 | 1197 |
| C – OH | 1174 | 1173 | 1169 |
| | 1104 | 1102 | 1106 |
| | 1085 | 1083 | 1092 |
| | 1011 | 1010 | 1008 |
| | 970 | | 976 |
| | 876 | 969 | 890 |
| | 796 | 875 | 785 |
| Deformación | 703 | 794 | 705 |
| C – H | 635 | 704 | 633 |
| | 585 | 634 | 587 |
| | 566 | 584 | 564 |
| | | 565 | |
| Stretching | | | |
| M – O | - | - | 523 |

Para los complejos de flavonoides con Ca^{+2} no se utilizó el método de Job, ya que el peak del complejo Morina – Ca se solapa con el peak de Morina, impidiendo observar las bandas de absorción sin interferencias, y el complejo Quercetina – Ca presenta una constante de asociación baja, que impide ver su formación a las concentraciones permitidas en el equipo de espectroscopía UV-Vis.

5.1.2. Determinación de la estequiometría de los complejos formados con ión Ca^{+2} y constantes de asociación de los complejos formados entre los flavonoides y metales

Mediante el método de Benesi – Hildebrand se determinó la estequiometría de los complejos Morina – Ca y Quercetina – Ca, y las constantes de asociación de los complejos Morina – Ca (K_{M-Ca}), Morina – Cu (K_{M-Cu}), Quercetina – Ca (K_{Q-ca}) y Quercetina – Cu (K_{Q-Cu}), utilizando metanol como solvente.

En la Figura 13 se muestran los cambios en el espectro de absorción de los flavonoides, cuando se aumenta la concentración de ión metálico. Se observa en todos los casos la aparición de una nueva banda de absorción a energía más baja, mientras que la banda I del flavonoide disminuye (Tabla 3). Si bien la banda II sufre cambios en presencia del ión metálico, estos son menos apreciables ya que se solapa, y por lo tanto no se consideran para las mediciones. La razón de

estos corrimientos es debido a la extensión de la conjugación en el sistema cuando el ión metálico se asocia al flavonoide, y darían cuenta del sitio de complejación de Ca^{+2} con los flavonoides, que corresponderían a los mismos observados para los complejos formados con Cu^{+2} (Fig. 8). Debe además tenerse en consideración que en todos los casos se observa un punto isobéptico, lo que sugiere la formación de un único complejo.

