

T. 309



Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

FOTOOXIDACIONES
SENSIBILIZADAS DE
COMPUESTOS DE
IMPORTANCIA BIOLÓGICA:
TETRACICLINAS Y
HORMONAS TIROIDEAS

Sandra Miskoski



CREER... CREAR... CRECER...

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Febrero de 2004



2004

59102

Director de Tesis:

Dr. Norman A. Garcia

Codirector de Tesis:

Dr. Arnaldo T. Soltermann

Miembros del Jurado:

Dra. Sonia G. Bertolotti

Dra. Juana Chessa

Dra. Rita Hoyos

A Laura y Mariano Antonelli



Agradecimientos

A Andi García, por dirigirme en la Tesis, por su confianza y paciencia y por acompañarme en los momentos importantes de mi vida.

A Colo Soltermann, codirector compañero y amigo. Por estar presente en todas las discusiones aportando importantes sugerencias.

A Sonia Bertolotti, Nita Chessa y Rita Hoyos, miembros del jurado y criteriosas asesoras.

A Germán Günther y Antonio Zanocco, de la Universidad de Chile, con quienes hice una pasantía en aquel país, aportaron sus conocimientos en la búsqueda de productos de reacción y resultaron cálidos anfitriones.

Al grupo del Dr Eduardo Sánchez de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por su aporte con los estudios microbiológicos.

Patricia Molina colaboró con las medidas electroquímicas.

A mis compañeros y amigos de la Universidad: Ana Novaira, Mariano Correa, Claudia Rivarola, Patricia Molina y Alicia Biasutti. Porque con ellos compartimos todos estos años alegrías y tristezas, logros y frustraciones y siempre estuvieron dispuestos a la hora de colaborar, opinar y cuestionar.

A Graciela Zanini, amiga y compañera de oficina durante los primeros tiempos.

A los amigos más recientes: Elisa Milanesio, Martín Broglia, Diego Acevedo, Mariano Bruno, Miguel Gervaldo, Lorena Gómez, Ariana Posadaz y Cristina Miras gente solidaria y divertida que estuvo ofreciendo ayuda siempre que hizo falta.

A los profesores, auxiliares y becarios, compañeros en la actividad docente, quienes me dispensaron de algunas tareas en estos días de febrero.

A mi amigo Carlitos Mas, quien desde Córdoba destinó parte de su tiempo para buscar y enviarme bibliografía de modo urgente, como se lo pedí.

A mi familia, por apoyarme y alentarme, especialmente a mi mamá, mi hermana y mis suegros quienes toman la responsabilidad diaria de cuidar a mis hijos para que pueda trabajar, estudiar o descansar.

A mi esposo, Víctor Antonelli y a mi papá, Leandro Miskoski quienes me dieron toda la fuerza y contención mientras vivieron.

A Mariano Antonelli, quien me acompañó y ayudó algunas tardes de enero en la confección de figuras en ChemWindows.

A docentes, no docentes y becarios del Dto de Química con quienes compartimos los momentos gratos y los difíciles.

A las instituciones, CONICET y al Dto de Química de mi querida Universidad Nacional de Río Cuarto por brindar el apoyo financiero y el espacio adecuado para poder llevar adelante esta Tesis.

RESUMEN

En el trabajo de Tesis se llevaron a cabo estudios cinéticos y mecanísticos de fotooxidaciones sensibilizadas de dos grupos de compuestos, ocho antibióticos con la estructura de tetraciclina (TCs) y hormonas tiroideas y compuestos estructuralmente relacionados (HTs).

Con respecto a los antibióticos, se determinaron constantes específicas de velocidad globales (k_t) y de reacción química (k_r) con oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$). Las determinaciones se llevaron a cabo en diversas condiciones de pH y solvente. La fotooxidación es rápida en soluciones alcalinas y menos agresiva en condiciones fisiológicas. Las eficiencias cuánticas de fotooxidación, evaluadas para las ocho tetraciclinas estudiadas, a través de detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$, métodos espectrofotométricos y polarográficos varían entre 0.12 y 0.65 como límite superior en medio alcalino. La fotooxidación procede esencialmente a través de un proceso mediado por $O_2(^1\Delta_g)$ empleando rosa de bengala o eosina como sensibilizadores. Sin embargo, el estado triplete del sensibilizador interactúa con TCs, constituyendo un camino competitivo con la generación de $O_2(^1\Delta_g)$. La fotooxidación mediada por $O_2(^1\Delta_g)$ aparece como un mecanismo aceptable para explicar las fototransformaciones en medios biológicos, en presencia de pigmentos que absorben luz visible. También se investigó el rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) por TCs por irradiación directa. Poseen muy bajos valores de Φ_Δ , sin embargo, el fotoproducto de tetraciclina, obtenido por irradiación directa, genera $O_2(^1\Delta_g)$ eficientemente, con $\Phi_\Delta = 0.24$. Este hallazgo constituye la primera evidencia directa de fotosensibilización de Tipo II por los fotoproductos de tetraciclina y podría contribuir a la elucidación del mecanismo de fototoxicidad de TCs.

Con respecto al grupo de hormonas tiroideas y compuestos relacionados (HTs), se estudió su fotooxidación empleando Rosa de Bengala, Eosina y Perinaftena como sensibilizadores. Con los colorantes xanténicos se encuentra una mezcla de procesos competitivos cuando se irradian en presencia de HTs, que incluyen el estado excitado triplete del sensibilizador y reacciones mediadas por $O_2(^1\Delta_g)$. Las constantes de interacción con el estado triplete excitado del colorante, atribuidas a un proceso de transferencia de electrones son del orden de 10^8 - 10^9 , dependiendo del sensibilizador y del sustrato particular.

La fotosensibilización empleando perinaftena obedece a un mecanismo de Tipo II (mediado por $O_2(^1\Delta_g)$) puro. La presencia del grupo fenólico y de los átomos pesados dominan las características cinéticas de fotooxidación de HTs. Las constantes de velocidad de reacción (k_r) disminuyen con el aumento en el potencial de oxidación de los compuestos, sin embargo las constantes de velocidad de inhibición globales (k_t) se comportan de un modo opuesto, esta inconsistencia aparente se podría interpretar sobre las bases de un efecto de átomo pesado, favoreciendo la ruta de desactivación por cruce intersistema dentro del complejo de encuentro y reduciendo la fotooxidación efectiva.

ABSTRACT

In this thesis work an exhaustive sensitized photooxidation study were performed on two kind of compounds: eight antibiotics with the tetracycline moiety (TCs) and thyroid hormones and related compounds (HTs).

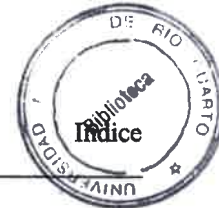
Regarding to the antibiotics, it was found that they suffer visible-light-promoted photodynamic degradation in different extents, depending on their respective chemical structures and reaction conditions (solvent polarity and pH). The photooxidation is accompanied by a partial loss of the antimicrobial power. The photodamage is very fast in alkaline ranges and less aggressive, although not negligible in kinetic terms, in the physiological region. Photo-oxidation quantum efficiencies, evaluated for eight TCs, through singlet molecular oxygen phosphorescence detection, spectrophotometric and polarographic methods, range from 0.12 to 0.65 as upper limits in alkaline medium. The photooxidation essentially proceeds via a $O_2(^1\Delta_g)$ - mediated process, with rose bengal or eosine as dye-sensitizers. Nevertheless, the triplet state of the dye sensitizers interacts with TCs in a competitive process with $O_2(^1\Delta_g)$ generation. The $O_2(^1\Delta_g)$ -mediated photooxidation of TCs appears to be a plausible mechanism to account for their phototransformations in biological media, in the presence of visible-absorbing pigments. The quantum yields for $O_2(^1\Delta_g)$ generation (Φ_Δ) by TCs, upon direct photoirradiation, has also been investigated. This family of compound possesses extremely poor Φ_Δ values. Nevertheless, the tetracycline photoproduct, formed through direct irradiation, efficiently generates $O_2(^1\Delta_g)$ with $\Phi_\Delta = 0.24$. This finding constitutes the first direct evidence of Type II sensitization by TCs photoproducts, and could contribute to the elucidation of the mechanism of TCs phototoxicity.

On the other hand, the photooxidation of hormones of the tyronine family and structurally compounds (Tyronine, 3,5-diiodotyronine, 3,3',5-triiodotyronine and 3,3',5,5'-tetraiodotyronine or Tyroxine), was studied employing rose bengal, eosine and perinaphthenone as dye-sensitizers. Tyrosine and two iodinated derivatives (3-iodotyrosine and 3,5-diiodotyrosine) were also included in the study for comparative purposes.

The irradiation of the ultraviolet-absorbing substrates with visible light, in the presence of the xanthene dyes, triggers a complex picture of competitive interactions that include the triplet excited state of the dye and $O_2(^1\Delta_g)$ -mediated reactions. The rate constants for the interaction with the excited triplet dye, attributed to an electron transfer process, are in the order of 10^8 - 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ depending on the dye and the particular substrate. The photosensitization employing Perinaphthenone obeys to a pure Type II ($O_2(^1\Delta_g)$ -mediated) mechanism. The presence of the phenolic group in Tyrosine y Tyronine and of heavy atom in the iodinated derivatives dominates the kinetic characteristics of the photooxidation of these compounds. The reaction rate constants k_r diminishes upon the increase on the oxidation potential's of the compounds. Curiously, the overall rate constants, k_t , behave in an opposite fashion than k_r . This apparent inconsistency was interpreted on the basis of an heavy atom effect, favouring the intersystem crossing deactivation route within the encounter complex and concomitantly reducing the effective photooxidation.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION.....	1
Objetivos del trabajo de tesis.....	3
Referencias.....	4
2. CONSIDERACIONES TEORICAS.....	5
2.1 La molécula de oxígeno.....	5
2.2 El estado singlete sigma.....	6
2.3 El estado singlete delta ($^1\Delta_g$).....	6
2.3.1 Tiempos de vida.....	7
2.3.2 La generación de $O_2(^1\Delta_g)$	8
2.3.2.1 Generación fotolítica.....	8
2.3.2.2 Fuentes químicas.....	9
2.3.2.3 Otras fuentes de $O_2(^1\Delta_g$ ó $^1\Sigma_g^+$).....	10
2.4 El proceso de fotosensibilización.....	11
2.4.1 Clasificación de los procesos fotosensibilizados.....	13
2.4.2 Factores que controlan las fotooxigenaciones de Tipo II.....	14
2.4.3 Discriminación entre procesos de Tipo I y Tipo II.....	15
2.4.4 La elección del fotosensibilizador.....	16
2.4.5 Sensibilizadores empleados en el trabajo de tesis.....	18
2.5 Procesos de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$	20
2.6 Antecedentes de los compuestos estudiados en esta tesis.....	26
2.6.1 Tetraciclinas.....	26
2.6.2 Hormonas tiroideas y compuestos químicamente relacionados.....	30
Referencias.....	33
3. MATERIALES Y METODOS.....	37
3.1 Reactivos y solventes.....	37
3.2 Preparación de soluciones.....	37
3.3 Equipos.....	38
3.4 Métodos.....	42



3.4.1 Medidas de velocidades de reacción.....	42
3.4.2 Determinación de las constantes de velocidad reactivas de los sustratos con $O_2(^1\Delta_g)$ (k_r).....	44
3.4.3 Determinación de constantes de velocidad globales de desactivación de oxígeno singlete (k_t).....	46
3.4.4 Efecto de pH sobre las constantes de velocidad reactivas.....	47
3.4.5 Estequiometría de la reacción.....	47
3.4.6 Determinación de las constantes de inhibición del estado triplete excitado del sensibilizador por los sustratos (k_q^T).....	48
3.4.7 Determinación de rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ ($\Phi\Delta$).....	48
3.4.8 Determinación de la reactividad de grupos amino primarios.....	50
3.4.9 Determinación de potenciales de oxidación de media onda.....	51
3.4.10 Análisis microbiológico.....	51
Referencias.....	53
4. TETRACICLINAS: RESULTADOS.....	54
4.1 Estructura química.....	54
4.2 Selección del sensibilizador.....	55
4.3 Fotólisis en estado estacionario.....	55
4.3.1 Consumo de sustrato.....	55
4.3.2 Consumo de oxígeno.....	56
4.4 Estequiometría de la reacción.....	57
4.5 Discriminación entre procesos de Tipo I y Tipo II.....	58
4.5.1 Efecto de la presencia de NaN_3 sobre la velocidad de consumo de O_2	58
4.5.2 Efecto de superóxidodismutasa sobre la velocidad de consumo de O_2	59
4.5.3 Fotólisis estacionaria en ausencia de O_2	60
4.6 Técnicas resueltas en el tiempo.....	61
4.6.1 Interacciones con el sensibilizador.....	61
4.6.2 Interacciones con $O_2(^1\Delta_g)$	63
4.7 Constantes de velocidad globales y reactivas con $O_2(^1\Delta_g)$	63

4.7.1	Constantes de interacción global entre TCs y $O_2(^1\Delta_g)$	64
4.7.2	Constantes de interacción reactiva de TCs con $O_2(^1\Delta_g)$	64
4.8	Efecto de pH.....	67
4.9	Rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ por TCs y sus productos de fotooxidación...69	69
4.10	Análisis microbiológico.....	71
5.	TETRACICLINAS: DISCUSION.....	72
6.	HORMONAS TIROIDEAS: RESULTADOS.....	76
6.1	Coefficientes de extinción molar.....	77
6.2	Interacciones con $O_2(^1\Delta_g)$	77
6.2.1	Constantes de interacción global (k_1).....	77
6.3	Fotólisis en estado estacionario.....	79
6.3.1	Consumo de O_2 a bajas conversiones.....	79
6.3.2	Efecto de azida de sodio.....	79
6.4	Interacciones con los sensibilizadores.....	80
6.4.1	Experiencias resueltas en el tiempo.....	80
6.4.2	Interacciones en el estados fundamental entre TNs y los sensibilizadores.82	82
6.4.3	Fotólisis en ausencia de O_2	82
6.5	Estequiometría de la reacción.....	83
6.6	Constantes de interacción reactiva con $O_2(^1\Delta_g)$	84
6.7	Fotólisis estacionaria a altas conversiones de reactivos.....	85
6.8	Consumo de grupo amino.....	87
6.9	Algunos estudios de los productos de fotooxidación sensibilizada de HTs.....	87
6.10	Potenciales de oxidación de media onda.....	89
7-	HORMONAS TIROIDEAS: DISCUSION.....	92
	Referencias.....	99
8-	CONCLUSIONES.....	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Señal típica del decaimiento de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm	46
Figura 4.1: Estructura química de las tetraciclinas estudiadas	54
Figura 4.2: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada con RB en agua, NaOH 10 mM.....	56
Figura 4.3: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada con RB en agua a pH 7.....	56
Figura 4.4: Velocidad de consumo de oxígeno por fotólisis sensibilizada con Eo de Tet en solución acuosa de NaOH de pH 11,6 y buffer de pH 7.....	58
Figura 4.5: Gráficos de primer orden para el consumo de oxígeno por Tet y FFA en presencia y ausencia de NaN_3	59
Figura 4.6: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada por RB en solución acuosa de NaOH 10 mM en ausencia de oxígeno.....	60
Figura 4.7: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada por RB en presencia de oxígeno.....	61
Figura 4.8: Decaimiento de la absorción del estado triplete excitado de RB en ausencia y presencia de Tet.....	62
Figura 4.9: Gráfico de Stern Volmer para la inhibición del triplete excitado de RB por Tet en solución acuosa de NaOH 10 mM.....	62
Figura 4.10: Decaimiento de la señal de oxígeno singlete sensibilizada por RB en ausencia y presencia de Min.....	63
Figura 4.11: Gráficos de Stern Volmer para la inhibición oxígeno singlete por Min, Tet y Met en solución acuosa de NaOH 10 mM.....	64
Figura 4.12: Gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por Clo, Met y FFA en solución acuosa de NaOH 10 mM.....	65
Figura 4.13: Gráficos de primer orden para el consumo de Dem, Tet y DMA en MeCN MeOH 8:2 con NaOH 10 mM.....	66
Figura 4.14: Efecto de pH sobre k_r de Tet, Dem y fenol en agua.....	68
Figura 4.15: Espectro de absorción de Tet antes y después de fotolizar 150 minutos mediante irradiación directa.....	70

Figura 4.16: Intensidad de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ en función de la fracción de luz absorbida por PR y el compuesto de referencia, (RB).....	70
Figura 4.17: Disminución de la concentración de Tet y disminución de la actividad antimicrobiana por fotooxidación de Tet sensibilizada por RB.....	71
Figura 6.1: Estructura química de las hormonas tiroideas y compuestos estructuralmente relacionados (HTs).....	76
Figura 6.2: Decaimiento de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia y presencia de T4 7×10^{-2} mM.....	78
Figura 6.3: Gráficos de Stern Volmer para la inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por T4 y Tyr en D_2O , NaOH 10mM.....	78
Figura 6.4: Gráficos de primer orden de consumo de O_2 por MITyr, T3 y FFA en agua, NaOH 10 mM.....	79
Figura 6.5: Consumo de O_2 con y sin azida de sodio en agua, NaOH 10 mM por TN y FFA. Sensibilizador: RB.....	80
Figura 6.6: Efecto de la presencia de T4 sobre el tiempo de vida de $^3RB^*$	81
Figura 6.7: Gráfico de Stern Volmer para la inhibición de $^3Eo^*$ por TN en agua, NaOH 10mM.....	82
Figura 6.8: Consumo de DITyr en presencia de O_2 . Sensibilizador: PN. Solvente: agua, NaOH 10 mM.....	83
Figura 6.9: Consumo de DITyr en ausencia de O_2 . Sensibilizador: PN. Solvente: agua, NaOH 10 mM.....	84
Figura 6.10: Consumo de O_2 por T4 a altas conversiones.....	86
Figura 6.11: Consumo de T4 a altas conversiones.....	86
Figura 6.12: Consumo del grupo amino de T3, T4 y Tyr por fotólisis sensibilizada con RB en agua, NaOH 10 mM.....	87
Figura 6.13: Voltagrama de barrido lineal de T4 en agua, NaOH 10 mM.....	90
Figura 6.14: Corriente convolucionada correspondiente al voltagrama de la figura 6.13.....	90
Figura 6.15: Potencial de oxidación vs. Y. Gráfico resultante del análisis de los datos por el método semiintegral.....	91

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Estados electrónicos de oxígeno molecular y sus propiedades.....	6
Tabla 4.1: Relación estequiométrica entre el consumo de oxígeno y de sustrato para cada compuesto.....	57
Tabla 4.2: Constantes reactivas, globales y eficiencia reactiva de interacción de TCs con oxígeno singlete en solución acuosa de NaOH 10 mM.....	67
Tabla 4.3: Constantes reactivas, globales y eficiencia reactiva de interacción de TCs con oxígeno singlete en Acetonitrilo:Metanol 8:2 v/v con NaOH 10 mM.....	67
Tabla 4.4: Valores de pK para los grupos ácidos de TCs.....	69
Tabla 6.1: Coeficientes de extinción molar de HTs en soluciones acuosas y de acetonitrilo metanol 8:2 con NaOH 10 mM.....	77
Tabla 6.2: Constantes de inhibición de estados triplete excitados de Eo y RB por TN y T4.....	81
Tabla 6.3: Constantes de velocidad reactivas y globales para Tyrs en solución acuosa de Na OH 10 mM.....	84
Tabla 6.4: Constantes de velocidad reactivas y globales para TNs en solución acuosa de NaOH 10 mM.....	85
6.5: Potenciales de oxidación de media onda para TNs.....	89

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Clo	Clorotetraciclina
Dem	Demeclociclina
DITyr	3,5-diiodotirosina
DMA	9,10-dimetilantraceno
Doxi	Doxiciclina
$E_{1/2}$	Potencial de oxidación de media onda
ECS	Electrodo de calomel saturado
Eo	Eosina
FFA	Alcohol furfurílico
HTs	Grupo de compuestos constituido por Tyrs y TNs
k_d	Constante de decaimiento natural de un estado excitado
k_{dif}	Constante de velocidad difusional
k_q^T	Constante de velocidad de inhibición de estados triplete
k_r	Constante de velocidad de reacción química con oxígeno singlete
k_{SV}	Constante de Stern Volmer
k_t	Constante de inhibición total de oxígeno singlete
k_{TE}	Constante de velocidad de transferencia de energía
Met	Metaciclina
Min	Minociclina
MITyr	3-iodotirosina
Oxi	Oxitetraciclina
PN	Perinaftenona
PR	Producto rojo
RB	Rosa de Bengala
Rol	Rolitetraciclina
SOD	Superóxidodismutasa
T2	3,5-diiodotironina
T3	3,3',5-triiodotironina
T4	3,3',5,5'-tetraiodotironina (Tiroxina)
TCs	Tetraciclinas (todos los componentes del grupo)

Tet	Tetraciclina
TN	Tironina
TNs	Tironina y derivados iodados
TRPD	Detección de fosforescencia resuelta en el tiempo
Tyr	Tirosina
Tyrs	Tirosina y sus derivados iodados
τ	Tiempo de vida media
$\Phi\Delta$	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete



1 INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se están llevando a cabo numerosas investigaciones relacionadas con la interacción de la luz con compuestos de importancia biológica y farmacológica.¹⁻⁵ Esto se debe a que diversos sustratos importantes en esta área pueden sufrir fotodescomposición y conducir a la formación de especies que sean tóxicas o que no produzcan la acción terapéutica deseada. Por otra parte, una vez incorporados al organismo aquellos medicamentos potencialmente fotooxidables, frente al encuentro de especies altamente oxidantes, como lo son oxígeno singlete y el anión superóxido, pueden sufrir procesos de degradación que conduzcan a efectos adversos. En otros casos el propio medicamento puede actuar como fotosensibilizador.^{6, 7} Lo mismo se puede decir en el caso de compuestos naturalmente presentes en el organismo.