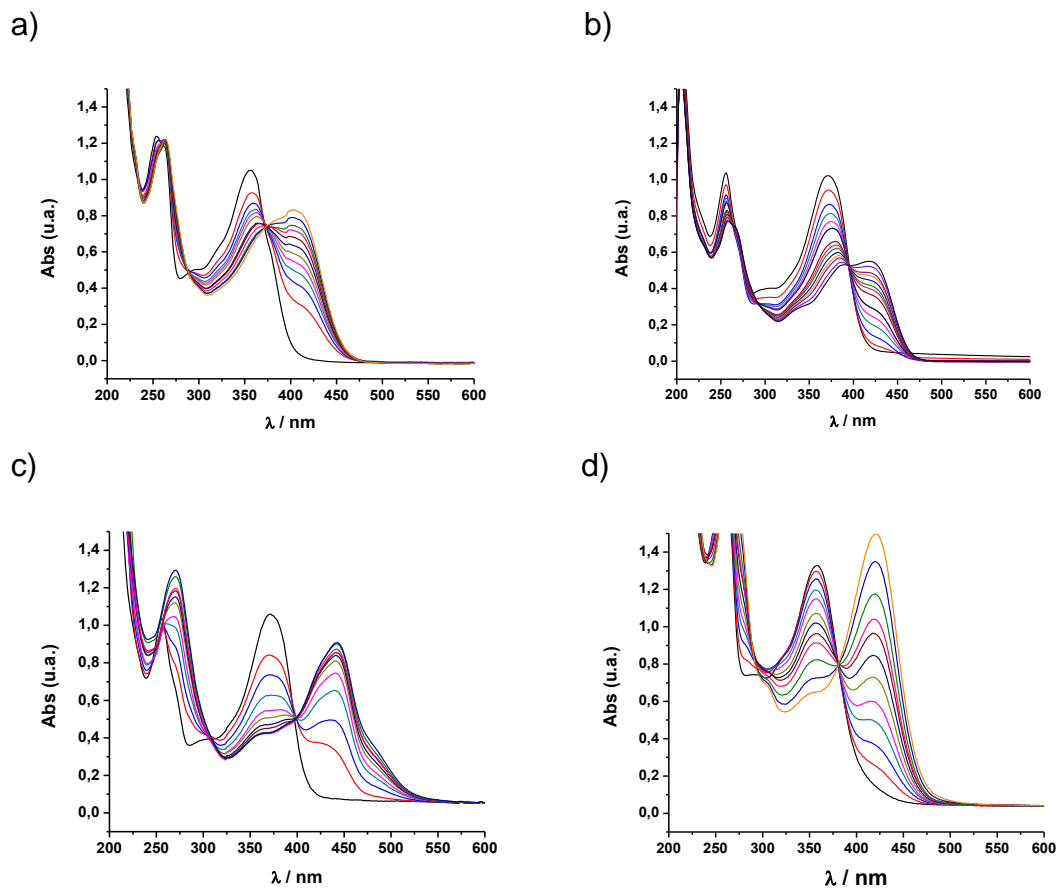


Figura 13. Espectros de absorción UV-Vis de flavonoides con adición de solución de ión metálico a) Morina – Ca; b) Quercetina – Ca; c) Quercetina – Cu; d) Morina – Cu

Tabla 3. Estequiometría y constantes de asociación de los complejos estudiados

| Complejo | Estequiometría | K_{FLA-M} | λ banda I / nm |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Morina – Ca | 1:1 | 322,4 M ⁻¹ | 407 |
| Morina – Cu | 2:1 | 1,80x10 ⁹ M ⁻² | 420 |
| Quercetina – Ca | 1:1 | 20,24 M ⁻¹ | 420 |
| Quercetina – Cu | 1:1 | 22076 M ⁻¹ | 441 |

Solvente metanol, 20°C

Con los datos obtenidos de los espectros de absorción UV-Vis se realizó un ajuste lineal según el método de Benesi – Hildebrand para estequiometrías 1:1 y 1:2, en los complejos estudiados con ión Ca⁺², obteniendo una mejor correlación para estequiometría 1:1 en ambos casos; la estequiometría de los complejos Morina – Cu y Quercetina – Cu se determinó previamente con el método de Job, por lo que solo se realizó el ajuste lineal según el método de Benesi – Hildebrand para estequiometría 1:1 y 2:1, respectivamente (Fig. 14). El valor de las constantes de asociación para cada complejo se muestra en la Tabla 3. Se puede observar que los complejos asociados a ión Ca⁺² presentan una constante de asociación menor en relación a los formados con ión Cu⁺², lo que se debería probablemente a las diferencias en electronegatividad de cada elemento, siendo para cobre 1,9 y para calcio 1,0. Al comparar las constantes respecto a los flavonoides, se observa que estas son mayores para Morina, mostrando mayor capacidad de complejación que la Quercetina, lo que puede dar cuenta de las

diferencias en la densidad electrónica de ambos flavonoides, a partir de un cambio en la posición de los grupos hidroxilo del anillo B.

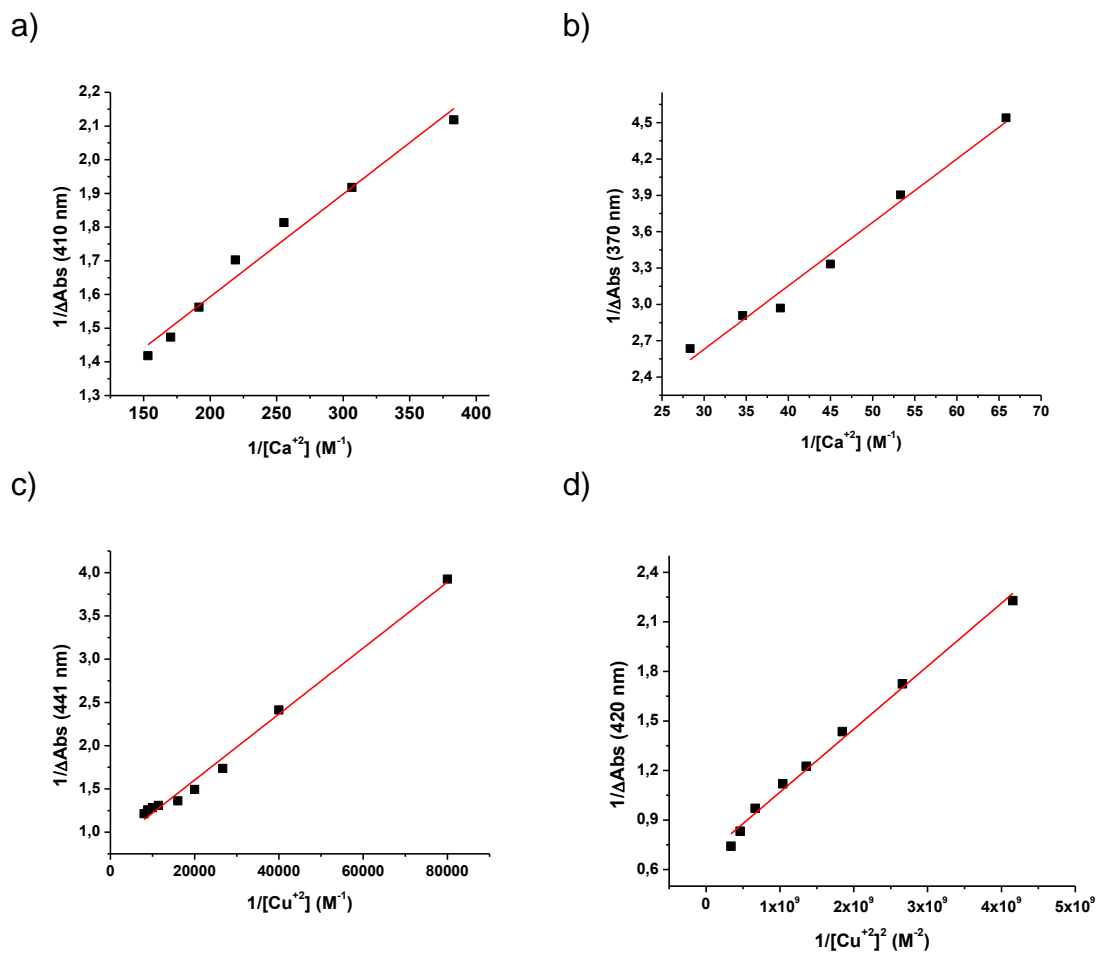


Figura 14. Gráfico de Benesi – Hildebrand para formación de complejos
a) Morina – Ca; b) Quercetina – Ca; c) Quercetina – Cu ; d) Morina – Cu

5.2. Evaluación de la constante de velocidad de reacción química, k_r , entre los flavonoides y $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de iones metálicos

Mediante fotólisis estacionaria, se determinó la constante de velocidad de reacción química entre los complejos Morina – Ca, Morina – Cu, Quercetina – Ca y Quercetina – Cu, y oxígeno molecular singulete, en metanol.

Se midió el consumo de los flavonoides y los complejos mediante espectroscopía UV-Vis a diferentes tiempos de radiación y se evaluaron las constantes de velocidad de reacción química. Para evaluar la concentración estacionaria de oxígeno molecular singulete, se realizó una actinometría con 9,10-dimetilantraceno (DMA), que presenta un valor para la constante de velocidad de reacción química con oxígeno molecular singulete en metanol de $k_{DMA}=4,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En la Figura 15 se muestran los espectros de absorción UV-Vis obtenidos para el consumo de los complejos, a diferentes tiempos de irradiación. Los datos obtenidos se tratan de acuerdo a una cinética de pseudo primer orden, y se realiza una regresión lineal para obtener el valor de la constante k_r . En la Figura 16 se muestran los gráficos obtenidos del tratamiento de datos para la reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con los complejos formados entre los flavonoides e iones metálicos.