Es por lo expuesto que el estudio de fotosensibilización por drogas y su fotoestabilidad es tema de gran interés para fotoquímicos y fotobiólogos.

Fotosensibilización es el proceso en el cual un compuesto (el sensibilizador) absorbe energía UV o visible y a partir de sus estados excitados, por interacción con otras sustancias, genera especies potencialmente reactivas frente a diversos sustratos.⁸

La acción fotodinámica describe la oxidación de moléculas biológicamente importantes (sustratos), por iluminación de un sensibilizador apropiado en presencia de oxígeno molecular. Estos eventos conducen a un daño, transitorio o permanente en los tejidos celulares.⁹

La oxigenación fotosensibilizada (o fotooxidación sensibilizada) de olefinas, dienos, compuestos heterocíclicos, algunas vitaminas, aminoácidos y proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y muchos otros compuestos de interés biológico, ha sido, y sigue siendo ampliamente estudiada y se ha demostrado que proceden a través de reacciones con oxígeno singlete.¹⁰⁻¹⁴

De esto se desprende que una extensa variedad de medicamentos y hormonas son susceptibles a la acción fotodinámica, ya que la existencia de sitios reactivos frente a oxígeno singlete y/o anión superóxido depende de los grupos funcionales que contengan las moléculas.

Por lo tanto, el conocimiento de las eficiencias reactivas, los mecanismos de fotooxidación, los efectos de solvente y de pH constituyen importantes aportes en el

campo de la medicina y la fotobiología, sobre todo desde el punto de vista del efecto fotodinámico.

Dentro de este marco, se escogió para este trabajo de tesis llevar a cabo un estudio sobre los potenciales procesos fotooxidativos que puedan ocurrir para dos familias de medicamentos y compuestos de interés biológico, que por sus características estructurales son candidatos a sufrir modificaciones provocadas por luz, y que puedan alterar sus funciones biológicas específicas. Estos compuestos son antibióticos del grupo de tetraciclinas y hormonas de las glándulas tiroideas.

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro de uso bastante difundido aún en la actualidad, tanto en medicina humana como veterinaria.

Absorben luz en la región UV del espectro, de modo que en condiciones normales de iluminación ambiental no se espera que sucedan procesos fotoinducidos de importancia, aunque se han informado casos de fotosensibilidad humana con algunas de ellas.¹⁵

Con respecto a las hormonas tiroideas, participan en el metabolismo basal del organismo, se sintetizan en la glándula tiroidea a partir del aminoácido tirosina e iodo inorgánico, su carencia conduce a hipotiroidismo y su terapéutica consiste en la administración de la hormona, generalmente por vía oral.

Estas hormonas son aminoácidos fenólicos iodados derivados de la tironina. Presentan el tipo de características espectrales ya mencionadas para las tetraciclinas.

Ambos grupos de compuestos, tetraciclinas y hormonas tiroideas son blanco de ataque para $O_2(^1\Delta_g)$ debido a la presencia de grupos fenólicos, entre otros, en su estructura.

Se encuentra en literatura una gran cantidad de estudios sobre fotoprocesos aeróbicos y anaeróbicos sensibilizados que operan sobre derivados fenólicos. Estos compuestos, en general, sufren oxidaciones en solución, mediadas por luz visible. Uno de los principales mecanismos de fotooxidación sensibilizada de fenoles es el proceso mediado por oxígeno singlete.¹⁶⁻¹⁹

Se sabe que los efectos de polaridad de solvente, temperatura y pH influyen sobre las constantes de velocidad de fotooxidación de estos compuestos.^{20 21}

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

El objetivo de esta Tesis es estudiar el daño fotooxidativo que se le ocasiona a derivados fenólicos de importancia medicinal/biológica, sometido a condiciones de irradiación lumínica similares a las de su medio ambiente natural.

Se trabaja concretamente sobre tetraciclinas y hormonas tiroideas, evaluando la cinética y mecanismos de los eventos fotooxidativos, especialmente las condiciones ambientales que favorecen o inhiben dicha descomposición.

REFERENCIAS

- ¹ C. Tournaire, S. Croux, M.T. Maurette, I. Beck, M. Hocquaux, A. M. Braun and E. Oliveros. *J. Photochem. Photobiol.* 19, (1993), 205.
- ² Y. Fu, C. Sheu, T. Fujita and C.S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 63, (1996), 615.
- ³ R.P. Hickerson, F. Pratt, J.G. Muller, C.F. Foote and C.J. Burrows. *J. Am. Chem. Soc.* 121, (1999), 9423.
- ⁴ P. Bilski, L. J. Martinez, E. B. Koker and F. Chignell. *Photochem. Photobiol.* 64, (1996), 496.
- ⁵ L. A. Matínez, A. M. Braun and E. Oliveros. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 45, (1998), 103.
- ⁶ I. Petters, D. Peng, A. Rane. *J. Chromatography.* 306, (1984), 241.
- ⁷ A. L. Zanocco, G. Günther S., E. Lemp M., J.R. de la Fuente and N. Pizarro U. *Photochem. Photobiol.* 68, (1998), 487.
- ⁸ I. E. Kochevar, C. R. Lambert, M. C. Linch and A. C. Tedesco. *Biochim. Biophys. Acta.* 1280, (1996), 223.
- ⁹ F. Rizzuto and J. D. Spikes. *Photochem. Photobiol.* 25, (1977), 465.
- ¹⁰ G. W. Grams, K. Eskins and G. E. Inglett. *J. Am. Chem. Soc.* 94, (1972), 866.
- ¹¹ R. H. Bisby, C. g. Morgan, I. Hamblett and A. Gorman. *J. Phys. Chem. A.* 103, (1999), 7454.
- ¹² M.A. Biasutti, A.T. Soltermann and N.A. García. *J. Peptide Res.* 55, (2000), 41.
- ¹³ C. Plato, C. Lee and M.A.J. Rodgers. *Photochem. Photobiol.* 45, (1987), 79.
- ¹⁴ L.O. Klotz, K.D. Kröncke and H. Sies. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, (2003), 88.
- ¹⁵ E. Stempel and R. Stempel, *J. Am. Pharm. Assoc. NS13.* (1973), 200.
- ¹⁶ R. Gerdes, D. Wöhle, W. Spiller, G. Schneider, G. Schnurpfeil and G. Schulz-Ekloff. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 111, (1997), 65.
- ¹⁷ T. Matsuura, N. Yoshimura, A. Nishinaga and I. Saito. *Tetrahedron.* 28, (1972), 4933.
- ¹⁸ C.S. Foote, M. Thomas and T.Y. Ching. *Photochem. Photobiol.* 5, (1976), 172.
- ¹⁹ K. I. Okamoto, F. Hondo, A. Itayamand, and S. Kusabayashi. *J. Chem. Eng. Jpn.* 15, (1982), 368.
- ²⁰ N.A. García. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 22, (1989), 185.
- ²¹ M. J. Thomas and C. S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 22, (1977), 683.

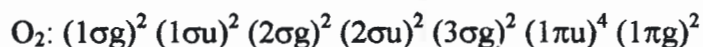
2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS.

Los procesos de fotooxidación sensibilizada incluyen la participación de un colorante que actúe como sensibilizador, oxígeno molecular y luz, además del sustrato fotooxidable. Es por ello que es conveniente comenzar esta sección haciendo una descripción de cada uno de los componentes mencionados.

Primero se hará un análisis de la molécula de oxígeno en sus estados fundamental y excitados y sus propiedades en distintos medios. Los métodos de generación de los estados excitados de menor energía de oxígeno, particularmente el proceso de fotosensibilización y las condiciones que debe reunir un compuesto para que sea empleado como sensibilizador. También se describirán los distintos mecanismos de fotooxidación. Finalmente se presentarán antecedentes bibliográficos y características de los compuestos estudiados en esta Tesis.

2.1 La molécula de oxígeno.

La configuración electrónica de esta molécula es la que se presenta a continuación:



Como se puede apreciar, su par de orbitales moleculares más altos ocupados son doblemente degenerados, de carácter π , con sólo dos electrones.

Esta configuración electrónica da origen a tres estados electrónicos que cumplen con el principio de exclusión de Pauli, los cuales se representan por su simetría y multiplicidad de acuerdo con la teoría de grupos.

El estado fundamental de O_2 presenta momento angular cero alrededor del eje internuclear (estado Σ) y, de acuerdo con la regla de Hund, multiplicidad de spin tres, es decir que es un triplete ($^3\Sigma_g^-$).

Los dos estados electrónicamente excitados de menor energía se originan de la misma configuración electrónica, esto es, no involucran promoción de electrones a orbitales de mayor energía, y son los estados $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$ con energías de punto cero de 95 y 158 kJ respectivamente sobre el estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$).¹

En la tabla 2.1 se presentan algunas propiedades de los tres estados electrónicos de oxígeno molecular mencionados.

Tabla 2.1: Estados electrónicos de oxígeno molecular y sus propiedades²

Molécula de oxígeno	Configuración de los electrones de los O.M. más altos ocupados	Energía relativa (kJ/mol)	Tiempos de vida (s)	
			Fase gaseosa	Fase líquida
Segundo estado excitado $O_2(^1\Sigma_g^+)$	$\uparrow \quad \downarrow$	158	7-12 ^a	10^{-11} - 10^{-9}
Primer estado excitado $O_2(^1\Delta_g)$	$\uparrow \downarrow \quad \text{---}$	95	2700 ^a	10^{-6} - 10^{-3} ^b
Estado fundamental $O_2(^3\Sigma_g^-)$	$\uparrow \quad \uparrow$	0	∞	∞

a: tiempos de vida radiativos intrínsecos. b: valores altamente dependientes del solvente.

2.2 El estado singlete sigma.

El estudio del estado $^1\Sigma_g^+$ puede suministrar información importante acerca del mecanismo por el cual O_2 desactiva estados excitados de los compuestos orgánicos y de los efectos generales de solvente sobre las transiciones radiativas prohibidas.³

En cuanto a su reactividad química (comparándolo con el estado delta) es razonable especular que dada su mayor energía podría reaccionar con ciertos compuestos orgánicos, y considerar que los productos de reacción serían distintos debido a las diferencias en las ocupancias orbitales que los distinguen.

Sin embargo se ha encontrado que las reacciones químicas no compiten efectivamente con los canales de desactivación física que producen $O_2(^1\Delta_g)$, de modo que en los procesos de fotooxigenación el estudio de esta especie no es relevante.^{4,5}

2.3 El estado singlete delta ($^1\Delta_g$).

Debido a que ésta es la especie de interés para el estudio de la acción fotodinámica, se hará un estudio más detallado de sus propiedades.

2.3.1 Tiempos de vida.

El estado $^1\Delta_g$ posee un tiempo de vida media (τ_Δ) de 1 hora en ausencia de colisiones con otras moléculas, mientras que en medios condensados es altamente dependiente del solvente. Varía desde 4 μs en H_2O , el menor conocido, hasta 700 μs en CCl_4 ⁶ y 1000 μs en CF_3Cl (Freón X100).²

Merkel y Kearns,⁶ a partir de observaciones experimentales y consideraciones teóricas (basadas en el modelo del dipolo eléctrico resonante de Förster y Dexter para transferencia de energía electrónica), propusieron que el camino principal para el decaimiento no radiativo de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ involucra conversión de energía electrónica de esta especie en excitación vibracional del solvente. Cuanto mayor es la intensidad de absorción del solvente a 7880 y 6280 cm^{-1} (frecuencias de transición $^1\Delta \rightarrow ^3\Sigma$), mayor es la velocidad de decaimiento de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (k_Δ). Ya que los sobretonos de las bandas IR de los solventes comunes en la región de interés son debidos a vibraciones C-H y O-H, el cambio de H por D (deuterio), lo cual implica corrimiento de las bandas de absorción, produce un gran efecto sobre las interacciones solvente - $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, aumentando el tiempo de vida de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Para el caso del agua, por ejemplo, en H_2O $\tau_\Delta \cong 4 \mu\text{s}$ y en D_2O $\tau_\Delta \cong 60 \mu\text{s}$.

Debido a que la transición $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ es prohibida por spin, se esperaría observar que la presencia de átomos pesados en el solvente incrementa la velocidad de decaimiento de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Sin embargo no es así. Esto se debe a que el incremento en la constante de velocidad de decaimiento (k_Δ) por este efecto es de 100 s^{-1} , lo cual es despreciable frente a la velocidad de decaimiento en solventes sin átomos pesados (del orden de 10^5 s^{-1}).⁶

Aminas y otros compuestos de bajo potencial de ionización pueden introducir otras vías de desactivación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, tales como estados de transferencia de carga.

Rodgers⁷ encontró una buena correlación empírica entre el valor de k_Δ con el número de CH_3 y CH_2 presentes en el solvente, para alcanos y alcoholes alifáticos. La naturaleza aditiva de k_Δ apoya la propuesta de que el decaimiento no radiativo de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ resulta de interacciones colisionales con el solvente; este autor propone que el mecanismo de transferencia de energía opera a través del modelo de intercambio.⁸

Darmanyán,⁹ por su parte, a partir de un estudio reciente sobre numerosos solventes encontró una buena correlación entre k_{Δ} y el potencial de ionización del solvente; con lo cual propone que la interacción $O_2(^1\Delta_g)$ – solvente es del tipo de transferencia de carga. Sugiere que el ligero incremento observado en k_{Δ} con la presencia de átomos pesados en el solvente, se debe a la disminución del potencial de ionización del solvente por la presencia de estos átomos y no a un aumento en el acoplamiento spin órbita.

Otros autores no creen que las interacciones de transferencia de carga sean el factor principal en el efecto de solvente sobre k_{Δ} y sostienen que la respuesta electrónica del solvente es un parámetro clave que debe ser considerado en el desarrollo de modelos que expliquen tal efecto.¹⁰ No obstante, hasta ahora no han hallado una relación entre la polarizabilidad óptica del solvente y el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$.¹¹

2.3.2 La generación de $O_2(^1\Delta_g)$.

Existen diversos métodos de generación de esta especie. A continuación se describen someramente los más conocidos y luego, con más detalle se presentará el mecanismo de fotosensibilización ya que es el que se emplea en el trabajo de Tesis.

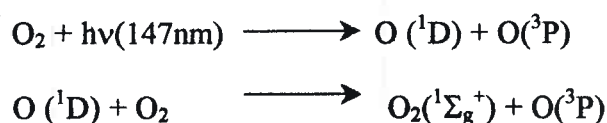
2.3.2.1 Generación fotolítica.

La fotólisis de ozono conduce a la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O(^1D)$ en fase gaseosa a través de la reacción:



La fotólisis de O_3 a 253,7 nm produce sólo $O_2(^1\Delta_g)$ y un átomo de oxígeno excitado $O(^1D)$, éste reacciona con $O_2(^3\Sigma_g^-)$ para dar $O_2(^1\Sigma_g^+)$ y $O(^3P)$. Se ha encontrado que estas reacciones son sólo fuentes menores de moléculas excitadas de O_2 .

Otro modo de generación del estado singlete sigma es la fotólisis de O_2 presentada en el siguiente esquema.¹²



La inhibición de O (1D) por O₂ produce O₂($^1\Sigma_g^+$) con una probabilidad cercana a la unidad.¹³

2.3.2.2 Fuentes químicas.

Descomposición de H₂O₂.

Esta reacción ha jugado un rol fundamental en el desarrollo de la química de O₂($^1\Delta_g$) ya que se empleó para demostrar la participación de esta especie en los procesos fotooxigenación sensibilizada.¹⁴

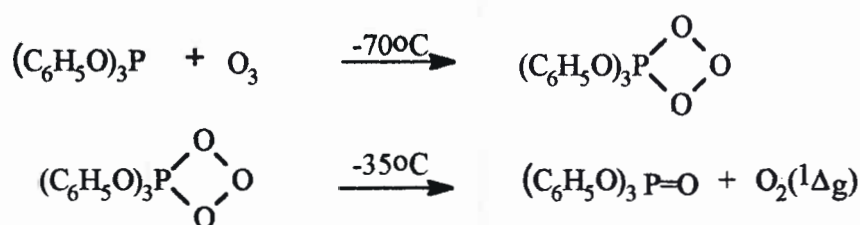
A partir de la reacción en agua:



se observa una fuerte luminiscencia del oxígeno molecular producido.¹⁵ Comparando los espectros de quimioluminiscencia observados con los espectros de absorción de O₂ líquido se estableció que por descomposición de peróxido de hidrógeno se generan grandes cantidades de O₂($^1\Delta_g$).¹⁶

Descomposición de ozónidos.

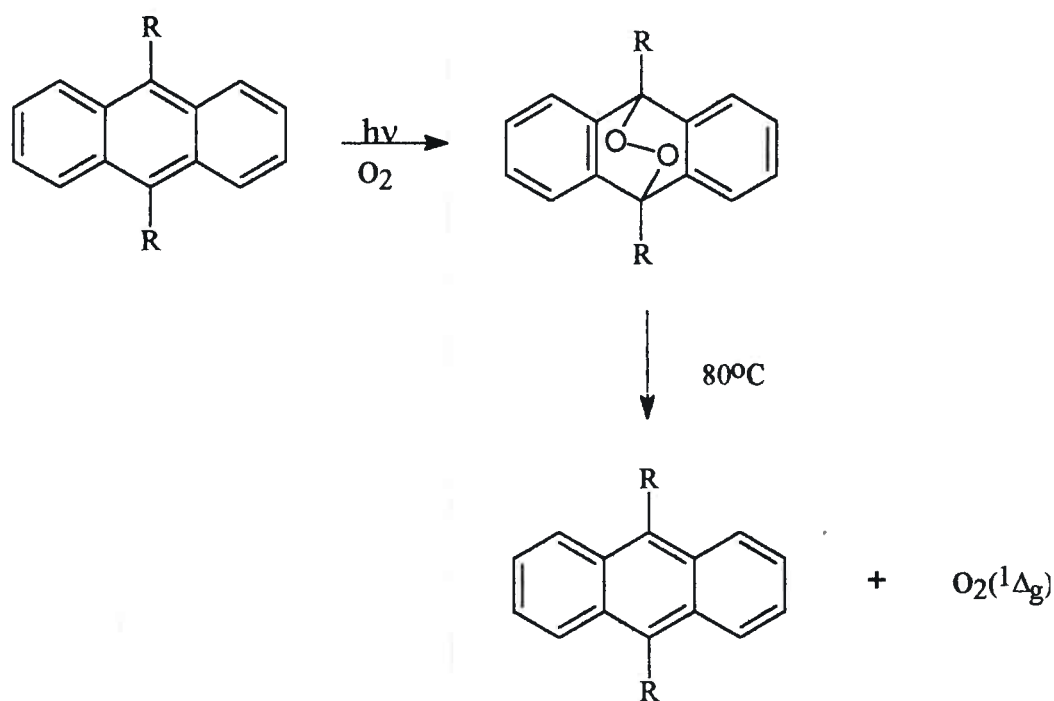
Se encontró que aductos preparados a -70°C entre arilfosfitos y O₃ liberaban O₂($^1\Delta_g$) al calentarlos a -35°C , de acuerdo con la siguiente reacción:¹⁷



Al analizar espectros de resonancia paramagnética de electrones del oxígeno producido por descomposición del mencionado aducto se demostró la presencia de las bandas de absorción características de O₂($^1\Delta_g$).¹⁸

Descomposición de endoperóxidos.

Varios hidrocarburos aromáticos policíclicos reaccionan con $O_2(^1\Delta_g)$ generado químicamente,¹⁹ para dar endoperóxidos estables, los cuales por calentamiento descomponen regenerando el hidrocarburo y $O_2(^1\Delta_g)$.²⁰

2.3.2.3 Otras fuentes de $O_2(^1\Delta_g \text{ ó } ^1\Sigma_g^+)$

Descarga gaseosa.

En tubos de descarga de radiofrecuencia se convierte aproximadamente el 10 % de O_2 en $O_2(^1\Delta_g)$. También se observa la generación del singlete sigma pero en muy escasa proporción.²¹

Fotosensibilización.

Es el método más comúnmente empleado en la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ y es precisamente en el que se basan los trabajos de esta tesis. Por esta razón es que a continuación se le destina una sección especial.

2.4 El proceso de fotosensibilización.

La molécula de O₂ es ubicua en la naturaleza y posee varias propiedades inusuales que dan cuenta de su capacidad de inhibir estados excitados de compuestos orgánicos con gran eficiencia y casi sin excepción.

Estas propiedades especiales incluyen:²²

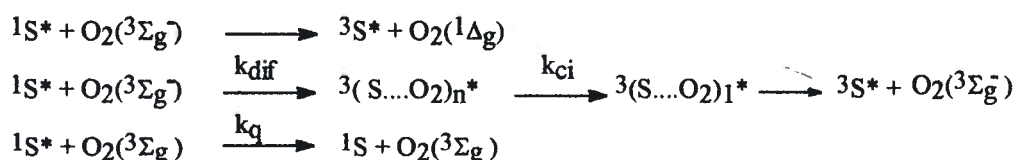
- Multiplicidad de spin triplete (O₂ (³Σ_g⁻)), lo cual permite incrementar el proceso de cruce entre sistemas en moléculas orgánicas.
- La presencia de dos estados excitados singlete de baja energía O₂ (¹Δ_g) y O₂ (¹Σ_g⁺) (95 y 158 kJ/mol, respectivamente), los cuales pueden ser poblados por inhibición de estados singlete o triplete mediante un mecanismo de transferencia de energía.
- La relativa facilidad de reducción a O₂⁻, el cual puede tener una fuerte influencia sobre la velocidad de inhibición y sobre la generación de O₂ (¹Δ_g).

Cuando el proceso de inhibición por O₂ de los estados excitados de un compuesto sigue la vía de transferencia de energía y conduce a la generación de O₂(¹Δ_g), el compuesto en cuestión se denomina sensibilizador.

Debido a la importancia del mencionado mecanismo en la fotooxigenación sensibilizada, es conveniente examinar con mayor detalle las interacciones generales entre la molécula de O₂ y los estados excitados de los compuestos orgánicos.

- Inhibición de fluorescencia:

La inhibición de estados excitados singlete (¹S*), parece ocurrir por transferencia de energía colisional, generando O₂ (¹Δ_g), o por cruce entre sistemas acelerado por O₂ y permitido por spin.²³



Con k_{dif} : constante de velocidad difusional.

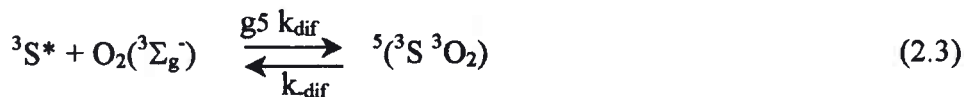
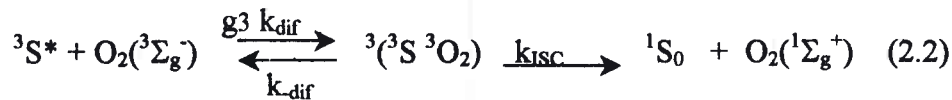
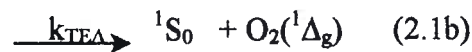
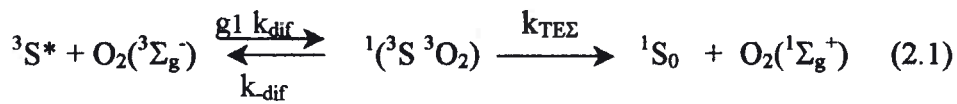
k_{ci} : constante de velocidad de conversión interna.

k_q : constante de velocidad de inhibición del estado excitado correspondiente.

Con algunos hidrocarburos aromáticos se observa peroxidación como consecuencia de la interacción de $^1S^*$ con O_2 , además de la inhibición de la fluorescencia. Como está involucrada la formación de $O_2(^1\Delta_g)$ se la considera como una reacción autosensibilizada.²⁴

- Inhibición de estados triplete excitados.

La inhibición de estados triplete por oxígeno involucra los siguientes procesos permitidos por spin.²⁵



Los dos tripletes interactuantes difunden a una velocidad $g_i k_{dif}$, donde g_i es un factor estadístico de spin que depende del camino de la reacción. A partir del contacto difusional se forma un complejo de colisión $^i(^3S^3O_2)$ que puede disociar para dar los reactivos iniciales con una constante de velocidad específica k_{dif} o reacciona para producir S en su estado fundamental y oxígeno en alguno de sus estados excitados de menor energía ($^1\Delta_g$ ó $^1\Sigma_g^+$) o en su estado fundamental.

Las especies $^3S^*$ y $O_2(^3\Sigma_g^-)$ poseen número de spin total S igual a 1. De modo que se pueden combinar para dar S=2, S=1 ó S=0, correspondiendo la multiplicidad quinteto, triplete o singlete respectivamente. El número de estados para cada multiplicidad de spin está dado por $2S+1$. Para este caso, el número total de estados es 9: un singlete, tres tripletes y cinco quintetos. El factor estadístico de spin g_i refleja la probabilidad estadística para la formación del estado de spin i, esto es:

$$g_i = (2S+1)_i / \sum_j (2S+1)_j$$

Es decir que para el esquema anterior $g_1 = 1/9$, $g_3 = 1/3$ y $g_5 = 5/9$.

Si las reacciones anteriores son gobernadas por las reglas de conservación de spin, la velocidad de cruce entre sistemas en el complejo ${}^1{}^3{}^5({}^3\text{S } {}^3\text{O}_2)$ es más lenta que cualquier otro proceso permitido por spin.

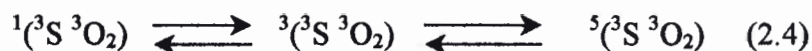
Una de nueve colisiones producen al complejo en estado singlete el cual mediante el proceso de transferencia de energía produce $\text{O}_2 ({}^1\Delta_g \text{ ó } {}^1\Sigma_g^+)$.

Por otra parte una de tres colisiones generan complejos triplete que decaen para dar las especies moleculares en su estado fundamental. Esta reacción involucra oxígeno molecular en un rol puramente catalítico, incrementando el proceso de cruce entre sistemas, permitiendo que el spin electrónico se conserve.

En los casos en los cuales la constante específica de velocidad de inhibición total de tripletes por $\text{O}_2 (k_q^T)$ es $1/9k_{\text{dif}}$ y la probabilidad de generación de $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ (S_Δ) es aproximadamente 1, la inhibición procede mediante un mecanismo de transferencia de energía y la contribución del proceso 2.2 es pequeña.

Cuando el proceso de inhibición es controlado por difusión a través de los caminos 2.1 y 2.2, los valores esperados para k_q^T es $4/9k_{\text{dif}}$ y $S_\Delta=0,25$, sin embargo estos valores raramente son observados. Se ha propuesto cruce entre sistemas entre los canales singlete y triplete.^{22, 26, 27}

En estudios realizados recientemente de inhibición de estados triplete de aminas por O_2 en ciclohexano y benceno, los autores concluyen que también es necesario incluir cruce entre sistemas desde los complejos de transferencia de carga del estado quinteto.²⁸



2.4.1 Clasificación de los procesos fotosensibilizados

El primer paso en estas reacciones es la absorción de luz por un sensibilizador para producir un estado excitado. En presencia de oxígeno pueden ocurrir dos reacciones competitivas: El sensibilizador excitado (singlete o más comúnmente triplete) puede reaccionar con un sustrato o el solvente, en tal caso el proceso se denomina de Tipo I, o con O_2 , para generar $\text{O}_2 ({}^1\Delta_g)$, denominado proceso de Tipo II.²⁹

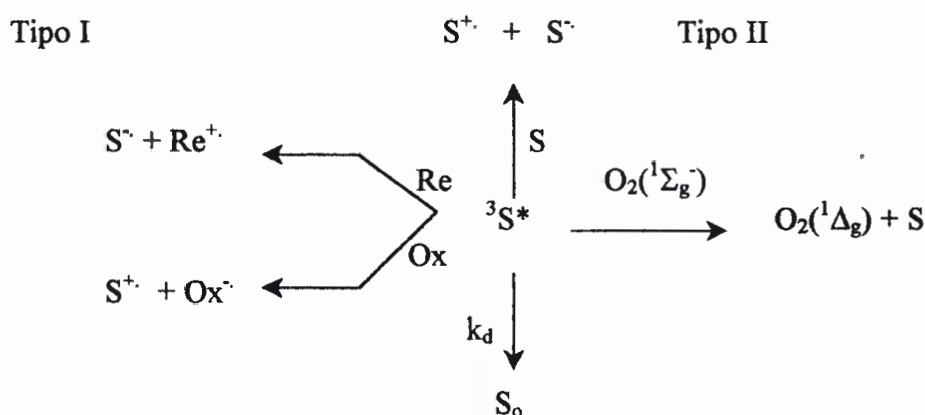
La reacción de Tipo I resulta en la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno, dando radicales o iones radicales. La transferencia puede ocurrir en

cualquier dirección pero generalmente los sensibilizadores en estado excitado actúan como oxidantes.²⁹

Los procesos de Tipo II conducen a la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ mediante un mecanismo de transferencia de energía.

En algunos casos se produce transferencia de electrones desde el sensibilizador al oxígeno, generando O_2^- , en ese caso existe controversia, algunos autores la definen como procesos de Tipo I, Foote²⁹ propuso que se incluya dentro de los procesos de Tipo II a los procesos primarios que involucren a O_2 . En esta tesis se adoptó la primer opción y se considera de Tipo II sólo a los procesos que involucren a $O_2(^1\Delta_g)$.

El esquema 2.1 resume lo antedicho.



Esquema 2.1: Clasificación de procesos de Tipo I y Tipo II

2.4.2. Factores que controlan las fotooxigenaciones de Tipo II

A continuación se detallan los factores que controlan las fotooxidaciones de Tipo II.²⁴

-Electrofilicidad de oxígeno singlete.

A partir de la configuración electrónica de $O_2(^1\Delta_g)$ se advierte que uno de los orbitales π antienlazantes está vacante, lo que hace que esta especie sea un electrófilo, de modo que es altamente reactivo frente a compuestos ricos en electrones. Por lo tanto, las interacciones de transferencia de carga entre $O_2(^1\Delta_g)$ y el sustrato oxidable deben ser importantes. Este tipo de interacciones se estudiarán con mayor detalle más adelante.



-Efectos estéricos.

Este tipo de efectos debe ser considerado ya que se ha observado que para una serie de olefinas trialkilsustituidas, la reactividad relativa disminuye con el aumento del volumen de los grupos alquilo sustituyentes, a pesar de que los potenciales de ionización de los compuestos son similares.³⁰

-Efectos de solvente.

Hay dos tipos de efectos de solvente importantes en los procesos de Tipo II: uno, ya discutido, es el efecto sobre el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$, otro es el efecto sobre la distribución de productos en alguna reacción competitiva en la cual dos o más tipos de reacción pueden ocurrir frente a $O_2(^1\Delta_g)$.

-Efecto del sensibilizador.

En general la dependencia con el sensibilizador sobre la distribución de productos se interpreta como debida a la extensión en la que se pueden producir procesos de Tipo I. No siempre es fácil predecir si para una dada reacción fotosensibilizada ocurren o no procesos de Tipo I, ya que la interacción entre el sensibilizador y el sustrato depende de la naturaleza de ambos, del solvente y de la concentración de oxígeno y de sustrato.

2.4.3 Discriminación entre procesos de Tipo I y Tipo II

Distinguir si el primer paso de una reacción es de Tipo I o Tipo II es un prerequisite indispensable para establecer el mecanismo de un evento iniciado por luz. Las diversas técnicas que se emplean para tal fin se presentan a continuación³¹:

-Ensayos mecánicos.

La mayoría de las técnicas disponibles para distinguir entre los dos tipos de mecanismos se han concebido con el fin de determinar la presencia de $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio de reacción y si éste es el responsable de la fotooxidación del sustrato.

Un método consiste en examinar el efecto de inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$, tales como DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) o azida de sodio sobre la velocidad de fotooxidación. Pero la mayoría de estos inhibidores también reaccionan con el

sensibilizador o con otros agente oxidantes fuertes además de $O_2(^1\Delta_g)$. De modo que es necesario conseguir pruebas adicionales para avalar el mecanismo de Tipo II.

Otro método consiste en comparar las velocidades de reacción en agua y agua deuterada (o solvente y solvente deuterado). Ya que el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ es mayor en el solvente deuterado, un incremento en la velocidad de la reacción sugiere que $O_2(^1\Delta_g)$ está involucrado. Este método es válido siempre que la inhibición por el solvente sea el principal modo de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$. De otro modo no se advierte cambio en la velocidad de reacción.

Estos ensayos no son inequívocos y se deben emplear otros métodos que avalen los resultados obtenidos con ellos.

- Técnicas resueltas en el tiempo y de estado estacionario.

Estas técnicas son complementarias, ya que ambas presentan ventajas y limitaciones.

Los métodos resueltos en el tiempo han sido tradicionalmente empleados para medir rendimientos cuánticos de estados excitados, tiempos de vida y reactividad con el agregado de un sustrato. Este método da resultados exactos de un modo relativamente directo. Los datos obtenidos son necesarios ya que indican cuáles son los procesos primarios y las reacciones de los intermediarios primarios. Pero la técnica no da información acerca de los productos subsecuentes.

Con excepción de los valores en los tiempos de vida, la misma información se puede obtener a partir de técnicas de estado estacionario tal como consumo de oxígeno.³² Mediante este método se puede obtener rendimientos cuánticos precisos de generación de $O_2(^1\Delta_g)$, datos cuantitativos sobre la fotoestabilidad de agregados e información sobre la competencia entre reacciones de transferencia de energía de tripletes y transferencia de electrones a oxígeno.^{33, 34}

2.4.4 La elección del fotosensibilizador.

La elección del fotosensibilizador depende de las características del sustrato y del medio de reacción. Los requisitos para el sensibilizador ideal se enumeran a continuación.²⁴

- Estabilidad fotoquímica.

Es deseable que el sensibilizador sea fotoestable a lo largo de la reacción fotosensibilizada, aunque alguna pérdida durante la reacción generalmente es inevitable, sobre todo si se llevan a cabo irradiaciones prolongadas. Para cada caso es necesario elegir un sensibilizador que sea estable en las condiciones de diseño del experimento o, para un dado sensibilizador procurar un diseño que evite su descomposición. La velocidad de las reacciones laterales del sensibilizador debe ser despreciable comparada con la velocidad de transferencia de energía.

- Solubilidad.

El sensibilizador debe ser soluble en el medio de reacción. En el caso de solventes orgánicos no resulta difícil conseguir sensibilizadores adecuados, pero en medio acuoso la situación se complica. Tradicionalmente los sensibilizadores de elección en agua son eosina, rosa de bengala, azul de metileno u otro tipo de colorantes sustituidos con grupos hidrofílicos.

- Alto rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$.

Esta condición se requiere si se pretende que la fotooxidación sea mediada por esta especie. A la vez, para que ésto se cumpla es necesario que el sensibilizador presente altos rendimientos cuánticos de tripletes, cuya energía debe superar los 95 kJ/mol, de modo tal que se consiga una alta velocidad de transferencia de energía hacia O_2 .

- Características de absorción.

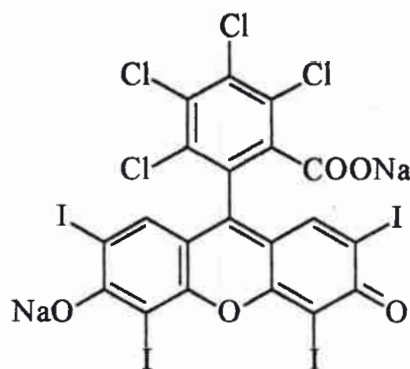
Alguna banda de absorción del sensibilizador no se debe superponer con las del sustrato fotooxidable. Generalmente se pretende que el sensibilizador absorba en la región visible del espectro electromagnético, que la longitud de onda de absorción sea mayor que la del sustrato y que presente altos coeficientes de extinción molar de modo que se consigan altas intensidades de absorción a bajas concentraciones. Esto evita la formación de dímeros y de complejos en el estado fundamental con el sustrato.

-No debe interactuar en su estado fundamental ni en los excitados con el sustrato (evitar procesos de tipo I).

2.4.5 Sensibilizadores empleados en el trabajo de tesis

Rosa de bengala (RB).

Es un colorante xanténico de amplio uso en fotooxidaciones tanto en química como en biología, su estructura química se presenta a continuación.



Lee and Rodgers³⁵ llevaron a cabo un estudio de láser flash fotólisis del estado triplete de este colorante y sus reacciones con oxígeno. A continuación se detallan las observaciones de estos autores.

En medio acuoso, bajo fotoirradiación continua de baja intensidad, en ausencia de O_2 , no se observa consumo de RB.

En soluciones saturadas con aire se observa consumo del colorante. En D_2O la velocidad de consumo es cuatro veces mayor que en H_2O .

Si se irradian soluciones acuosas de RB con pulsos de alta energía (mayores que 300 mJ cm^{-2} a 532 nm) se encuentra fotodecoloración, haya o no O_2 en el medio.

Con pulsos láser de 12 mJ cm^{-2} o menores no se detectan eventos de fotodescomposición, aún con más de treinta disparos.

A partir de estas observaciones concluyen que la principal especie responsable de la descomposición del colorante es $O_2(^1\Delta_g)$. Con potencia muy alta sucede un proceso de aniquilación triplete- triplete muy efectivo y es independiente de la presencia de O_2 .

En ese mismo trabajo se reporta que la eficiencia cuántica de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ (ϕ_Δ), es de 0,75 y que además se genera $O_2^{\cdot -}$ con una eficiencia de 0,18.

Neckers y col.,³⁶ estudiando la reacción de oxidación sensibilizada por RB de SO_3^- , también proponen que este sensibilizador genera O_2^- , de acuerdo con la siguiente reacción:

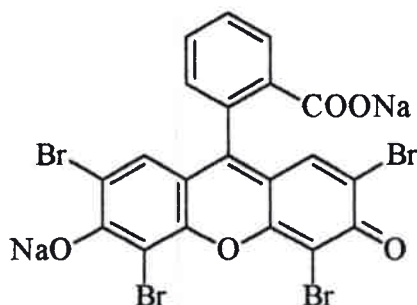


El anión superóxido se genera por transferencia de electrones desde el estado triplete de rosa de bengala y ha sido considerado como una especie reactiva en las reacciones de fotooxidación.³⁶

Lambert y Kochevar³⁷ examinaron, mediante experimentos con láser flash fotólisis, los métodos indirectos empleados previamente para determinar los rendimientos cuánticos de generación de O_2^- y concluyeron que tales métodos no son adecuados para cuantificar la eficiencia de la reacción (2.5). El modo más directo de determinar el rendimiento cuántico de O_2^- es medir la absorción del catión radical de RB, por láser flash fotólisis de soluciones de RB saturadas con aire, para determinar su concentración. Obtuvieron un rendimiento de 0,5 % y representa el máximo rendimiento de O_2^- . Con estos resultados sugieren que en solución acuosa la formación de anión superóxido por ${}^3\text{RB}^*$ es ineficiente.

Eosina (Eo).

Tetrabromofluoresceína, más conocida como eosina, al igual que rosa de bengala es un colorante xanténico, el cual ha sido empleado como colorante histológico desde el siglo XIX, para observar ciertos componentes de los leucocitos.³⁸ La estructura química es la siguiente:

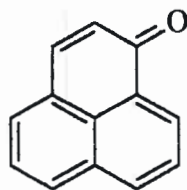


Su rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ fue determinado, entre otros por Gandin et al.,³⁹ mediante métodos químicos. El valor de ϕ_Δ reportado es de 0,57 en agua.

El $O_2(^1\Delta_g)$ producido por el estado triplete del sensibilizador es comúnmente asignado como el exclusivo intermediario tóxico durante la inactivación fotodinámica. Sin embargo se han presentado evidencias de que la reacción de algunos aminoácidos, tales como triptofano y tirosina proceden por mecanismos de Tipo I y II.^{40,41}

Perinaftenona (PN).

Entre las cetonas aromáticas 1-H-phenalen-1-ona, o perinaftenona, es uno de los más eficientes sensibilizadores de $O_2(^1\Delta_g)$ encontrados y presenta la ventaja de ser soluble en solventes polares próticos y apróticos, como así también en solventes no polares.⁴² A continuación se presenta su estructura química.



Se reportó un rendimiento cuántico de cruce entre sistemas aproximadamente igual a la unidad. El rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ es de 0,93 para C_6H_6 , 0,95 en CCl_4 y 0,97 en CD_3OD (metanol deuterado), con lo cual se deduce que es independiente del solvente.⁴²

Además es fotoestable en benceno, ciclohexano y metilciclohexano. En solventes próticos puede dar reacción de abstracción de hidrógeno pero en muy escasa extensión.⁴²

2.5 Procesos de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$.

Los mecanismos de inhibición $O_2(^1\Delta_g)$ son diversos, entre ellos se incluye transferencia de carga, transferencia de energía electrónica, inhibición por estados triplete excitados e interacciones dimol.⁴³

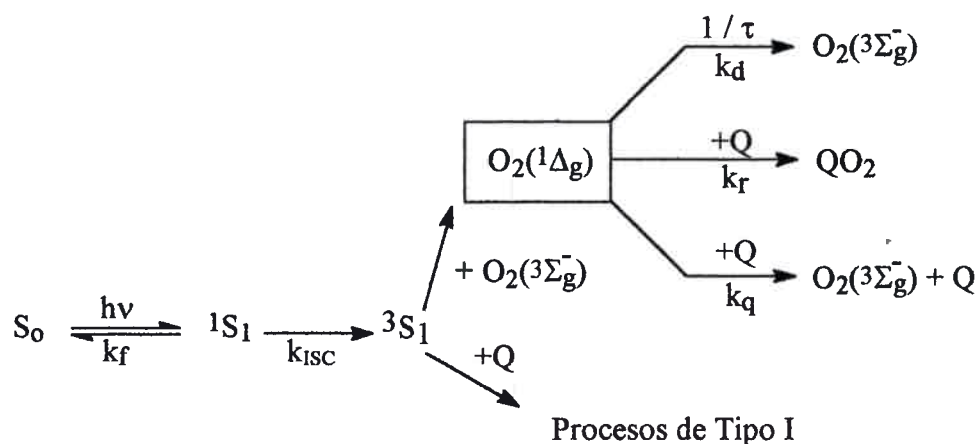
Los inhibidores, dependiendo de su estructura química pueden interactuar de dos modos:

Inhibidores físicos: Son los que aceleran la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ en un dado sistema sin reaccionar con él.