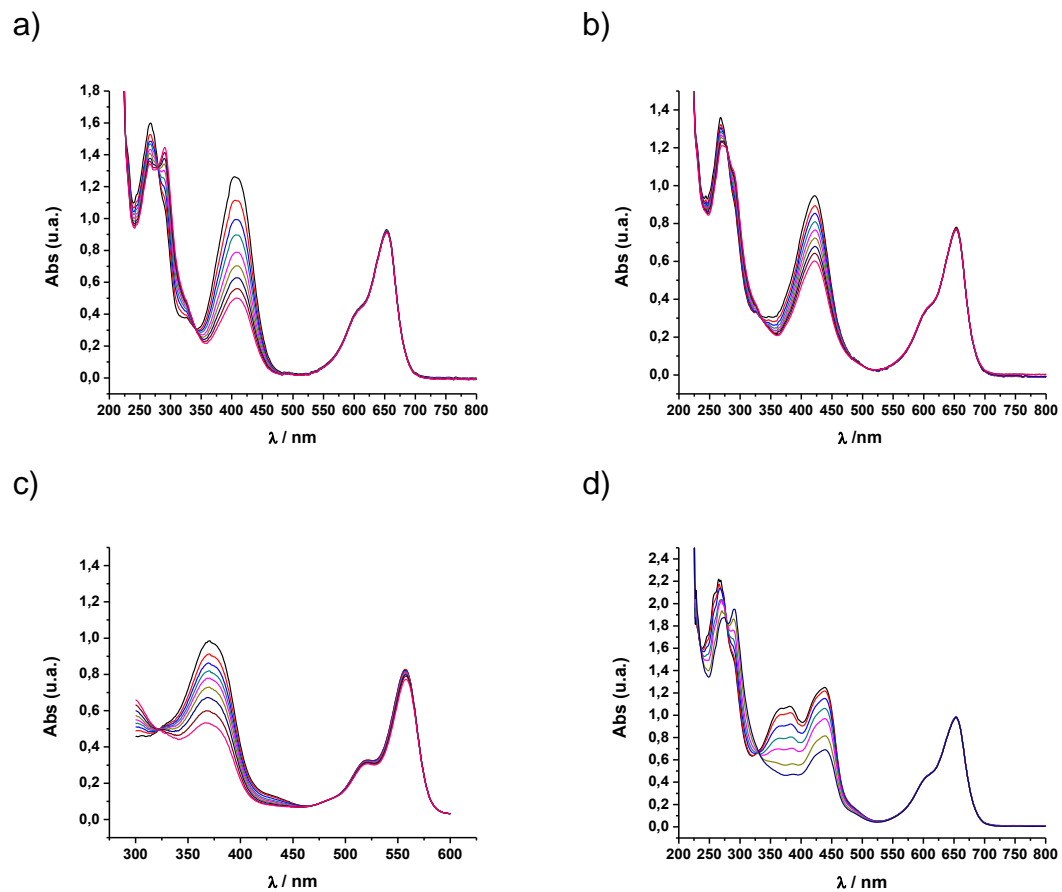


Figura 15. Espectros UV-Vis de la fotooxidación por $^1\text{O}_2$ a diferentes tiempos de fotólisis en metanol de a) Morina – Ca; b) Morina – Cu; c) Quercetina – Ca; d) Quercetina – Cu

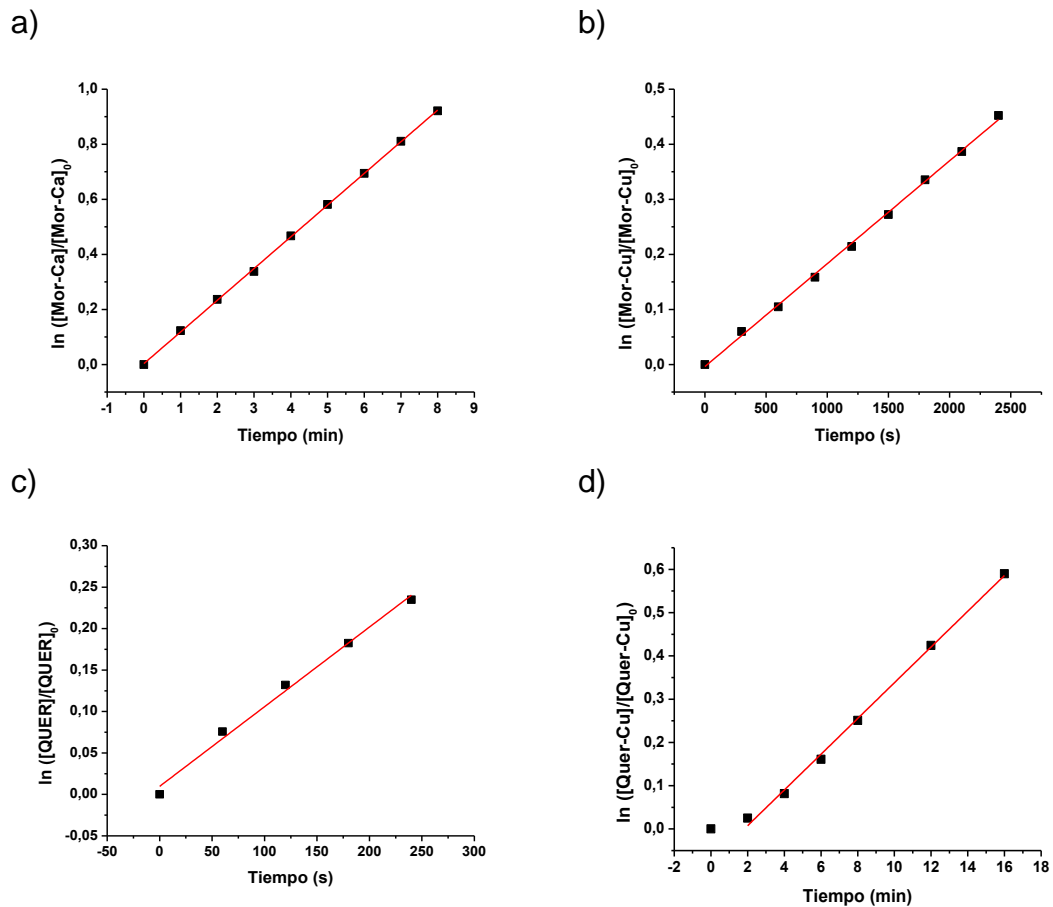


Figura 16. Gráficos del tratamiento de datos de la fotólisis estacionaria según cinética de pseudo primer orden para a) Morina – Ca; b) Morina – Cu; c) Quercetina – Ca; c) Quercetina – Cu. Todos los espectros se realizaron en metanol.

Tabla 4. Constante de velocidad de la reacción química, k_r , para flavonoides y complejos estudiados.

| Flavonoide | Ión metálico | $k_r / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ MeOH | R^2 |
|------------|------------------|---|--------|
| Morina | - | $1,01 \times 10^6$ | 0,9980 |
| | Ca^{+2} | $2,80 \times 10^7$ | 0,9997 |
| | Cu^{+2} | $1,07 \times 10^6$ | 0,9996 |
| Quercetina | - | $2,69 \times 10^5$ | 0,9962 |
| | Ca^{+2} | $1,89 \times 10^7$ | 0,9878 |
| | Cu^{+2} | $2,28 \times 10^7$ | 0,9990 |

Solvente metanol, 20°C

Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de reacción química entre los complejos flavonoide-metal y el oxígeno molecular singulete en metanol, se muestran en la Tabla 4. Es posible observar que, para los complejos Morina – Ca, Quercetina – Ca y Quercetina – Cu, el valor de la constante de reactividad química con oxígeno molecular singulete, aumenta entre uno y dos órdenes de magnitud aproximadamente, con respecto a los flavonoides sin complejar. El oxígeno molecular singulete es reconocido por su carácter electrofílico, por lo que el aumento en la reactividad podría tener origen en el aumento de la densidad electrónica en los sitios del flavonoide al encontrarse asociado al ión metálico, de acuerdo al aporte de electrones de estos, aumentando la reactividad con el oxígeno excitado. Por otra parte, es posible observar que el complejo Morina – Cu no presenta un aumento significativo en la reactividad con oxígeno molecular singulete respecto del flavonoide sin complejar, lo cual podría deberse a que en

la distribución de carga en el flavonoide, que se origina por interacción con el ión metálico, es menos importante por tratarse de un complejo 2:1.

Al complejar los flavonoides con Ca^{+2} , el aumento de la constante de reactividad es mayor en aproximadamente un orden de magnitud, en comparación con la complejación con Cu^{+2} , lo que podría resultar de la menor electronegatividad del Ca^{+2} , permitiendo a los electrones situarse en sitios reactivos de los flavonoides; mientras que el Cu^{+2} , por su carácter más electronegativo, no cedería los electrones tan fácilmente, impidiendo que se sitúen en sitios reactivos de los ligandos.

5.3. Evaluación de la constante de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, k_T , por los flavonoides en presencia de iones metálicos

Mediante espectroscopía resuelta en el tiempo, se determinó la constante de desactivación total de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, k_T , por los complejos Morina – Ca, Quercetina – Ca y Quercetina – Cu, en metanol.

Para evaluar k_T , fue necesario modificar la Ecuación de Stern – Volmer a un modelo que se ajustara linealmente respecto de la variación de la concentración del ión metálico, debido a que las mediciones se realizaron en el equilibrio entre los flavonoides y los iones metálicos (Fig. 17).

$$k_D = k_d + k_T^{Fla} [Fla] + k_T^{Fla-M} [Fla - M]$$

$$k_D - k_d = k_T^{Fla} [Fla] + k_T^{Fla-M} [Fla - M]$$

$$\frac{k_D - k_d}{k_T^{Fla} [Fla]} = 1 + \frac{k_T^{Fla-M} [Fla - M]}{k_T^{Fla} [Fla]}$$

$$\frac{k_D - k_d}{k_T^{Fla} [Fla]} = 1 + \frac{k_T^{Fla-M} [Fla - M]}{k_T^{Fla} [Fla]}$$

$$\frac{k_D - k_d}{k_T^{Fla} [Fla]} = 1 + \frac{k_T^{Fla-M} K_{Fla-M} [M]}{k_T^{Fla}}$$