Inhibidores químicos: Son aquellos cuya interacción con $O_2(^1\Delta_g)$ es netamente reactiva.

Generalmente sucede que en el proceso de inhibición están involucrados ambos eventos, químico y físico.

Una formulación general de los procesos que pueden suceder en un medio en el cual están presentes simultáneamente el sensibilizador (S), oxígeno molecular y un sustrato (Q) disueltos se presenta en el siguiente esquema,² en él se incluyen los términos cinéticos concernientes específicamente a oxígeno singlete.



Esquema 2.2: Proceso de fotosensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$ y su posterior inhibición por el compuesto Q.

En el esquema 2.2, S_0 representa al sensibilizador en su estado fundamental, el cual absorbe luz ($h\nu$) y alcanza su primer estado excitado (1S_1) a partir del cual, puede retornar a su estado fundamental mediante k_f o pasar al estado triplete 3S_1 (k_{ISC}). Desde este estado, por su encuentro con el compuesto Q puede reaccionar siguiendo los ya mencionados procesos de Tipo I o por su encuentro con O_2 , generar $O_2(^1\Delta_g)$ mediante un proceso de transferencia de energía.

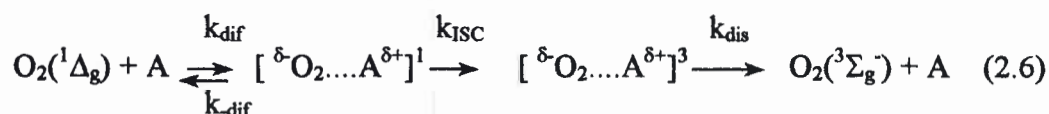
$O_2(^1\Delta_g)$, a su vez puede decaer térmicamente o por emisión de un fotón a su estado fundamental, representado en el esquema por k_d , o a partir del encuentro con la sustancia Q, puede reaccionar químicamente para dar el producto de oxidación de Q (QO_2) (interacción química, k_r) o retornar a su estado fundamental sin que Q se

modifique (interacción física, k_q). A la constante de velocidad total de desaparición de $O_2(^1\Delta_g)$ por su interacción con Q se la denomina k_t y está dada por la suma de k_r y k_q .

2.5.1 Inhibición por transferencia de carga.

Aminas, sulfuros, colorantes azometinos y bilirrubina son eficientes inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$ por un mecanismo de transferencia de carga.

El mecanismo sugerido está representado por la ec. (2.6), en la cual se observa que por el encuentro de $O_2(^1\Delta_g)$ con A se forma un intermediario de transferencia de carga, el cual aumenta el acoplamiento spin-órbita y facilita el cruce entre sistemas del complejo al estado triplete y desde allí se separan los componentes en su estado fundamental.



Ogryzlo y Tang,⁴⁴ trabajando en fase gaseosa, encontraron que la velocidad de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por aminas está relacionada con su potencial de ionización. En metanol se encontró que aquellas aminas con bajos potenciales de ionización son mejores inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$. El orden de inhibición es aminas $3^{ria} > 2^{ria} > 1^{ria}$.

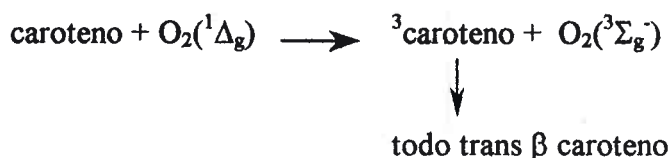
Se obtienen gráficos lineales cuando se representa $\log k_q$ vs. PI, donde $k_q = k_{dis} k_{dif} / k_{dis} (k_{-dif} + k_{isc})$, representa al proceso total de inhibición según la ec. (2.6). En cuanto a N,N-dimetilanilinas, los gráficos de Hammett dan un valor de $\rho = -1,39$. Lo cual indica que una moderada interacción de transferencia de carga está implicada en el proceso de inhibición.⁴⁵

En trabajos más recientes también se ha encontrado una muy buena correlación entre $\log k_q$ y los potenciales de ionización para una gran cantidad de aminas e hidrocarburos aromáticos.⁴⁶

2.5.2 Desactivación por transferencia de energía.

El mecanismo de desactivación por transferencia de energía es poco frecuente debido a que el aceptor debe tener una energía del estado triplete inferior a 95 kJ (energía de $O_2(^1\Delta_g)$).

Footo and Denny propusieron que el β -caroteno desactiva a $O_2(^1\Delta_g)$ por este mecanismo,⁴⁷ ya que encontró que la constante de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por β -carotenos (k_q) aumenta con el incremento en el número de dobles enlaces conjugados. La forma de la curva k_q vs. n° dobles enlaces conjugados es sigmoidea y llega a un valor límite de $3 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ a partir de 11 dobles enlaces correspondiente a un proceso controlado por difusión.⁴⁸ Además 15,15'-cis- β -caroteno isomeriza a todo trans en presencia de $O_2(^1\Delta_g)$, el solvente empleado fue una mezcla de benceno metanol 80:20,⁴⁹ esta reacción se explica mediante un mecanismo de transferencia de energía desde $O_2(^1\Delta_g)$ al caroteno como se presenta a continuación:



Este tipo de inhibición explica el mecanismo de acción protectora de los carotenos contra el daño fotodinámico en los organismos vivos; esta acción preventiva puede ser la "función universal de los pigmentos carotenoides".⁵⁰

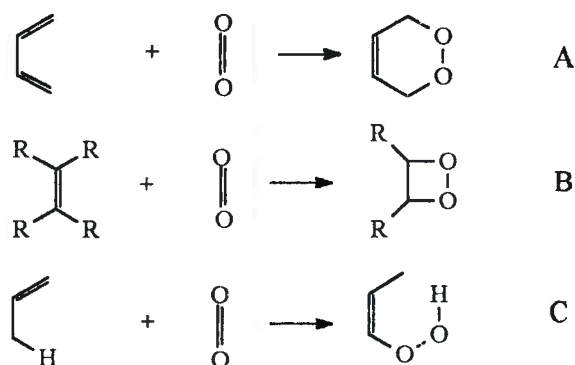
Nitroso compuestos también son eficientes inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$. Se ha propuesto que 1,4-dicloro-1,4-dinitrosociclohexano y 2-nitroso-2-metilpropano, con $E_T < 104$ kJ/mol, inhiben a $O_2(^1\Delta_g)$ por un mecanismo de transferencia de energía.⁵¹

2.5.3 Inhibición por reacción química.

A continuación se presentan los mecanismos y los productos de reacción de los grupos de compuestos orgánicos más importantes y más extensamente estudiados que se comportan, en general, de modo ambivalente frente a $O_2(^1\Delta_g)$, es decir dan reacciones de oxidación además de inhibición física. La constante de velocidad global de inhibición (k_i) está dada por la suma de la constante de desactivación física (k_q) y la reactiva (k_r). Las reacciones relacionadas con estas constantes se presentaron en el Esquema 2.2.

Reacciones con alquenos.

El tipo de reacción de alquenos frente a $O_2(^1\Delta_g)$ depende de la estructura química de la olefina. Los tres modos de reacción se muestran en el siguiente esquema:



El camino A representa una cicloadición [4+2] de dienos conjugados para dar endoperóxidos. El camino B representa el caso de olefinas ricas en electrones, las cuales dan adición [2+2] para producir dioxetanos. El proceso 'eno' de Schenk está representado por la vía C para sustratos alílicos y conduce al hidroperóxido alílico.

A continuación se discute con mayor detalle cada uno de los mecanismos.

Cicloadición [4+2]:

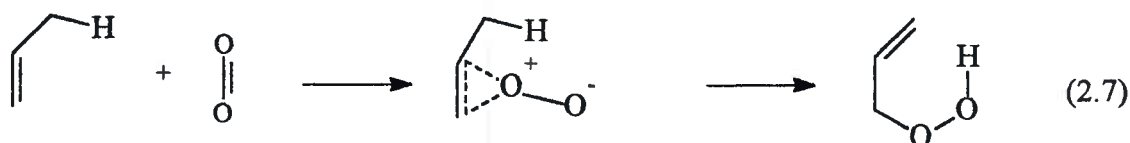
En casos de cis dienos conjugados cíclicos con $O_2(^1\Delta_g)$ se produce cicloadición 4+2 para dar los correspondientes endoperóxidos. Esta reacción es similar al mecanismo de Diels Alder para reacciones concertadas.

En general aquellas moléculas que son más reactivas en las reacciones de Diels Alder también lo son frente a $O_2(^1\Delta_g)$. La conformación s-cis que da este tipo de reacciones generalmente reside en una estructura no aromática (por ejemplo 1,3 butadienos sustituidos), o en sistemas poliaromáticos (antraceno, rubreno, etc.).

Algunos de estos endoperóxidos son relativamente estables. La termólisis del endoperóxido conduce a la disociación para dar los reactivos que lo formaron (ver generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por descomposición de endoperóxidos pag. 10).

Reacción 'eno' de Schenk.

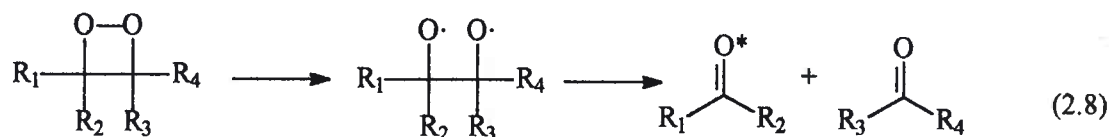
Es un mecanismo de dos etapas, en la primera se forma un exciplexo con geometría de perepóxido,⁵² en el segundo paso se produce la abstracción de un hidrógeno alílico para dar el hidroperóxido en el cual el doble enlace se ha corrido a una posición adyacente a la original.



Las propiedades electrónicas de la olefina determinan cuál de los pasos controla la velocidad del proceso.⁵³ Estas reacciones son estereo controladas y se las ha propuesto como una valiosa herramienta sintética.⁵⁴

Formación de dioxetanos.

Un tercer modo de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ frente a olefinas carentes de hidrógeno alílico es la cicloadición 2+2 para formar dioxetanos relativamente inestables los cuales pueden fragmentar para dar compuestos carbonílicos y quimioluminiscencia.^{55,56}



Este mecanismo predomina en dioxetanos alquil o aril sustituidos. Para aquéllos sustituidos con azufre, oxígeno o nitrógeno pueden presentar un modo distinto de fragmentación. Generalmente se produce la expulsión del heteroátomo y se forma una hidroxicetona.^{57,58}

Se han propuesto diversos mecanismos de formación de dioxetanos, dependiendo de las propiedades químicas y físicas de las olefinas estudiadas pero aún no se ha podido establecer una generalización al respecto.⁵⁹

Reacción con fenoles.

El mecanismo de reacción entre $O_2(^1\Delta_g)$ y fenoles más aceptado en la actualidad es el que propone la formación de un intermediario de transferencia de carga, seguido por transferencia de un electrón. De modo que los productos observados dependerán de la reacción entre anión superóxido y el catión radical del fenol formados.⁶⁰

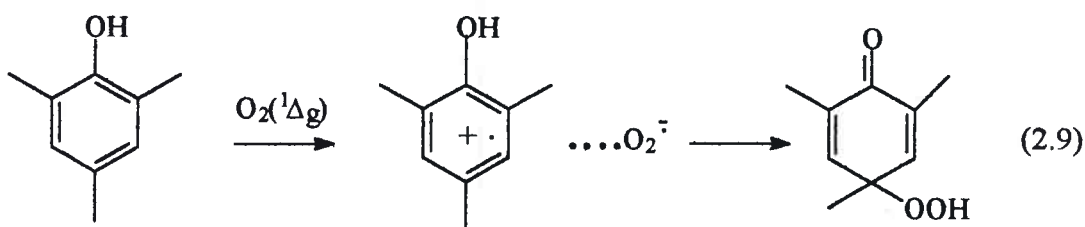
Ya se mencionó que con colorantes del tipo xanténicos tales como eosina y rosa de bengala también se registran procesos de Tipo I.⁶¹

Thomas y Foote⁶² encontraron que fenoles ricos en electrones son excelentes trampas de $O_2(^1\Delta_g)$. Proponen que la ineficiencia de formación de productos se debe a que se forma un intermediario inestable el cual presenta una importante componente de transferencia de carga.

Gráficos de $\log k_t$ vs. el potencial de oxidación de media onda de metilanilinas, metoxibencenos, 2,6 di-terbutilfenoles son lineales con una pendiente de $-3,1 \text{ V}^{-1}$. Para 2,6-diterbutilfenoles sustituidos, el gráfico de Hammett muestra un muy buen ajuste

lineal con σ^+ , dando un ρ de $-1,72$. Además k_t es significativamente más grande en metanol que en benceno, lo cual implica que el estado de transición es bastante polar. Estas observaciones evidencian que en el mecanismo de reacción están involucradas reacciones de transferencia de carga.⁶²

El producto de fotooxigenación de 2,6-diterbutil-4-metilfenol es la correspondiente p-hidroperoxidienona, lo mismo para 2,4,6-trimetilfenol,⁶² la ec.2.9 ilustra el mecanismo mencionado para este último compuesto.



Los fenoles que no presentan sustituyentes en posición 4 dan la correspondiente p-benzoquinona.⁶⁰ Tal estructura quinónica se encuentra como producto de fotooxidación de tocoferoles, compuestos que han sido extensamente estudiados debido a su conocida acción antioxidante.⁶³⁻⁶⁵ En estos compuestos el mecanismo de interacción es predominantemente físico. α -Tocoferol desactiva 120 moléculas de $O_2(^1\Delta_g)$ antes de ser destruido.⁶⁶

En general las constantes de velocidad de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por fenoles oscilan alrededor de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en medio ácido o neutro. En solución de pH mayor que el pK del fenol, en donde el compuesto está completamente ionizado, las constantes de velocidad de inhibición son entre 1 y 2 órdenes de magnitud mayor, dependiendo del compuesto. Además, si el fenol está protonado el proceso de inhibición es predominantemente físico,⁶² mientras que en su forma aniónica el proceso reactivo se torna más importante.⁶⁷

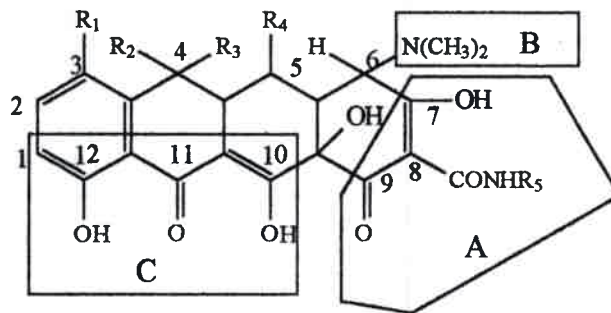
2.6 Antecedentes de los compuestos estudiados en esta tesis.

2.6.1 Tetraciclinas

Las tetraciclinas (TCs), son antibióticos de amplio espectro, y revisten considerable utilidad terapéutica.

El efecto adverso más común en los tratamientos con estos antibióticos es la alteración de la flora intestinal. Puede ocurrir hipersensibilidad. El efecto más grave es la fotosensibilidad, que resulta más frecuente con el empleo de demeclociclina. El veteado de los dientes por depósitos de TCs en el complejo de calcio hace que se opte por otros antibióticos para tratar a niños durante el proceso de dentición definitiva.

La estructura química básica se muestra a continuación.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetraciclina (Tet)	H	CH ₃	OH	H	H
Clortetraciclina (Clo)	Cl	CH ₃	OH	H	H
Oxitetraciclina (Oxi)	H	CH ₃	OH	OH	H
Doxiciclina (Dox)	H	CH ₃		OH	H
Demeclociclina (Dem)	Cl	H	OH	H	H
Metaciclina (Met)	H	=CH ₂		OH	H
Minociclina (Min)	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H
Rolitetraciclina (Rol)	H	OH	CH ₃	H	

Esquema 2.3: Estructura química básica de las ocho tetraciclinas estudiadas.

Clortetraciclina (Clo) o 3-clorotetraciclina fue la primera del grupo que se empleó en terapéutica. Especialidad medicinal: *Aureomicina*.

Tetraciclina (Tet) es el antibiótico de amplio espectro más usado. Especialidades medicinales (sólo se mencionan algunas): *Achromicin, Sumicyn, Tetracyn*.

Oxitetraciclina (Oxi) o 5-hidroxitetraciclina se expende en diversas fórmulas para administración oral, parenteral y tópica. Especialidad medicinal: *Terramicina*.

Demeclociclina (Dem) o 3-cloro-4-demiltetraciclina es más estable en medio ácido que las restantes, las cuales contienen el grupo metilo en posición 6. La mejor

absorción y la excreción más lenta producen niveles sanguíneos que ofrecen ventajas terapéuticas especiales. Se administra por vía oral. Especialidad medicinal: *Declomicina*.

Doxiciclina (Dox) o 4-desoxi-5-hidroxitetraciclina es semisintética, se prepara a partir de oxitetraciclina por deshidratación y reducción química. Especialidad medicinal: *Vibramicina*.

Metaciclina (Met) se prepara por deshidratación de oxitetraciclina. Posee un grupo metileno en la posición 4. Especialidad medicinal: *Rondomicina*.

Rolitetraciclina (Rol) o N-pirrolidinometil tetraciclina se produce químicamente a partir de tetraciclina. Es soluble a pH fisiológico. Especialidad medicinal: *Syntetrin*.

Minociclina (Min) se prepara por metilación reductiva de 7-nitro-6-demetil-6-desixitetraciclina. Especialidades medicinales: *Minocin, Vectrin*.

Excepto rolitetraciclina, las otras se presentan como clorhidratos con el fin de lograr una buena solubilidad en agua a las dosis empleadas.

Como se puede apreciar en la estructura química básica, estas moléculas presentan tres grupos ácidos de características inusuales, el sistema tricarbonilmetano (A), el grupo dimetilamino (B) y el sistema fenólico dicetona (C). La determinación de los pK_a y la asignación de los valores a los grupos correspondientes fue llevada a cabo por Woodward y col⁶⁸ para Oxi, Clo y Tet. Para todos los compuestos se obtuvieron tres valores de pK semejantes. El valor de pK de alrededor de 3,3 se asignó al sistema A, pK 7,4 al grupo dimetilamonio (sistema B) y el pK de 9,2 corresponde al sistema C. Para este último no discriminan si el protón ácido es el del C_{10} o el de C_{12} .

Debido al efecto colateral de fotosensibilidad al nivel de la piel y los dientes es que se han realizado diversos estudios fotoquímicos con el fin de explicarlo.

En 1957 se publicó un trabajo⁶⁹ en el cual se estudiaba la inactivación de clorotetraciclina por riboflavina (RF), una vitamina del grupo B. Encontraron que en soluciones acuosas del antibiótico y la vitamina, irradiadas con luz visible, las bacterias de *Streptococcus faecalis* desarrollaban más rápidamente que en los medios preparados con las soluciones sin irradiar.

Llevando a cabo la fotólisis con luz UV el antibiótico se consume, pero lo hace con mayor velocidad en presencia de RF.

Si la fotólisis se produce en ausencia de oxígeno y en presencia de un reductor como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ la inactivación es nula.

El uso de otros sensibilizadores como eosina, rodamina B o azul de metileno produce el mismo efecto de inactivación que RF.

En cuanto a los productos de oxidación encontraron NH_3 , asignado a la pérdida del grupo dimetilamina y un producto que muestra el mismo espectro de absorbancia que el que se obtiene por oxidación de clorotetraciclina con KMnO_4 .

Trabajando con acetofenona y benzofenona como sensibilizadores e irradiando con luz UV de 100 W de potencia, Bitha y col.⁷⁰ encontraron que se producía una ruptura selectiva del enlace C-N para dar la tetraciclina sin el grupo amino. El mismo producto obtuvieron cuando irradiaban sin sensibilizador pero con lámparas de mayor potencia. Basados en consideraciones de superposición de orbitales, propusieron que el mecanismo de reacción consiste en una ruptura homolítica del enlace C-N a partir del estado excitado de Tet.

Otros investigadores⁷¹ midieron velocidades de consumo de oxígeno por irradiación directa de siete tetraciclinas en soluciones de distinto pH. Obtuvieron los siguientes resultados:

Trabajando en soluciones acuosas tampón de pH entre 4,5 y 10,8 no encontraron consumo de oxígeno significativo a pH menor que 8. Al irradiar soluciones de pH 9 se observó cambio de color a medida que la fotólisis procede, con la aparición, en el espectro de absorción, de una banda ancha centrada en 530 nm, concomitante con la desaparición de la banda de 373 nm de Tet. La relación estequiométrica de Tet a O_2 es unitaria.

Variando la temperatura entre 25 a 40°C, la velocidad de la reacción no cambia, pero es dependiente de la intensidad de la luz, con lo cual concluyen que se trata de un proceso fotoquímico primario y no una reacción radicalaria en cadena.

También encontraron que irradiando TCs se induce la fotooxidación de limoneno y de 2,5-dimetilfurano. A partir de esos resultados deducen que estos antibióticos son sensibilizadores de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Posteriormente, en 1987, Li et al.⁷² llevaron a cabo un estudio sobre cinco TCs. Determinaron por medidas de fosforescencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ los rendimientos cuánticos de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) por los antibióticos en etanol alcalino, empleando rosa de

bengala (RB) como referencia. Hallaron que Φ_{Δ} es cero para minociclina y que demeclociclina es la más efectiva, con $\Phi_{\Delta}= 0,04$.