Figura 17. Derivación de ecuación de Stern – Volmer modificada

En la Tabla 5 se puede observar el solvente y sensibilizador utilizado en los experimentos. Los datos obtenidos para el tiempo de vida de oxígeno molecular singulete, se trataron de acuerdo a la ecuación de Stern – Volmer modificada (Fig. 18). Los valores obtenidos se observan en la Tabla 6.

Tabla 5. Solvente y sensibilizador utilizados para las mediciones de las constantes de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$

| Flavonoide | Ión metálico | Solvente | Sensibilizador |
|------------|------------------|----------|----------------|
| Morina | - | MeOD | TPP Zn |
| | Ca ⁺² | MeOD | TPP Zn |
| Quercetina | - | MeOH | RB |
| | Ca ⁺² | MeOH | RB |
| | Cu ⁺² | MeOH | MB |

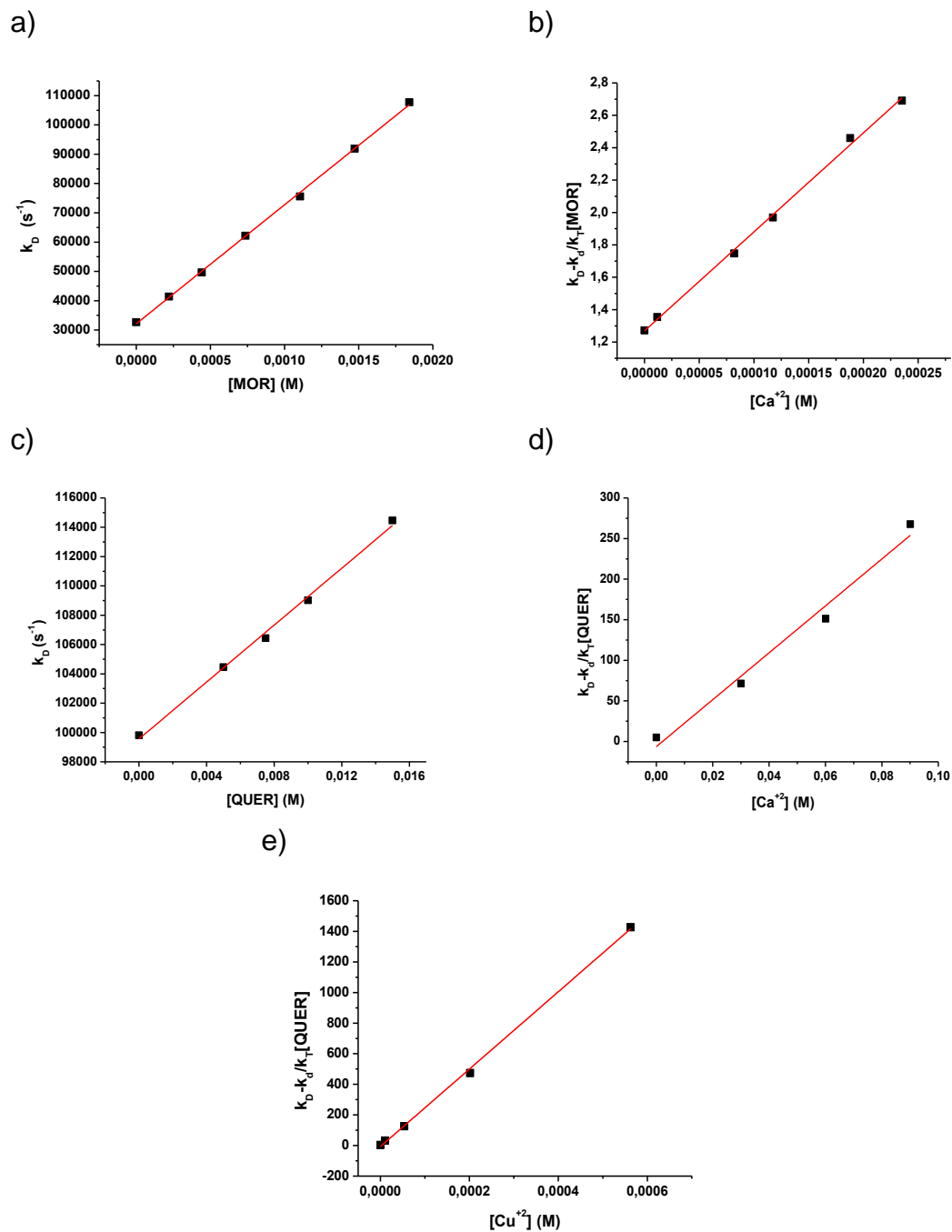


Figura 18. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por
a) Morina; b) Morina – Ca; c) Quercetina; d) Quercetina – Ca; e) Quercetina – Cu