Además, mediante técnicas de trampas de spin y resonancia de spin electrónico advirtieron la formación de radicales. Con estos resultados concluyeron que TCs sensibilizan reacciones de Tipo I y Tipo II.

Por otra parte, Davies y col.⁷³ analizaron los productos de fotooxidación por irradiación directa de Tet en solución acuosa tampón de pH 9. Corroboran las observaciones de los otros autores y proponen que el producto final de la reacción de oxidación es una quinona que se genera por desaminación oxidativa del grupo dimetilánilina. No concuerdan con que la reacción sea mediada por $O_2(^1\Delta_g)$, ya que el agregado de NaN_3 no altera la velocidad del proceso.

Señalan, además que las TCs cloradas no dan la quinona como producto.

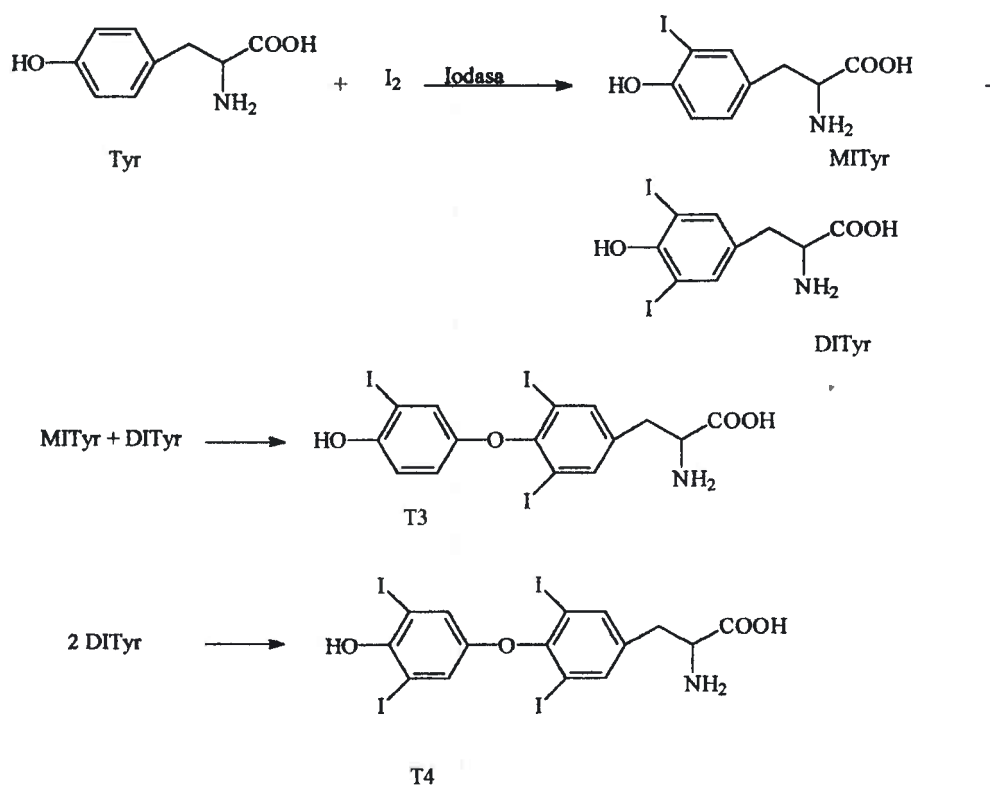
Debido a que, como ya se mencionó, los tratamientos con tetraciclinas producen manchas en los dientes de los niños en proceso de dentición también se llevó a cabo un trabajo⁷⁴ en el cual fotolizaron Tet depositada sobre hidroxiapatita, ya que es el principal componente inorgánico de los dientes. Encontraron que Tet se adsorbe fuertemente sobre este material, no se lava con agua y por irradiación con luz UV se advierten los mismos cambios que cuando se trabaja en solución. También declaran que Clo no produce ese efecto.

2.6.2 Hormonas tiroideas y compuestos químicamente relacionados.

Dentro de este grupo de compuestos se estudian las hormonas propiamente dichas Tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3), y también otros compuestos químicamente relacionados que están presentes en la glándula tiroides y que son precursores de las hormonas, como se advierte en el esquema 2.4; tales compuestos son Tirosina (Tyr), 3-iodotirosina (MITyr) y 3,5-diiiodotirosina (DITyr). Los compuestos tironina (TN), diiodotironina (T2) y fenoxifenol (FOF) no se encuentran presentes en la glándula tiroides ni poseen actividad biológica pero se los estudia con fines comparativos, ya que están estructuralmente relacionados con los compuestos de interés.

Del contenido total de iodo en la glándula tiroides desecada, el 35% corresponde a Tiroxina, 20 % a 3-iodotirosina, 40% a 3,5-diiiodotirosina y 5% a 3,3',5'-triiiodotironina.⁷⁵

La síntesis biológica se presenta en el esquema 2.4. Esta síntesis se lleva a cabo dentro de una glucoproteína denominada tiroglobulina, la cual está ubicada dentro de la glándula tiroides. Allí, las hormonas quedan almacenadas hasta su liberación al torrente sanguíneo. Cada molécula de tiroglobulina contiene alrededor de tres a cuatro moléculas de Tiroxina y cada catorce moléculas de tiroxina se encuentra una de Triiodotironina. En la sangre son transportadas por una α -globulina y distribuidas en los diversos órganos.⁷⁶



Esquema 2.4: Síntesis biológica de T3 y T4.

Tirosina.

Este aminoácido ha sido estudiado por numerosos autores debido a su importancia desde el punto de vista de la acción fotodinámica.⁷⁷⁻⁸¹

El pK_a del grupo fenólico de este compuesto es de 10.05, mientras que para 3-iodotirosina es de 8.47 según lo reportado por Sober.⁸²

Varios autores han determinado las constantes cinéticas de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ y eficiencias reactivas empleando eosina y rosa de bengala como sensibilizadores,⁸⁰ la estequiometría, y algunos de los productos de fotooxidación sensibilizada.⁷⁸

Además se han reportado las constantes cinéticas de interacción con $O_2(^1\Delta_g)$ de 3-iodotirosina,⁸³ y los rendimientos cuánticos de consumo de O_2 por fotooxigenación sensibilizada con eosina de tirosina y sus derivados mono y diiodados.⁸¹

Tironina y derivados iodados.

Tironina, o 4'-hidroxi-4-fenoxifenilalanina es la estructura básica de las hormonas tiroideas, 3,3',5-triiodotironina (T3) y 3,3',5,5'-tetraiodotironina (T4), esta última más conocida como Tiroxina.

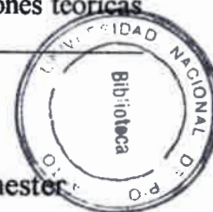
Son compuestos de escasa solubilidad en los solventes comunes,⁸⁴ con excepción de medios muy ácidos o muy alcalinos.

Con respecto a su descomposición térmica se ha reportado que calentando a 80°C por varios días, en medio alcalino, se producen triiodotiroetilamina, ácido triiodotiroetilacético y alcohol triiodotiroetílico.

No se ha encontrado en bibliografía estudios fotoquímicos de estos compuestos, ni relacionados con $O_2(^1\Delta_g)$.

REFERENCIAS

- ¹ F. Wilkinson. Singlet Oxygen. Ranby and Rabek (ed). John Wiley & Sons. New York (1978). Cap. 5. Pag. 27.
- ² D. Bellus, Singlet Oxygen. Ranby and Rabek (ed). John Wiley & Sons. New York (1978). Cap. 9. Pag. 62.
- ³ D. Weldon, T. Poulsen, K. Mikkelsen and P. Ogilby. Photochem. Photobiol. 70 (1999). 369-379.
- ⁴ R. D. Scurlock, B. Wang and P. Ogilby. J. Phys. Chem. 100 (1996) 17226-17231
- ⁵ M. Bodesheim and R. Schmidt. J. Phys. Chem. A. 101 (1997) 5672-5677.
- ⁶ P. B. Merkel and D. R. Kearns. J. Am. Chem. Soc. 94. (1972). 7244-7253.
- ⁷ M. A. J. Rodgers. J. Am. Chem. Soc. 105 (1983). 6201-6205.
- ⁸ Hurst and Schuster. J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 5756-5760.
- ⁹ A. P. Darmanyan. J. Phys. Chem. A. 102 (1998). 9833-9837.
- ¹⁰ T. D. Poulsen, P. Ogilby and K. V. Mikkelsen. J. Phys Chem. A. 102 (1998) 9829-9832.
- ¹¹ T. D. Poulsen, P. R. Ogilby and K. V. Mikkelsen. J. Phys. Chem. A. 102 (1998) 8970-8973.
- ¹² R. A. Young and G. Black. J. Chem Phys 49 (1967). 2311-2318.
- ¹³ J. F. Noxon. J. Chem. Phys. 52 (1970) 1852-1873.
- ¹⁴ a) C. S. Foote and S. Wexler. J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3880-3881. b) C. S. Foote and S. Wexler. J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 3881-3882.
- ¹⁵ A. U. Khan and M. Kasha. J. Chem. Phys. 39 (1963). 2105-2109.
- ¹⁶ A. U. Khan and M. Kasha. J. Am. Chem. Soc. 92 (1970). 3293-3300.
- ¹⁷ R. W. Murray, M. L. Kaplan and A. W. Yager. J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 537-538.
- ¹⁸ E. Wasserman, R. W. Murray, M. L. Kaplan and A. W. Yager. J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 4160-4161.
- ¹⁹ E. McKeown and W. A. Waters. J. Chem. Soc. (B) (1966). 1040-1046.
- ²⁰ H. H. Wasserman and J. S. Sheffer. J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 3073-3075.
- ²¹ L. Elias, E. A. Ogryzlo and H. I. Schiff. Can. J. Chem. 37 (1959). 1680-1689.
- ²² F. Wilkinson, D.J. McGarvey and A. F. Olea. J. Phys. Chem. 98 (1994). 3762-3769.



- ²³ J. A. Baltrop and J. D. Coyle. Principles of Photochemistry. J. Wiley. Chichester (1981). Pag. 116
- ²⁴ M. Koizumi S. Kato, N. Mataga, T. Matsuura, Y Usui. Photosensitized reactions. Kagakudojin publishing Co. Kyoto, Japan. (1978).
- ²⁵ O. L. J. Gijzeman, F. Faufman and G. Poter. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II. 69 (1973). 708-720.
- ²⁶ A.P. Darmanyan and C. S. Foote. J. Phys. Chem. 96 (1992).3723-3728.
- ²⁷ F. Wilkinson and A. A. Abdel Shafi. J. Phys Chem. A. 103 (1999). 5425-5435.
- ²⁸ A. Darmanyan W. Lee and W. S. Jenks. J. Phys Chem A. 103 (1999). 2705-2711.
- ²⁹ C. S. Foote. Photochem. Photobiol. 54 (1991) 659.
- ³⁰ K. Gollnick. Advan. Chem. Ser. 77, (1968), 78.
- ³¹ C. Tanielian, R. Mechin, R. Seghrouchni and C. Schweitzer. Photochem. Photobiol. 71 (2000). 12-19.
- ³² C. Tanielian and C. Wolff. J. Phys Chem. 99 (1995) 9825-9830.
- ³³ C. Tanielian and C. Wolff. J. Phys Chem. 99 (1995) 9830-9837.
- ³⁴ C. Tanielian, C. Wolff and M. Esch. J. Phys Chem. 100 (1996) 6555-6560.
- ³⁵ P. C. C. Lee and M. A. J. Rodgers. Photochem. Photobiol. 45 (1987)79-86.
- ³⁶ V. S. Srinivasan, D. Podolski, N. J. Westrick and D. C. Neckers. J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 6513-6515
- ³⁷ C. R. Lambert and I. E. Kochevar. J. Am. Chem. Soc. 118 (1996). 3297-3298.
- ³⁸ D. C. Neckers and O. M. Valdes-Aguilera. Adv. in Photochem. 18 (1993). 315-393.
- ³⁹ E. Gandin, Y Lion and A. Van de Vorrst. Photochem. Photobiol. 37 (1983) 271-278.
- ⁴⁰ F. Rizzuto and J. D. Spikes. Photochem. Photobiol. 18 (1973) 49.
- ⁴¹ A. G. Kepka and L. I. Grossweiner. Photochem. Photobiol. 14 (1971) 621.
- ⁴² E. Oliveros, P. Suardi-Murasecco, T. Aminian-Saghafi and A. M. Braun. Helv. Chim. Acta. 74 (1991) 79
- ⁴³ R. H. Young and D. R. Brewer. Singlet Oxygen. Ranby and Rabek (ed). John Wiley & Sons. New York (1978). Cap. 6. Pag. 39.
- ⁴⁴ E. A. Ogryzlo and C. W. Tang. J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 5034-5036.
- ⁴⁵ R. H. Young, R. L. Martin, D. Feriozi, D. brower and R. Kayser. Photochem. Photobiol. 17 (1973). 233-244.

- ⁴⁶ A. P. Darmanyan, W. S. Jenks and P. Jardon. *J. Phys. Chem. A* 102 (1998). 7420-7426.
- ⁴⁷ C. S. Foote and R. W. Denny. *J. Am. Chem. Soc.* 90. (1968) 6233-6234.
- ⁴⁸ C. S. Foote Y. C. Chang and R. W. Denny. *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 5216-5217.
- ⁴⁹ C. S. Foote, Y. C. Chang and R. W. Denny. *J. Am. Chem. Soc.* 92(1970) 5218-5219.
- ⁵⁰ N. I. Krinsky. *Photophysiology.* 3, (1968), 123.
- ⁵¹ P. Singh and E. F. Ullman. *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 3018-3019.
- ⁵² A. A. Gorman, I. R. Gouldt and I. Hamblett. *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982). 7098-7104.
- ⁵³ Y. Elmes and C. S. Foote. *J. Am. Chem. Soc.* 114. (1992) 6044-6050.
- ⁵⁴ W. Adam, C. R. Saha-Möller, S. B. Schambony, K. S. Schmid and T. Whirth. *Photochem. Photobiol.* 70. (1999). 476-483.
- ⁵⁵ T. Wilson, D. E. Golan, M. S. Harris and A. L. Baumstrark. *J. Am. Chem. Soc.* 98, (1976), 1086-1090
- ⁵⁶ J. W. Hastings and T. Wilson. *Photochem. Photobiol.* 23, (1976), 461-463.
- ⁵⁷ W. Ando, T. Saiki and T. Migita. *J. Am. Chem. Soc.* 97, (1975), 5028-5030.
- ⁵⁸ W. Ando, J. Suzuki, T. Arai and T. Migita. *Tetrahedron.* 29,(1973). 1507-1509
- ⁵⁹ A. A. Frimer. *Chem. Rev.* 79, (1979), 359-387.
- ⁶⁰ T. Matsuura, N. Yoshimura, A. Nishinaga and I. Saito. *Tetrahedron* 28 (1972) 4933-4938.
- ⁶¹ E. F. Zwicker and L. I. Grossweiner. *J. Phys. Chem.* 67 (1963). 549-555.
- ⁶² M.J. Thomas and C. S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 27 (1977). 683-693.
- ⁶³ W. C. Neely, J. M. Martin and S.A. Barker. *Photochem. Photobiol.* 48. (1988). 423
- ⁶⁴ G. W. Grams. *Tetrahedron Lett.* 50 (1971) 4823-4825.
- ⁶⁵ G. W. Grams, K. Eskins and G. E. Inglett *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972). 866-868
- ⁶⁶ S. R. Fahrenholtz, F. H. Doleiden, A. M. Trozzolo and A. A. Lamola. *Photochem. Photobiol.* 20 (1974) 505-509
- ⁶⁷ N. A. García. *J. Photochem. Photobiol.* 22 (1994). 185-196.
- ⁶⁸ C. R. Stephens, K. Murai, K. J. Brunings and R. B. Woodward. *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4155-4158.
- ⁶⁹ J. Donny-Croteux. *J. Pharm. Belg.* 12 (1957). 179-264.
- ⁷⁰ J. J. Hlavka and P. Bitha. *Tetrahedron Letters.* 32 (1966). 3843-3846.

- ⁷¹ J. A. Wiebe and D. Moore. *J. Pharm. Sci.* 66 (1977). 186-189.
- ⁷² A. S. W. Li, C. F. Chignel and R. D. Hall. *Photochem. Photobiol.* 46 (1987). 379-382.
- ⁷³ A. K. Davies, J. F. McKellar, G. O. Phillips and A. G. Reid. *J. Chem. Soc. Perkin II.* (1979). 369-375.
- ⁷⁴ A. K. Davies, R. B. Cundall, Y. Dandiker and M. A. Slifkin. *Materials Science* 64 (1985). 936-939.
- ⁷⁵ *Farmacología.* M. Litter. 6ta Edición. El Ateneo Ed. Buenos Aires. (1980).
- ⁷⁶ *Tratado de Fisiología Médica.* Guyton and Hall 9na edición. Mc Graw Hill Interamericana. México (1998).
- ⁷⁷ D. Creed. *Photochem. Photobiol.* 39 (1984) 563-575.
- ⁷⁸ K. Endo, K. Seya and H. Hikino. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1988) 934-935.
- ⁷⁹ F. Jin, J. Leitich and C. von Sonntag. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 92 (1995) 147-153.
- ⁸⁰ S. Criado, A. T. Soltermann, J. M. Marioli and N.A. García. *Photochem. Photobiol.* 68 (1998) 453-458.
- ⁸¹ F. Rizzuto and J. D. Spikes. *Photochem. Photobiol.* 25 (1977) 465-476.
- ⁸² H. A. Sober. *Handbook of Biochemistry. Selected data for Molecular biology.* 2nd edition. The Chemical Rubber Co., Cleveland (1970).
- ⁸³ S. Criado. Tesis doctoral. U.N.R.C. (1997). Pag. 87.
- ⁸⁴ *The Merk Index.* 11th Ed. Centemial Ed. Raltway. N. J. USA. (1989).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y solventes.

Los antibióticos empleados fueron: Tetraciclina (Tet), Rolitetraciclina (Rol), Clorotetraciclina (Clo), Oxitetraciclina (Oxi), Doxiciclina (Dox), Demeclociclina (Dem), Metaciclina (Met) y Minociclina (Min), de Sigma. Las hormonas y compuestos relacionados (HTs), Tirosina y derivados iodados (Tyr): Tirosina (Tyr), 3-iodotirosina (MITyr), 3,5-diiodotirosina (DITyr), Tironina y derivados iodados (TNs): Tironina (TN), 3,5-diiodotironina (T2), 3,3',5'-triiodotironina (T3), Tiroxina (T4) y fenoxifenol (FOF) son marca Sigma. Los sensibilizadores, eosina (Eo) y rosa de bengala (RB) también de Sigma; el compuesto empleado como referencia, 9,10-dimetilantraceno (DMA) de Aldrich. Superóxido dismutasa (SOD) y fluorescamina de Sigma. Azida de sodio (NaN_3) de Merk. Todas estas sustancias fueron utilizadas sin posterior purificación. Otro compuesto de referencia empleado, furfural alcohol (FFA) de Riedel de Haen fue destilado en atmósfera de nitrógeno, previo a su empleo.

Las soluciones alcalinas se prepararon con NaOH de Sigma y los buffers con KPO_4H_2 y biftalato de potasio Merk. Ácido trifluoracético de Merk

Los solventes empleados fueron: agua tridestilada, D_2O (99,9 %) de Sigma u obsequio de NASA S.A., acetonitrilo (MeCN) y metanol (MeOH) de Sintorgan calidad HPLC.

Los discos vírgenes para los ensayos antibacterianos fueron provistos por Britania Company.

3.2 Preparación de soluciones.

Cuando se llevaron a cabo fotólisis en estado estacionario, se prepararon soluciones del sensibilizador de absorbancia 0.5-0.7 en el máximo de la banda de absorción de la región visible.

Al llevar a cabo medidas resueltas en el tiempo la absorbancia del sensibilizador fue de 0.1-0.3 a la longitud de onda de excitación del láser en el solvente adecuado. En esas soluciones se disolvió el sustrato en estudio en concentraciones de 1 a 4×10^{-4} M, dependiendo de la determinación a realizar.

En aquellos casos en donde se utilizó un compuesto de referencia se tomaron dos

alícuotas de la solución del sensibilizador, en una de ellas se disolvió el sustrato y en la otra el compuesto de referencia, de modo tal de tener igual concentración de sensibilizador en ambas soluciones.

En las determinaciones en las que se empleó algún inhibidor específico, la solución original del sensibilizador fue preparada con el inhibidor en la concentración correspondiente y a partir de ella se tomaron las alícuotas necesarias para preparar las soluciones de los compuestos en estudio.

Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente y con soluciones recientemente preparadas.

3.3 Equipos.

Los espectros de absorción fueron tomados con un espectrofotómetro Shimadzu de doble haz modelo UV-2401 y un intervalo de detección comprendido entre 190 y 820 nm.

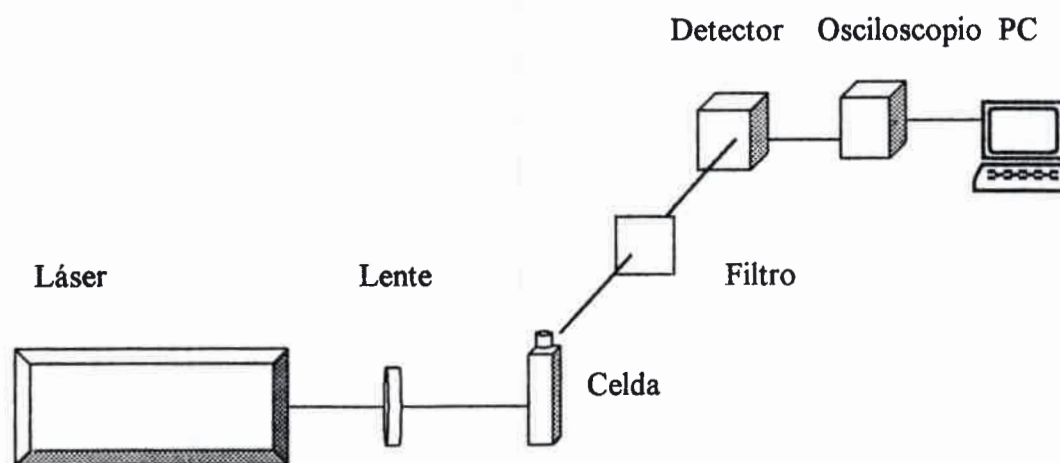
Los espectros de fluorescencia se tomaron con un espectrofluorómetro Fluoro Max TM que opera en el modo "photon counting". Su fuente de excitación es una lámpara de xenón, libre de ozono, de 150 W y el detector es un tubo fotomultiplicador sensible hasta 850 nm.

Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron con un electrodo Orion 97-08 específico para oxígeno disuelto. Consta de un par de electrodos de plata polarizados, sumergidos en solución de un electrolito, separados de la solución de medida por una membrana permeable a gases. El oxígeno difunde a través de la membrana del electrodo y es reducido a ión oxhidrilo. La corriente producida genera una diferencia de potencial la cual es convertida a unidades de parte por millón de oxígeno disuelto, la lectura se realiza en un pH-metro marca Orion 720. La calibración se efectúa en agua equilibrada con aire. Debido a las características del material de la membrana sólo es posible utilizarlo en medios que contengan un alto porcentaje de agua ($> 95\%$) y en un intervalo de pH entre 3 y 12.

La determinación de tiempos de vida de oxígeno singlete se llevó a cabo empleando la técnica de detección de fosforescencia de oxígeno singlete (a 1270 nm) resuelta en el tiempo (técnica TRPD). Como fuente de irradiación se empleó un láser de Nd:YAG (spectron, SL 400) con emisión a 1066nm, 532 nm, 355 nm y 266 nm,

correspondientes a la primera, segunda, tercera y cuarta armónica respectivamente, de 18 ns de ancho de pulso y 350 mJ en la primera armónica. La radiación fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ a $\lambda = 1270$ nm se detecta en ángulo recto usando un detector amplificado de germanio Judson J16/8sp luego de pasar por los filtros adecuados. La salida del detector es digitalizada por un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A) y transferida a través de una interfase IEEE a una computadora personal para llevar a cabo el procesamiento de las señales. En general se aplicaron 16 disparos para promediar y conseguir una buena relación señal/ruido, a partir de la cual se calcula el tiempo de decaimiento por un ajuste monoexponencial.

A continuación se muestra un esquema del equipo empleado en la aplicación de dicha técnica.



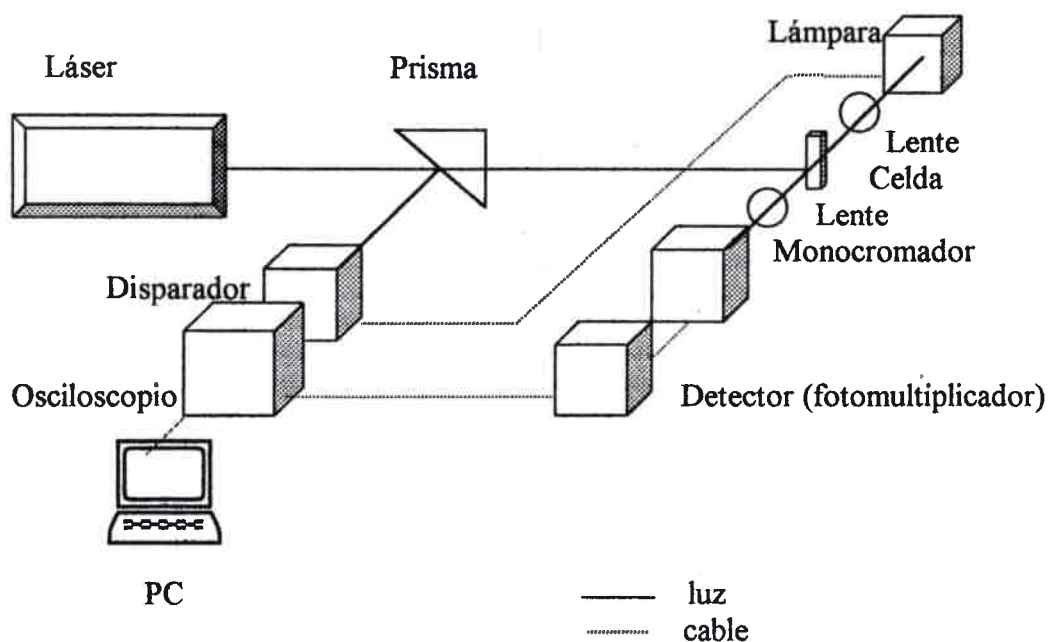
Esquema 3.1: Diagrama de bloques que representa un equipo de TRPD

En la determinación de tiempos de vida de especies en estado triplete se empleó la técnica de láser flash fotólisis. El arreglo experimental utilizado para la aplicación de esta técnica consiste en el láser de Nd:YAG, ya descrito, como fuente de excitación y una lámpara de xenón (marca PTI de 75 W) como luz analizadora, un sistema de filtros y lentes, un obturador, un porta celda para la muestra y el sistema de detección, constituido por un monocromador PTI, y un fotomultiplicador (Hamamatsu R666 ó RCA 4840) como detector. El haz de excitación se halla enfocado a 90° con respecto al haz analizador. La señal proveniente del fotomultiplicador es digitalizada por un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A) y transferida a una computadora personal por

medio de una interfase IEEE. El intervalo espectral accesible está comprendido entre 300 y 900 nm.

Las soluciones fueron desoxigenadas burbujeándolas con argón saturado con el solvente durante 30 minutos.

A continuación, en el esquema 3.2 se presenta un diagrama de bloques que representa un equipo de láser flash fotólisis.



Esquema 3.2: Diagrama de un equipo de láser flash fotólisis.

En las determinaciones de consumo de sustrato, llevadas a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se empleó un sistema Waters, constituido por una bomba cuaternaria, modelo 600, con detectores de fluorescencia, modelo 474 y de arreglo de diodos, modelo 996, controlado con el software Millenium desde una PC DTK.

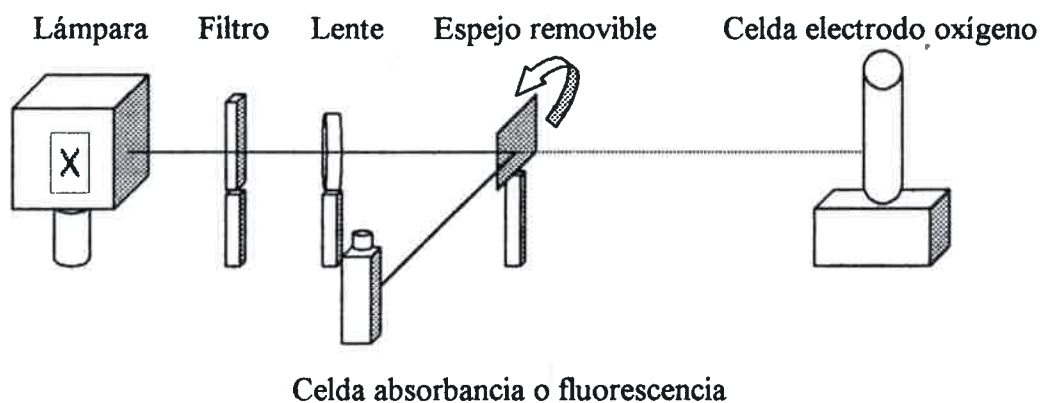
Otro equipo de HPLC empleado fue una bomba cuaternaria Hewlett Packard, de la serie 1050, con sistema de purga en línea, acoplado a un detector de masas VG Platform de Fisons Instruments, controlado por una computadora Digital, con el software MassLINX.

Para llevar a cabo la fotólisis sensibilizada, en estado estacionario, se irradiaron, con luz visible, las soluciones del sensibilizador (RB, Eo, o PN) y el sustrato fotooxidable, o el compuesto de referencia correspondiente.

Como fuente de irradiación se empleó una lámpara de cuarzo-halógeno de 150 W focalizada alternativamente, mediante la colocación de un espejo removible, en la celda de absorción (o fluorescencia) o en la celda que contiene el electrodo específico para oxígeno. Además fue usado un filtro de corte a 500 nm de modo que sólo el sensibilizador absorba la luz.

En las medidas en las que se empleó perinaftenona como sensibilizador el fotolizador de elección fue una unidad PTI, provista de un monocromador de alto paso y una lámpara de Xe de 150W de potencia. La irradiación se llevó a cabo a 400 ± 10 nm.

A continuación se muestra un esquema del diseño descrito.



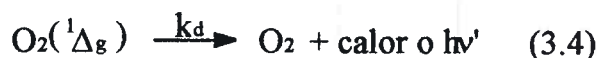
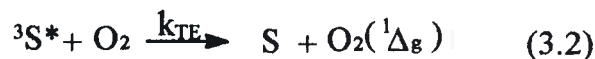
Esquema 3.3: Diagrama del diseño de un tren de fotólisis.

Las medidas electroquímicas fueron realizadas con un potenciostato EG&G PARC modelo 273, equipado con el software electroquímico PAR270 acoplado a una computadora personal.

Se empleó una celda de dos compartimentos. El electrodo de trabajo fue un alambre de platino, pulido mecánicamente, enjuagado con agua destilada y flameado a la llama de un mechero, previo a cada medida voltamétrica. El contraelectrodo fue un electrodo de platino de gran área y el electrodo de referencia de calomel saturado (ECS). Todas las experiencias se llevaron a cabo a 25°C . El solvente empleado fue una solución acuosa de NaOH 10 mM.

3.4 Métodos.

Es conveniente revisar someramente el esquema cinético del sistema en estudio para analizar los procedimientos empleados en las determinaciones llevadas a cabo en la tesis.



Donde:

S: Sensibilizador

Q: Sustrato fotooxidable a estudiar

k_{ISC} : Constante de velocidad de cruce entre sistemas

k_{ET} : Constante de velocidad de transferencia de energía

k_q^T : Constante de velocidad de inhibición de tripletes

k_d : Constante de velocidad de decaimiento de oxígeno singlete. Su valor se tomó como igual a la inversa matemática del tiempo de vida de oxígeno singlete en el solvente empleado y en ausencia de desactivadores.

k_q : constante de velocidad de desactivación física de oxígeno singlete por el sustrato

k_r : constante de velocidad de desactivación reactiva de oxígeno singlete por el sustrato

$k_r + k_q = k_t$: constante de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por el sustrato

3.4.1 Medidas de velocidades de reacción.

Las reacciones químicas de los sustratos con $O_2({}^1\Delta_g)$ conducen necesariamente al consumo de O_2 . Por lo tanto al medir velocidades de reacción es posible llevar a cabo tanto medidas de consumo de sustratos como de oxígeno disuelto. A continuación se describen los métodos empleados para cada caso y luego se presenta una discusión acerca de las ventajas y desventajas en el empleo de cada método.

Por consumo de oxígeno.

La determinación del consumo de oxígeno se llevó a cabo con un electrodo específico para oxígeno disuelto. Esta metodología sólo fue aplicada en medios acuosos debido a que, como ya se mencionó, la membrana del electrodo no puede ser empleada en otros solventes.

En todos los casos en los que se pretendió evaluar constantes cinéticas las determinaciones se realizaron de modo que el consumo máximo de oxígeno fuese inferior al 10 %. Se trabajó a bajas conversiones para evitar un eventual consumo de oxígeno por parte de los productos formados, lo cual implicaría una sobreestimación de las constantes de velocidad reactivas (k_r , ec. 3.6).

Por consumo de sustrato.

Siempre que fue posible, el consumo de sustrato se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia del compuesto en la longitud de onda del máximo de absorción.

Este método es inaplicable si el o los productos de reacción absorben en la misma región espectral que los sustratos en estudio.

Para determinar el consumo de T4, se empleó un equipo de HPLC Waters con un detector de arreglo de diodos y una columna de C18 de 15 x 0,4 cm. La elución de las muestras fue llevada a cabo con: Solvente 1: solución de F₃CCOOH 0,05 % en H₂O y Solvente 2: solución de F₃CCOOH 0,05 % en MeCN-H₂O 5:5 en volumen. La mejor resolución con tiempos de retención relativamente bajos se consiguió mediante un flujo de 1ml/min, isocrático con 15% del solvente 1 y 85% del solvente 2.

Ventajas de cada método.

Tanto las mediciones de consumo de sustrato como las de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación presentan ventajas y desventajas.

Medir las velocidades de consumo de sustrato por cualquier método presenta la ventaja de que no es necesario conocer la estequiometría de la reacción oxígeno:sustrato y oxígeno:referencia para poder calcular las constantes reactivas, k_r . Además, se puede trabajar tanto en agua como en solventes orgánicos y en todo el intervalo de pH, particularmente si se emplea espectrofotometría como modo de determinación de la

concentración de sustrato. No obstante, es frecuente que los productos de reacción absorban en la misma zona espectral que el sustrato fotooxidable, en esos casos se hace imposible la aplicación de esta técnica.

En situaciones en donde la absorción de los productos no es demasiado significativa es posible medir las velocidades de consumo de sustrato por espectrofotometría siempre que se trabaje a conversiones bajas (del orden de 5-10 %), de modo de minimizar el error en la lectura de absorbancia, debido a la aparición de productos en la misma región espectral que la de los reactivos.

Por otro lado, medir la velocidad de consumo de oxígeno permite independizarse en cierto modo de los productos formados y trabajar a conversiones mayores, sin embargo es aconsejable que las conversiones no superen el 15 % debido a que los productos pueden ser reactivos frente a oxígeno y por lo tanto cuanto mayor sea el porcentaje de conversión mayor será la sobrestimación en la cantidad de oxígeno consumido.

Una de las limitaciones para medir consumo de oxígeno es que el electrodo empleado para tal fin sólo permite trabajar en medios acuosos o que contengan un porcentaje de agua mayor que 95 %.

3.4.2 Determinación de las constantes de velocidad reactivas de los sustratos con $O_2(^1\Delta_g)$ (k_r).

Cualquiera sea el método empleado para medir las velocidades de reacción, el tratamiento de los datos para su análisis se debe ajustar a condiciones cinéticas de pseudoprimer orden. El resultado de este tratamiento cinético arroja una constante experimental, la cual contiene a la concentración en estado estacionario de $O_2(^1\Delta_g)$.

La concentración estacionaria de $O_2(^1\Delta_g)$, puede expresarse en función de la velocidad de generación de esta especie, luego, la velocidad de consumo de reactivo toma la forma de la ecuación (3.7):

$$-\frac{d[Q]}{dt} = v_f \frac{k_r^Q [Q]}{k_d + k_t^Q [Q]} \quad (3.7)$$

donde v_f es la velocidad de generación de $O_2(^1\Delta_g)$. A baja concentración de reactivo la constante de velocidad experimental toma la forma:

$$k_{\text{exp}(Q)} = \nu_f \frac{k_r^Q}{k_d} \quad (3.8)$$

Para determinar el valor de k_r es necesario emplear métodos comparativos. Éstos se basan en la comparación entre el comportamiento cinético de un compuesto de referencia (R) de constante de velocidad conocida (k_r^R) con relación al que exhibe el sustrato en estudio (Q).

Haciendo el mismo análisis que para Q se tiene que la constante de velocidad experimental para R es:

$$k_{\text{exp}(R)} = \nu_f \frac{k_r^R}{k_d} \quad (3.9)$$

El método empleado en este trabajo para la determinación de las constantes de velocidad reactivas es el propuesto por Foote y Ching¹, en el cual se comparan las pendientes de pseudoprimer orden de las velocidades de reacción de los sustratos en estudio con la de un compuesto de referencia, cuya k_r es conocida. La ec. (3.10) surge del cociente de las ec. (3.8) y (3.9).

$$\frac{k_{\text{exp}(Q)}}{k_{\text{exp}(R)}} = \frac{k_r^Q}{k_r^R} \quad (3.10)$$

Este método puede aplicarse con la presencia simultánea de Q y R o bien empleando soluciones independientes de Q y de R.

El empleo de la presencia simultánea de Q y R en la solución a irradiar puede presentar inconvenientes como asociaciones oscuras entre ambos y/o interferencias mutuas al determinar la velocidad de la reacción. Para evitar estas complicaciones en este trabajo se optó por irradiar soluciones independientes de los sustratos en estudio y la referencia.

Se debe destacar que la velocidad de reacción para el compuesto de referencia se mide cada vez que se hacen las determinaciones de k_r , de modo de reproducir siempre las condiciones de iluminación y geometría del fotolizador. Además las soluciones se preparan en idénticas concentraciones de sensibilizador y de reactivo, pH y temperatura.

3.4.3 Determinación de constantes de velocidad globales de desactivación de oxígeno singlete (k_t)

En la Figura 3.1 se muestra una señal característica de decaimiento de fosforescencia de oxígeno singlete. La intensidad de la señal, I , alcanza el valor I_0 , luego del pulso del láser, y decae exponencialmente con un tiempo de vida τ , representado en la Ecuación (3.11).

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (3.11)$$

donde I es directamente proporcional a la concentración de oxígeno singlete a cualquier tiempo t y τ es el tiempo de vida de fosforescencia de oxígeno singlete.

El detector toma un tiempo de respuesta de alrededor de 4 μ s. En consecuencia, para analizar las trazas de los decaimientos se tomaron los puntos a partir de 8 a 10 μ s.

El programa empleado en el análisis lleva a cabo ajustes por cuadrados mínimos no lineales (MicroCal Origin 3.0 ó 5.0 de MicroCal Software, Inc.).

Debe destacarse que el análisis de estos decaimientos no requieren métodos de deconvolución debido a que tanto el ancho del pulso del láser como el tiempo de respuesta del sistema de detección (4 μ s) no interfieren en la medida de los tiempos de vida de oxígeno singlete en los solventes empleados ($\geq 20 \mu$ s).

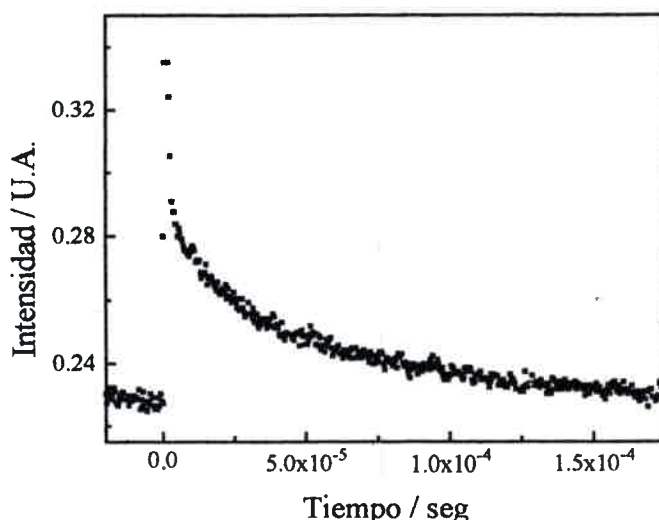


Figura 3.1. Señal típica del decaimiento de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm

La constante de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ ($k_D=1/\tau$) en presencia de un inhibidor

Q está dada por:

$$k_D = k_d + k_t [Q] \quad (3.12)$$

donde k_t es la constante de desactivación global de $O_2(^1\Delta_g)$ por el sustrato Q y $k_d (\equiv 1/\tau_0)$ es la constante de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por el medio.

La ecuación de Stern Volmer aplicable para la inhibición del tiempo de vida de una especie en su estado excitado por un compuesto Q establece que:

$$\tau_0/\tau = 1 + k_{SV} [Q],$$

con τ_0 , tiempo de vida del estado excitado en ausencia de Q y τ es el tiempo de vida de la especie en presencia de Q. $k_{SV} = k_q\tau_0$ y k_q es la constante de velocidad de desactivación del estado excitado por Q.

Del tratamiento de Stern Volmer, de acuerdo con la ec. (3.12), se obtiene a partir de la pendiente de la recta el valor de $k_t\tau_0$, conociendo τ_0 se calcula el valor de k_t .

Cuando se emplean sensibilizadores que desactivan a $O_2(^1\Delta_g)$, en la Ec. (3.12) se debe reemplazar k_d por $k'_d = k_d + k_S [S]$, donde $k_S [S]$ da cuenta de la desactivación del oxígeno excitado por el sensibilizador. En tales casos se puede determinar k'_d en función de la concentración del sensibilizador.

3.4.4 Efecto de pH sobre las constantes de velocidad reactivas.

Para determinar el efecto de pH, en medio ácido se empleó buffer de biftalato de sodio. Las soluciones de pH 7 y 8 se prepararon con buffer de fosfato diácido de potasio, mientras que un medio más alcalino se obtuvo ajustando el pH con soluciones de KOH midiendo con un pH-metro manual Checker. La velocidad de la reacción se determinó por consumo de oxígeno.