Tabla 6. Constante de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ k_T por flavonoides y complejos de estequiometría 1:1 estudiados

| Flavonoide | Ión metálico | $k_T / M^{-1} s^{-1}$ MeOH | R^2 | $k_r / M^{-1} s^{-1}$ MeOH | $k_r/k_T / \%$ |
|------------|--------------|-------------------------------|--------|-------------------------------|----------------|
| Morina | - | $4,06 \times 10^7$ | 0,9991 | $1,01 \times 10^6$ | 2,48 |
| | Ca^{+2} | $7,77 \times 10^8$ | 0,9977 | $2,80 \times 10^7$ | 3,65 |
| Quercetina | - | $9,71 \times 10^5$ | 0,9954 | $2,69 \times 10^5$ | 27,74 |
| | Ca^{+2} | $1,38 \times 10^8$ | 0,9743 | $1,89 \times 10^7$ | 22,17 |
| | Cu^{+2} | $1,22 \times 10^8$ | 0,9988 | $2,28 \times 10^7$ | 18,67 |

Solvente metanol, 20°C

A partir de los valores obtenidos para la constante de desactivación total de oxígeno molecular singlete por los flavonoides y complejos estudiados, es posible observar que en todos los casos la desactivación total es mayor que la constante de reacción química, entre tres a cuarenta veces aproximadamente, lo cual muestra que la desactivación física es predominante tanto para los flavonoides como para los complejos formados con los iones metálicos. Los complejos presentan valores más altos para la constante de desactivación total de oxígeno molecular singlete en comparación con el flavonoide sin complejar, lo cual da cuenta de la mayor interacción entre este tipo de sustratos y el oxígeno excitado.

Tanto la Morina como el complejo Morina – Ca presentan porcentajes de reactividad química menores y valores de constante de desactivación total de oxígeno molecular singlete mayores, en comparación a la Quercetina y los

complejos estudiados, lo que muestra una predominancia por la desactivación a través de la vía física para estos compuestos. Sin embargo, los complejos estudiados con Quercetina muestran un mayor aumento en la desactivación total de oxígeno molecular singulete, en comparación al flavonoide sin complejar, demostrando cambios importantes en la densidad electrónica del flavonoide cuando está asociado a un ión metálico.

El complejo que presenta mayor desactivación total de oxígeno molecular singulete es Morina – Ca. También es posible observar que este muestra un aumento en la reactividad química en comparación al flavonoide sin complejar, no así los complejos estudiados con Quercetina, los cuales disminuyen el porcentaje de reactividad química cuando el flavonoide se asocia al metal. No se evaluó la constante de desactivación total de oxígeno molecular singulete por complejo Morina – Cu debido a que la ecuación de Stern – Volmer modificada para medir este valor solo es aplicable a complejos con estequiometría 1:1, mientras que este complejo presenta estequiometría 2:1, sin embargo, a partir del tiempo de vida obtenido en las mediciones a diferentes concentraciones en equilibrio, se observa un aumento discreto en comparación a los otros complejos, en la desactivación total de oxígeno molecular singulete, lo que da cuenta de cambios menores en la densidad electrónica de los sitios reactivos del flavonoide, reafirmando que cuando el metal está asociado a dos ligandos, su efecto sobre la reactividad del flavonoide es significativamente menor.

A partir del aumento en las constantes de desactivación total en los complejos estudiados, se propone que el sitio de complejación ocurre entre el carbonilo en la posición 4 y el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición 3, del anillo C. Al situarse en este sitio, el ión metálico se encuentra cercano al anillo C, otorgando la densidad electrónica sobre este anillo en particular, el cual ha sido identificado anteriormente como el sitio reactivo de este tipo de sustratos con oxígeno molecular singulete.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos para las diferentes moléculas estudiadas, se observa que los flavonoides Morina y Quercetina pueden formar complejos con iones metálicos, los que presentarán diferentes constantes de asociación y estequiometría, dependiendo de la sustitución del flavonoide y el ión metálico con el que interactúa.