3.4.5 Estequiometría de la reacción.

La relación molar entre consumo de oxígeno y de los sustratos se determinó midiendo el consumo de oxígeno y de sustrato del mismo fotolizado, a bajas conversiones (menores que el 15%). Los resultados son un promedio de cuatro determinaciones.

3.4.6 Determinación de las constantes de inhibición del estado triplete excitado del sensibilizador por los sustratos (k_q^T).

Estas determinaciones se llevaron a cabo con el fin de establecer si existen y determinar los valores de las constantes de interacción entre los estados triplete excitados de los sensibilizadores y los sustratos en estudio.

La técnica empleada fue láser flash fotólisis.

Los tiempos de vida de las especies transitorias fueron determinados por medio de un ajuste monoexponencial del perfil de absorción del estado triplete del sensibilizador de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A_t = A_0 e^{-t/\tau^*} \quad (3.13)$$

donde

A_t : absorbancia a un tiempo t posterior al pulso de excitación

A_0 : absorbancia correspondiente a $t = 0$

τ^* : tiempo de vida de la especie excitada

siendo las condiciones límites: $A_t = A_0$, a $t = 0$ y $A_t \rightarrow 0$, cuando $t \rightarrow \infty$.

Para el ajuste exponencial de las trazas de decaimiento se empleó el programa de ajuste por cuadrados mínimos no lineales MicroCal Origin 3.0 ó 5.0 de MicroCal Software, Inc.

El método cinético de análisis es análogo al descrito anteriormente para la evaluación de k_t .

3.4.7 Determinación de rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1\Delta_g)$, ($\Phi\Delta$)

Para llevar a cabo estas determinaciones se apeló a la técnica de detección de fosforescencia resuelta en el tiempo.

Se aplicó un método comparativo² que consiste en determinar la dependencia de la intensidad de fosforescencia extrapolada a tiempo cero (I_0) con la fracción de luz absorbida por la solución, para soluciones de distinta concentración de la sustancia en estudio y de una referencia (R) cuyo valor de $\Phi\Delta$ es conocido.

La intensidad (I) de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ (Figura 3.1) es directamente proporcional a la concentración de esta especie en cualquier tiempo t . El

factor de proporcionalidad está dado por la constante de velocidad emisiva (k_e) y por un factor instrumental (K_{TR}), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = K_{TR} \cdot k_e \cdot [O_2(^1\Delta_g)]$$

y, a tiempo $t=0$

$$I_0 = K_{TR} \cdot k_e \cdot [O_2(^1\Delta_g)]_0$$

Por otra parte, la concentración de $O_2(^1\Delta_g)$ generada por el pulso del láser está relacionada con el rendimiento cuántico de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ ($\Phi\Delta$) por la siguiente ecuación:

$$[O_2(^1\Delta_g)]_0 = \Phi\Delta \cdot N_a / V$$

donde N_a es la cantidad de einstein absorbidos y V es el volumen de solución irradiada.

N_a , a su vez está relacionado con la energía incidente del láser E_0 .

$$N_a = N_0 \cdot (1 - 10^{-A}) = (\lambda_{exc} / h \cdot c) \cdot E_0 \cdot (1 - 10^{-A}),$$

con N_0 , número de einstein incidentes,

λ_{exc} , la longitud de onda de excitación,

A , la absorbancia del sensibilizador a λ_{exc} ,

h , la constante de Planck y c es la velocidad de la luz.

Combinando las tres últimas ecuaciones, e incluyendo todos los términos constantes en una nueva constante κ_{TR} , se obtiene la siguiente relación:

$$I_0 = \kappa_{TR} \cdot \lambda_{exc} \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot k_e \cdot \Phi\Delta \cdot E_0. \quad (3.14)$$

A partir de esta última ecuación se advierte que la pendiente de un gráfico de I_0 vs. fracción de luz absorbida ($1 - 10^{-A}$) contiene a $\Phi\Delta$.

El valor de $\Phi\Delta$ para un dado compuesto se puede obtener comparando la pendiente de los gráficos de I_0 versus $1 - 10^{-A}$ de tal compuesto con la de una sustancia de referencia (trabajada en idénticas condiciones), cuyo valor de $\Phi\Delta$ es conocido, a través de la siguiente relación:

$$\text{Pend. Muestra} / \text{Pend. R} = \Phi\Delta \text{ Muestra} / \Phi\Delta \text{ R} \quad (3.15)$$

Debido a que I_0 puede llegar a un límite de saturación, dependiendo de la

intensidad del láser es que previo a las determinaciones se debe asegurar que se está midiendo en la región de energía de excitación a la cual la respuesta es lineal.

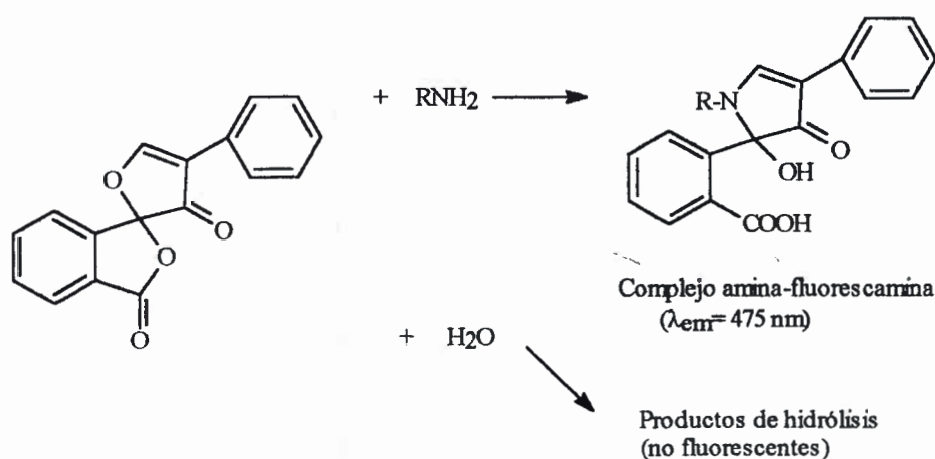
3.4.8 Determinación de la reactividad de grupos amino primarios.

La posible participación del grupo $-NH_2$ de las hormonas durante el transcurso de la reacción de fotooxidación fue investigada utilizando la metodología propuesta por Udenfriend *et al.*³ El método consiste en la determinación fluorométrica de grupos amino primarios por la formación de un complejo fluorescente amina primaria-fluorescamina (4-fenilpiro[furan-2(3H), 1-ftalan]-3,3-diona).

La estructura química de la fluorescamina y la reacción de formación del complejo amina-fluorescamina se representan en el esquema 3.4.

El fluoróforo (complejo grupo amino primario-fluorescamina) se caracteriza por tener una intensidad máxima de fluorescencia centrada en 475 nm.^{3,4}

Numerosos factores hacen que la fluorescamina sea adecuada para el análisis de aminas primarias incluyendo aminoácidos, péptidos y proteínas. Su reacción con aminas primarias es casi instantánea en medio acuoso y a temperatura ambiente. En una fracción de segundos la reacción se completa y en menos de un minuto se destruye el exceso de reactivo. Los productos son altamente fluorescentes, mientras que el reactivo y sus productos de degradación no lo son. La intensidad de fluorescencia resultante es proporcional a la concentración de amina y permanece estable por varias horas.³



Esquema 3.4; Reacción de una amina primaria con fluorescamina, en medio acuoso.

El método experimental consistió en agregar a 3 ml de la solución del sustrato de

concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, sin fotolizar y fotolizada a distintos tiempos, $150 \mu\text{l}$ de una solución $6 \times 10^{-3} \text{M}$ de fluorescamina en acetona. Inmediatamente se agita y se mide la fluorescencia del complejo a 475nm .

3.4.9 Determinación de potenciales de oxidación de media onda.

Este estudio se llevó a cabo con el fin de esclarecer el mecanismo de inhibición de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por los compuestos del grupo de las hormonas tiroideas. Se determinaron los potenciales de oxidación de TN, T2 y T4 empleando voltametría cíclica. En el análisis de resultados se aplicó el método de electroanálisis semiintegral propuesto por Oldham,⁵⁻⁷ que permite relacionar la intensidad faradaica con la concentración superficial de especies electroactivas.

Si las corrientes convolucionadas alcanzan una corriente límite, lo cual indica que el proceso de transferencia de carga está gobernado por difusión, la corriente límite (I_L) es:

$$I_L = nFAD_0^{1/2}C_0^*$$

Siendo n el número de electrones intercambiados, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión y C_0^* la concentración en el seno de la solución.

Si la transferencia electrónica es nernstsiana a la velocidad en que se realiza el experimento voltamétrico, entonces:

$$E = E_{1/2} + RT/nF \ln (I_L - I(t)/I(t))$$

Donde: $I(t)$ es la corriente convolucionada y

$$E_{1/2} = E_f^0 + RT/2nF \ln (D_R/D_O).$$

Con E_f^0 , potencial formal de la hemirreacción cuando los coeficientes de actividad de las especie oxidada (O) y de la reducida (R) son constantes, D_R y D_O , los coeficientes de difusión de las especies reducidas y oxidadas, respectivamente.

Un gráfico de E vs. $Y (= \ln(I_L - I(t)/I(t)))$ será lineal y de la ordenada al origen se obtiene $E_{1/2}$.

3.4.10 Análisis microbiológico.

Estas determinaciones fueron llevadas a cabo por el grupo del Dr. Sánchez de la Universidad Nacional de la Patagonia.

La actividad antibacteriana de las soluciones de tetraciclinas fue evaluada con soluciones fotolizadas a diferentes tiempos de irradiación empleando el método de Kirby-Bauer.⁸

La cepa patrón utilizada fue *Staphylococcus aureus*.

El crecimiento celular fue ensayado en fase logarítmica sobre placas de Petri empleando un medio de cultivo de Mueller Hilton.

Los experimentos se llevaron a cabo en soluciones de pH superiores a 10 con el fin de obtener altas conversiones fotooxidativas del antibiótico en cortos tiempos de fotólisis para evitar la degradación de los productos primarios de la reacción y del sensibilizador.

REFERENCIAS

- ¹ C. S. Foote and T. Y-Ching. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, (1975), 6209.
- ² S. Nonell i Marrugat, Ph D. Dissertation, MPI für Strahlenchemie and IQS. Barcelona, Spain. (1988) Schriftenreihe des Max Plank Instituts für Strahlenchemie Nr 44.
- ³ S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber and M. Weigele. *Science*. 178, (1972), 871.
- ⁴ M. Weigele, S. L. DeBernardo, J. P. Teng and W. Leimgruber. *J. Am. Chem. Soc.* 94, (1972), 5927.
- ⁵ K. B. Oldham. *Anal. Chem.* 41, (1969), 1904.
- ⁶ K. B. Oldham. *Anal. Chem.* 44, (1972), 196.
- ⁷ K. B. Oldham. *Anal. Chem.* 44, (1972), 1121.
- ⁸ E. Sánchez, I. Gutiérrez, M. Luiz, G. Martínez, S. Criado and N. A. García. *Dyes and Pigments*. 37, (1998), 93.

4 TETRACICLINAS: RESULTADOS

4.1 Estructura química.

La estructura química de las ocho tetraciclinas estudiadas se presenta a continuación.

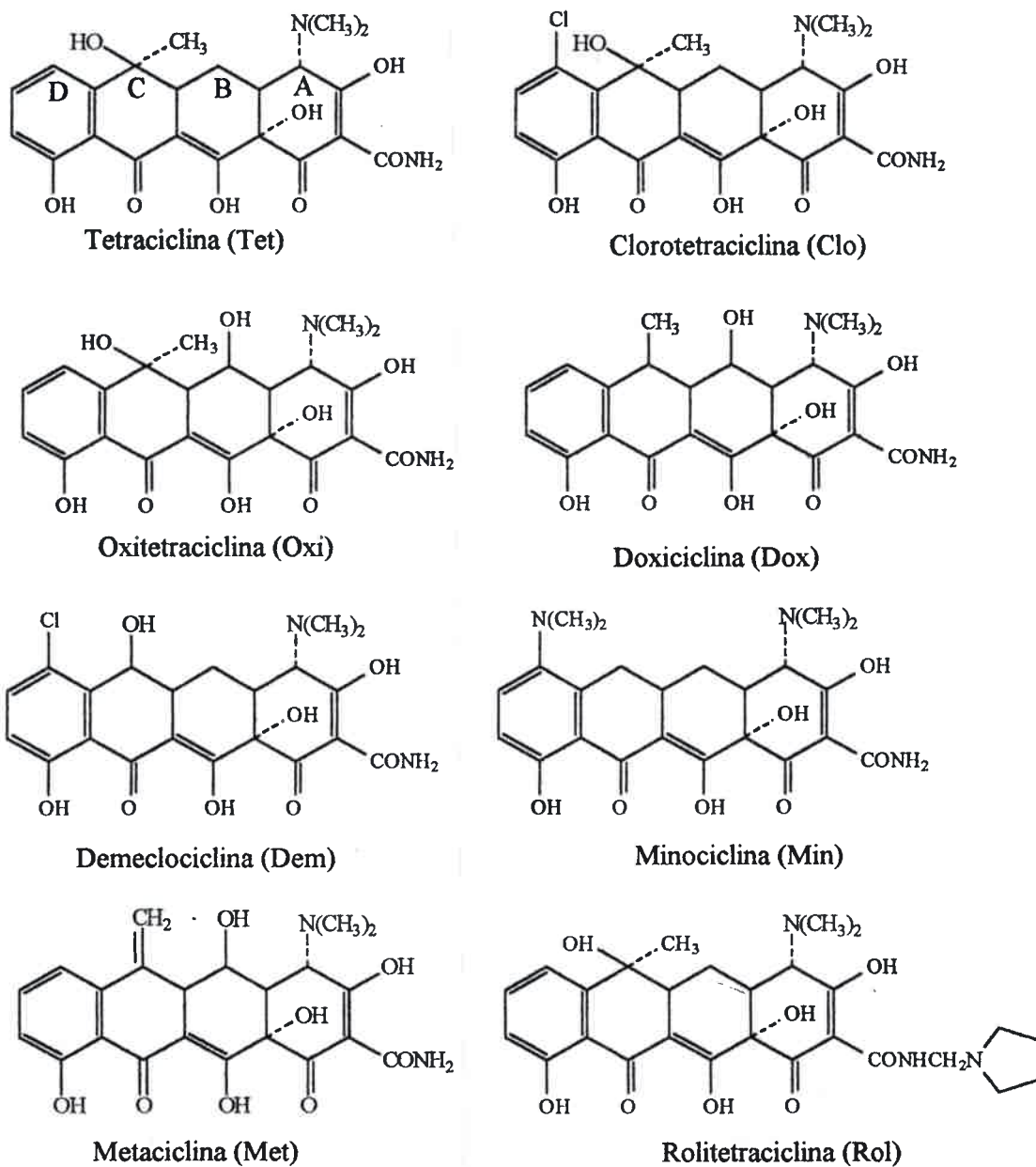


Figura 4.1: Estructura química de las tetraciclinas estudiadas.

4.2 Selección del sensibilizador.

Los colorantes xanténicos como eosina o rosa de bengala son los de elección cuando se trabaja en soluciones acuosas. No obstante, es importante establecer qué tipo de procesos operan, considerando también a las sustancias que se emplean como inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$. Cuando se trata de determinar constantes de velocidad globales de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t), se buscan sensibilizadores que tengan altos valores de $\Phi\Delta$, mientras que para determinar constantes reactivas (k_r), además del requisito anterior es muy importante buscar sensibilizadores que den procesos de tipo II puros. No siempre es posible conseguir esta última condición, es por ello que en el estudio de los procesos reactivos se ha trabajado paralelamente con Eo y RB. Más adelante se verá que para determinar k_r resultó más adecuado Eo, mientras que RB fue empleado para determinar k_t , ya que presenta un valor de $\Phi\Delta$ mayor.

4.3 Fotólisis en estado estacionario.

4.3.1 Consumo de sustrato.

Con el fin de establecer si existe reactividad de las TCs en las condiciones de pH, solvente y sensibilizador en las que se pretende trabajar, se comenzó llevando a cabo un estudio de consumo de sustrato en diversas condiciones.

Al irradiar con luz de longitud de onda mayor que 500 nm una solución acuosa alcalina (10 mM NaOH) de RB o de Eo con cualquiera de las ocho TCs se advierten cambios en los espectros de absorción de estos compuestos con el tiempo de fotólisis, como se puede observar en la Figura 4.2.

Si la solución es de pH 7, la evolución espectral del sustrato con el tiempo de fotólisis es la que se muestra en la Figura 4.3.

Todos los espectros se tomaron empleando la solución de sensibilizador como línea de base.

Comparando las figuras se advierte que la velocidad de consumo del sustrato muestra una fuerte dependencia con el pH.

Estas mismas diferencias se advierten cuando se fotolizan soluciones de MeCN: MeOH 8:2 con y sin NaOH, o si se emplea Eo como sensibilizador.

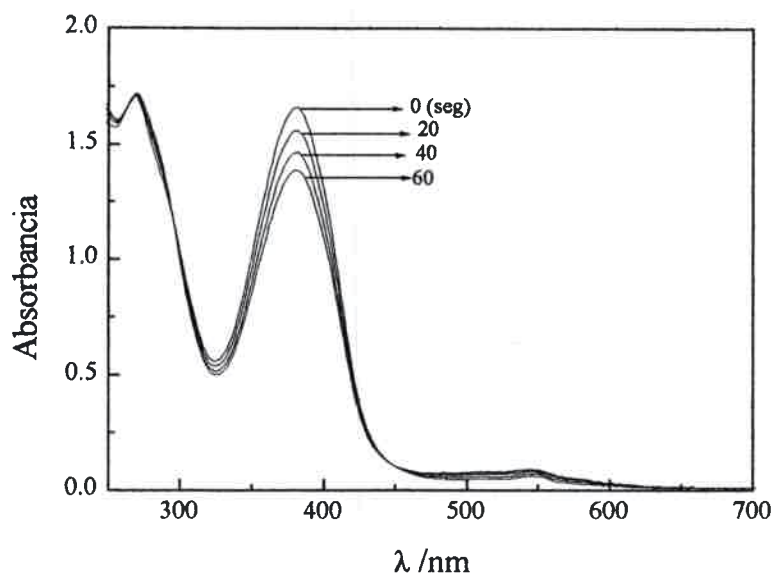


Figura 4.2: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada con RB en H_2O , NaOH 10mM.

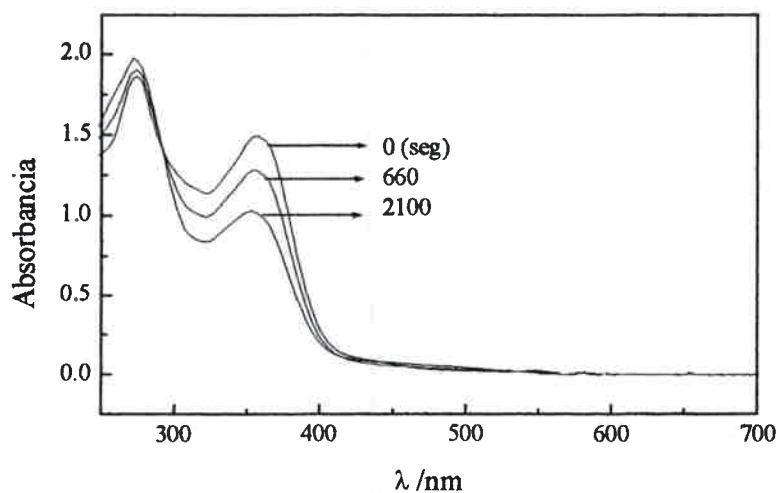


Figura 4.3: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada por RB en H_2O a pH 7

4.3.2 Consumo de oxígeno.

Para establecer si la reacción observada en 4.3.1 involucra al oxígeno se procedió a determinar el consumo de oxígeno en las mismas condiciones que las de la sección anterior.

Se observó, al igual que con el consumo de sustrato, que el efecto del pH sobre la velocidad de consumo de oxígeno es destacable. La Figura 4.4 muestra la disminución con el tiempo de fotólisis de la concentración de oxígeno en soluciones acuosas alcalina y neutra de Tet, empleando idénticas concentraciones de RB como sensibilizador e irradiando con luz de $\lambda > 500$ nm.

4.4 Estequiometría de la reacción.

Considerando que se observa tanto consumo de O_2 como de TCs, se procedió a determinar la estequiometría de la reacción para soluciones acuosas alcalinas de todas las TCs, empleando Eo como sensibilizador.

Los resultados obtenidos para las relaciones de $\Delta[O_2]/\Delta[TC]$ en el mismo tiempo de irradiación se presentan en la Tabla 4.1, y resultan del promedio de cuatro determinaciones para cada compuesto.

En el caso de Clo se produce una deformación en su banda espectral debido a una superposición con la banda de absorción del producto formado, a medida que se fotoliza. Por lo tanto no fue posible determinar la relación estequiométrica. Considerando la semejanza en su estructura con Dem, es de esperar el mismo valor que para este compuesto.

Tabla 4.1: Relación estequiométrica entre el consumo de oxígeno y de sustrato para cada compuesto.