Los valores de las constantes de velocidad de reactividad química, frente a oxígeno molecular singulete para los complejos estudiados, muestran un aumento para la asociación Morina – Ca, Quercetina – Ca y Quercetina – Cu, mientras que para Morina – Cu se obtuvo un valor cercano al flavonoide sin complejar.

Todos los complejos estudiados presentaron valores mayores en la constante de desactivación total del oxígeno molecular singulete. Solo para el complejo Morina – Cu no fue posible determinar el valor debido a la estequiometría de la asociación. La desactivación física es predominante en todos los casos y mayor en comparación al flavonoide sin complejar, siendo de interés debido a la recuperación de la molécula una vez que interactúa con oxígeno molecular singulete.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410
2. Sies, H. E. L. M. U. T. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*: 1-8
3. Grant, J. J., Loake, G. J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, 124(1): 21-30
4. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5): 779-795
5. Bayr, H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12): S498-S501
6. Houstis, N., Rosen, E. D., Lander, E. S. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440(7086): 944-948
7. 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
8. Waris, G., Ahsan, H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5(1): 14
9. Hayes, J. D., McLELLAN, L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4): 273-300
10. Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2): 335-344
11. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84

12. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160(1): 1-40
13. Aruoma, O. I. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2): 199-212
14. Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., Milner, J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9): 567-579
15. Giugliano, D. 2000. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 10(1): 38-44
16. 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
17. 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
18. 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
19. Ogilby, P. R., Foote, C. S. 1982. Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 104(7): 2069-2070
20. Rodgers, M. A. (1983). Solvent-induced deactivation of singlet oxygen: additivity relationships in nonaromatic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 105(20), 6201-6205
21. Schmidt, R. 1989. Influence of heavy atoms on the deactivation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 111(18): 6983-6987

22. Davies, M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3): 761-770
23. Ohloff, G. 1975. Singlet oxygen: A reagent in organic synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 43(3-4): 481-502
24. 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
25. DeRosa, M. C., Crutchley, R. J. 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233: 351-371
26. Clennan, E. L., Pace, A. 2005. Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron*, 61(28): 6665-6691
27. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2001. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6): 271-278
28. 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
29. Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E. 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 20(2): 187-210
30. Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4): 375-383
31. Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25(2): 383-385
32. Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3): 331-342
33. 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

34. Cook, N. C., Samman, S. 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2): 66-76
35. Bukhari, S. B., Memon, S., Tahir, M. M., Bhangar, M. I. 2008. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt–quercetin complex. *Journal of Molecular Structure*, 892(1): 39-46
36. Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Vladykovskaya, E. N., Korkina, L. G., Afanas'ev, I. B. A. 2001. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1): 129-137
37. Chen, W., Sun, S., Liang, Y., Song, J. 2009. Antioxidant property of quercetin–Cr (III) complex: The role of Cr (III) ion. *Journal of Molecular Structure*, 918(1): 194-197
38. Song, Y., Yang, P., Yang, M., Kang, J., Qin, S., Lü, B., Wang, L. 2003. Spectroscopic and voltammetric studies of the cobalt (II) complex of Morin bound to calf thymus DNA. *Transition Metal Chemistry*, 28(6): 712-716
39. 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): 47-53
40. Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M. T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A. M., Oliveros, E. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19(3): 205-215
41. Nagai, S., Ohara, K., Mukai, K. 2005. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9): 4234-4240
42. Ferrari, G. V., Montaña, M. P., Dimarco, F. C., Debattista, N. B., Pappano, N. B., Massad, W. A., García, N. A. 2013) A comparative photochemical study on the behavior of 3, 3'-dihydroxyflavone and its complex with La (III) as generators and quenchers of reactive oxygen species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124: 42-49
43. Morales, J., Günther, G., Zanocco, A. L., Lemp, E. 2012. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical–experimental study. *PLoS One*, 7(7): e40548.

44. Woźnicka, E., Kopacz, M., Umbreit, M., Kłós, J. 2007. New complexes of La (III), Ce (III), Pr (III), Nd (III), Sm (III), Eu (III) and Gd (III) ions with morin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(5), 774-782.
45. Kopacz, M. 2003. Quercetin-and morinsulfonates as analytical reagents. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(3), 225-229.
46. Sandoval A., C. 2012. Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete y flavonoides: efecto del medio. Memoria de Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.