Tetraciclina	Rel. esteq. (mol O_2 /molTC)
Tet	2
Clo	nd
Dox	3
Oxi	2
Met	2.5
Rol	2
Dem	2
Min	2

nd: no determinada

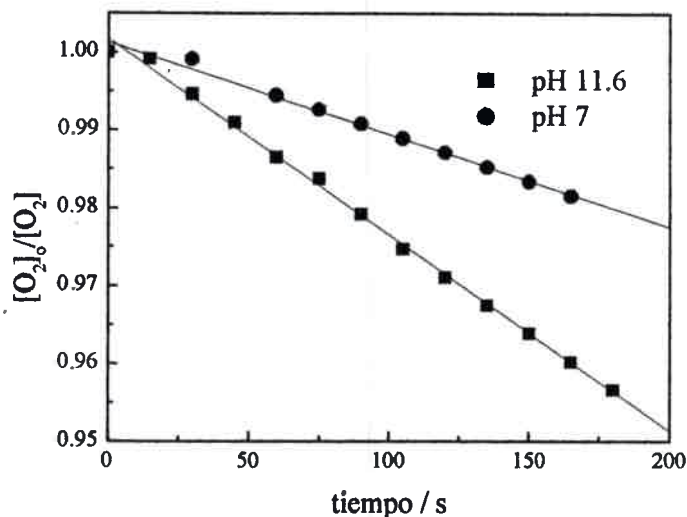


Figura 4.4: Velocidad de consumo de O₂ por fotólisis sensibilizada con Eo de Tet en solución acuosa de NaOH de pH 11.6 y de buffer pH 7

4.5 Discriminación entre procesos de Tipo I y Tipo II

Ya se mencionó que los procesos de Tipo I son aquellos en los cuales el sustrato en estudio reacciona con otras especies excitadas distintas de O₂(¹Δ_g), mientras que los procesos de Tipo II sólo involucran reacción con O₂(¹Δ_g). También se describieron algunos métodos que permiten discriminar entre los mencionados procesos. En esta sección se presentan los resultados obtenidos con los métodos empleados.

4.5.1 Efecto de la presencia de NaN₃ sobre la velocidad de consumo de O₂.

NaN₃ es un inhibidor específico de O₂(¹Δ_g). El mecanismo de inhibición es completamente físico, es decir, no reacciona químicamente¹. Su constante de velocidad específica de inhibición en agua es de 7.9×10⁸ M⁻¹s⁻¹, de modo que en una concentración de 5×10⁻² M compite efectivamente con cualquier sustrato cuya constante de velocidad de inhibición de O₂(¹Δ_g) sea del orden de 1×10⁸ M⁻¹s⁻¹ y su concentración de 0.5 mM.

En la Figura 4.5 se muestran gráficos de primer orden para la velocidad de consumo de O₂ con y sin NaN₃ por Tet y por Alcohol furfúrico (FFA). FFA es el compuesto empleado como referencia siempre que se sigue la cinética por consumo de oxígeno debido a que, en las condiciones de trabajo, sólo reacciona con O₂(¹Δ_g). Su

comportamiento cinético es perfectamente conocido y se sabe que no varía con el pH del medio.

El sensibilizador empleado fue Eo. El solvente es una solución acuosa de NaOH 10 mM.

Se debe destacar que la misma rutina se empleó para todas las TCs estudiadas y se observó en todos los casos el mismo efecto que para Tet.

Trabajando con RB se encontró que el consumo de O_2 se ve menos afectado por la presencia de azida de sodio. Este es uno de los motivos que llevan a optar por Eo antes que por RB en la determinación de k_r .

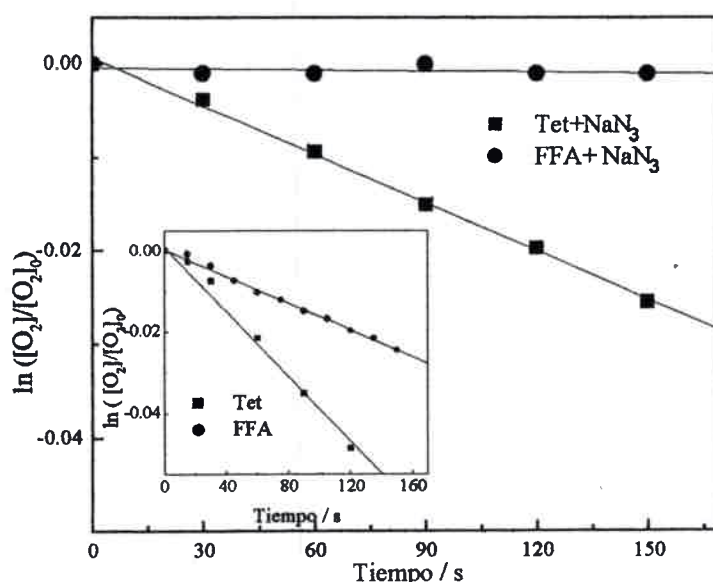


Figura 4.5: Gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por Tet y FFA en presencia de NaN_3 . Gráfico inserto: lo mismo en ausencia de NaN_3 . Sensibilizador: Eo

4.5.2 Efecto de superóxidodismutasa sobre la velocidad de consumo de O_2 .

Superóxidodismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la dismutación de anión superóxido, generando O_2 y O_2^{-2} , de acuerdo con la siguiente reacción:



Las constantes de velocidad reactivas fueron determinadas empleando Eo como sensibilizador, debido a que se ha reportado que ${}^3RB^*$ genera O_2^- en un 25 % (aunque

estos resultados no son concluyentes, ver pag. 19). No obstante, debido a la semejanza estructural entre Eo y RB (ver pag. 18 y 19), y considerando que con Eo se observa un consumo de O_2 residual cuando se fotoliza en presencia de NaN_3 , se ha estudiado cuál es el efecto de esta enzima sobre la velocidad de consumo de O_2 por parte de Tet, si el sensibilizador es Eo. No se observa cambio alguno en la velocidad de consumo de O_2 . Lo cual permite concluir que Eo no genera O_2^- y, además que SOD no compite efectivamente con TCs por $O_2(^1\Delta_g)$ en las concentraciones empleadas ($7 \mu\text{g/ml}$).²

4.5.3 Fotólisis estacionaria en ausencia de O_2 .

Se fotolizaron soluciones acuosas alcalinas de Tet, en ausencia de oxígeno, empleando tanto Eo como RB como sensibilizadores. Este método revela la posible existencia de reacciones en las cuales no interviene el oxígeno.

La evolución espectral de Tet, siempre en solución de NaOH 10mM, desgasada por burbujeo de Ar durante 20 minutos, se muestra en la Figura 4.6. La Figura 4.7 presenta los cambios producidos en el mismo sistema pero en presencia de O_2 , con fines comparativos. Resultados análogos se encuentran cuando se emplea Eo como sensibilizador.

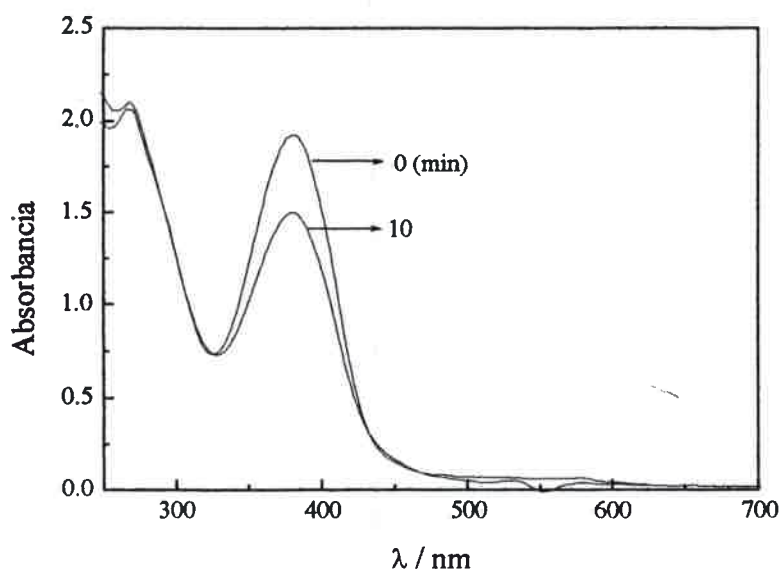


Figura 4.6 Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada con RB en solución acuosa de NaOH 10 mM en ausencia de O_2 .

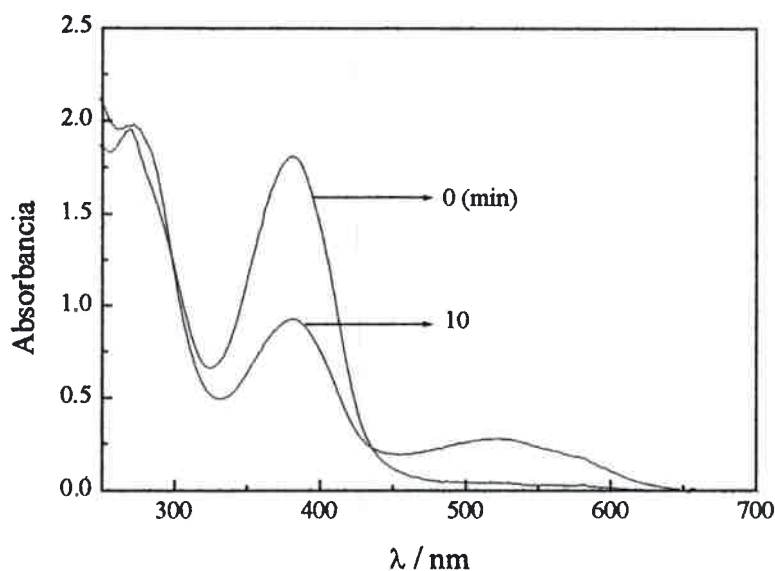


Figura 4.7: Evolución espectral de Tet por fotólisis sensibilizada en iguales condiciones a las de la Fig. 4.6, pero en presencia de O₂.

4.6 Técnicas resueltas en el tiempo.

4.6.1 Interacciones con el sensibilizador.

Con las observaciones de la sección anterior resultó evidente la existencia de reacciones entre TCs y algún estado excitado de RB, es por ello que para establecer la magnitud de tales interacciones se empleó láser flash fotólisis. Mediante esta técnica es posible determinar la constante de inhibición del estado triplete del sensibilizador por los sustratos estudiados.

La presencia de Tet en una solución acuosa de RB inhibe el tiempo de vida del estado triplete de este sensibilizador. Se excitó con pulsos láser a $\lambda = 532 \text{ nm}$ y analizando a 650 nm , correspondiente al máximo de absorción³ de ³RB* se observaron trazas de decaimiento como las de la Figura 4.8.

Mediante la ecuación de Stern Volmer se determinó la constante de velocidad (k_q^T) para este proceso de inhibición. Se obtuvo un valor de $3,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El gráfico correspondiente se muestra en la Figura 4.9.

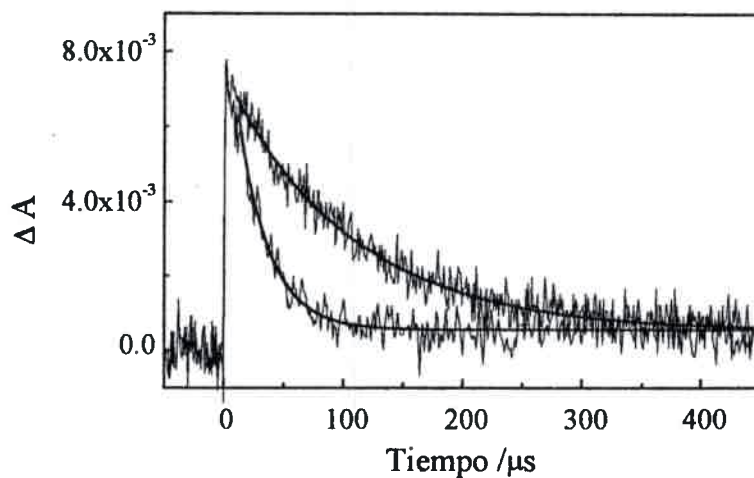


Figura 4.8: Decaimiento de la absorción del estado triplete de RB en ausencia (curva superior) y en presencia de Tet 0.2 mM (curva inferior).

La interacción entre TCs con el estado singlete de RB se descarta porque $^1RB^*$ presenta un tiempo de vida en agua de 0.01-0.05 ns⁴ y no puede ser interceptado eficientemente por el inhibidor en concentraciones del orden de 100 μM , como las empleadas en el trabajo.

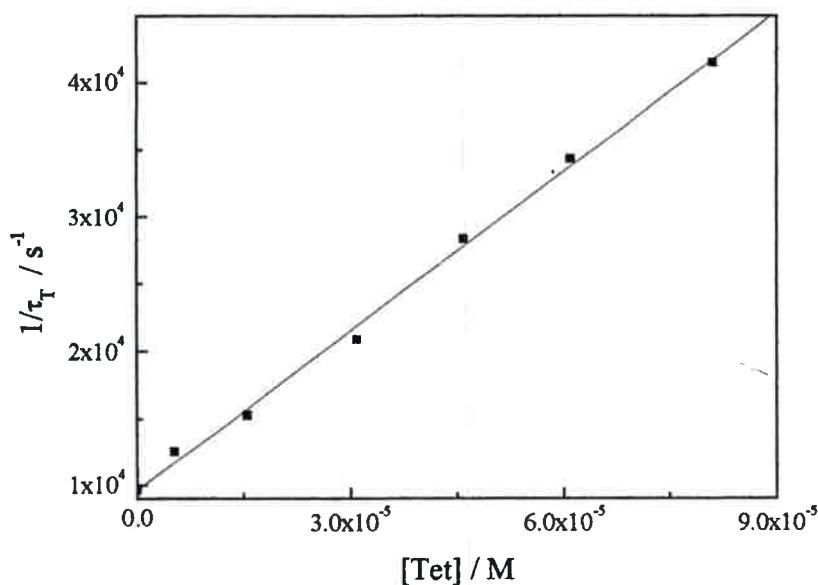


Figura 4.9: Gráfico de Stern Volmer para la inhibición de $^3RB^*$ por Tet en solución acuosa de NaOH 10 mM.

4.6.2 Interacciones con $O_2(^1\Delta_g)$.

La técnica de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo es un método inequívoco para establecer la existencia de procesos de Tipo II

Llevando a cabo medidas empleando esta técnica, se comprobó que la presencia de cualquiera de las TCs disminuyen el tiempo de vida media de $O_2(^1\Delta_g)$.

La Figura 4.10 muestra el efecto de un agregado de Min a una solución acuosa alcalina (NaOH 10 mM) de RB sobre la señal de emisión fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$. Efectos análogos se observan con los otros antibióticos.

Estos estudios se llevaron a cabo en solución acuosa y en mezclas de MeCN-MeOH 8:2, ambos con NaOH 10 mM, con el fin de verificar si existe algún efecto de solvente.

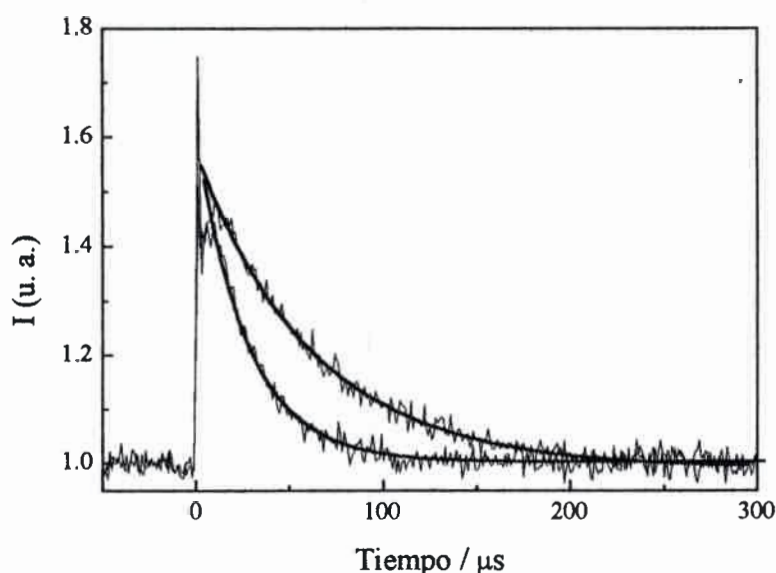


Figura 4.10: Decaimiento de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ sensibilizada por RB en solución acuosa de NaOH 10 mM (curva superior) y en presencia de Min 0.04 mM (curva inferior)

4.7 Constantes de velocidad globales y reactivas con $O_2(^1\Delta_g)$

Una vez establecidos todos los eventos reactivos posibles se determinan las constantes cinéticas que involucran a $O_2(^1\Delta_g)$.

4.7.1 Constantes de interacción global entre TCs y $O_2(^1\Delta_g)$.

La Figura 4.10 muestra cómo disminuye el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ con el agregado de Min. Efectos semejantes se advierten para las otras TCs.

Midiendo el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ para varias concentraciones de cada una de las TCs, se consigue un juego de datos que permite obtener gráficos de Stern Volmer, a partir de las pendientes de éstos se pueden calcular los valores de las constantes globales de inhibición (k_t).

Una muestra de tales gráficos se presenta en la Figura 4.11, y los resultados obtenidos en las Tablas 4.2 y 4.3.

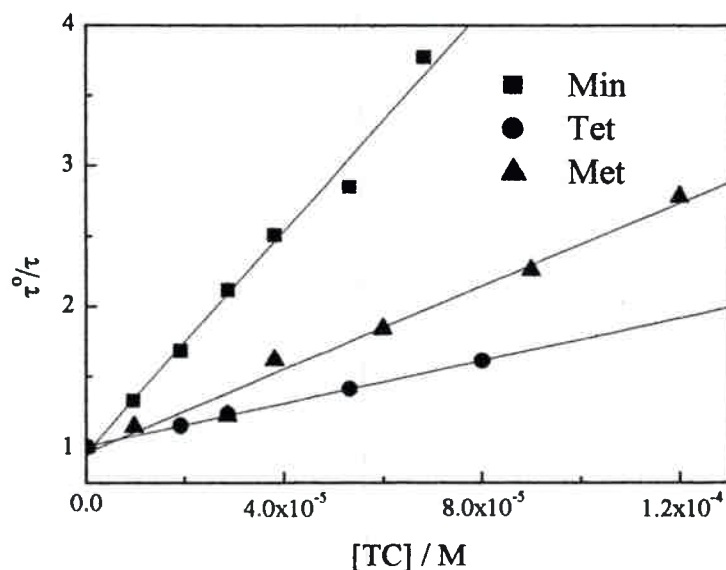


Figura 4.11: Gráficos de Stern Volmer para la inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por Min, Tet y Met en solución acuosa de NaOH 10mM. Sensibilizador RB.

4.7.2 Constantes de interacción reactiva de TCs con $O_2(^1\Delta_g)$.

Se determinaron por fotólisis estacionaria en solución acuosa alcalina y MeCN MeOH 8:2, también alcalino para todas las TCs estudiadas. El sensibilizador empleado fue Eo.

Los estudios cinéticos llevados a cabo en solución acuosa se efectuaron midiendo la velocidad de consumo de O_2 . En la Figura 4.12 se muestran los gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por algunas TCs y por el compuesto de referencia





empleado. En este solvente el compuesto de referencia fue FFA, cuya constante de interacción global frente a $O_2(^1\Delta_g)$ es de $1,2 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, y la relación estequiométrica $O_2/FFA=1$.⁵

Para evaluar los valores de k_r determinados por consumo de O_2 fue necesario además conocer la relación estequiométrica O_2/TC , tales resultados fueron presentados en la Tabla 4.1.

Las constantes de velocidad obtenidas para soluciones con solventes orgánicos fueron determinadas midiendo la velocidad de consumo de sustrato (por espectroscopía de absorción) debido a las limitaciones que presenta el electrodo de O_2 para trabajar en estos medios (pág. 38).

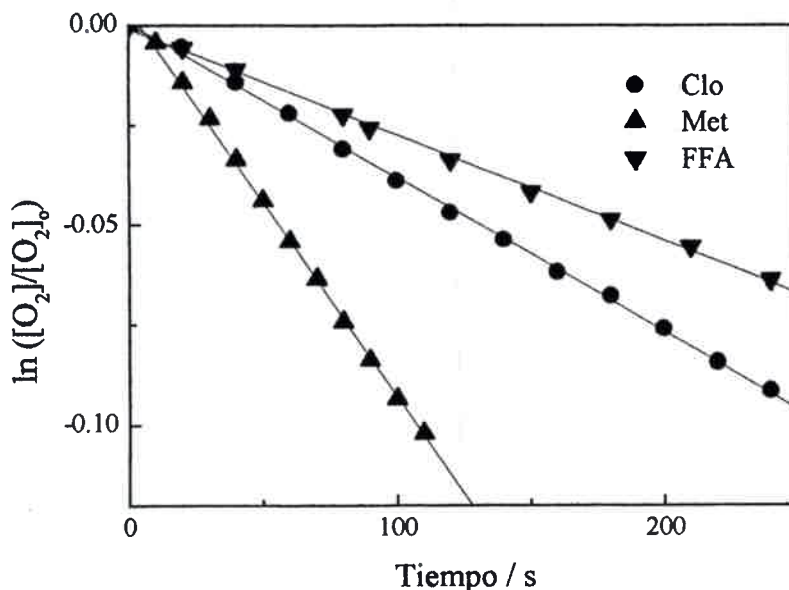


Figura 4.12: Gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por Clo, Met y FFA (todos 0.5 mM) en solución acuosa de NaOH 10 mM. Sensibilizador: Eo.

La Figura 4.13 muestra los gráficos de primer orden obtenidos para el consumo de algunas de las TCs y de la referencia, en solución de MeCN MeOH 8:2 en volumen con NaOH 10 mM. El compuesto de referencia usado para este caso fue 9,10-dimetilantraceno. Su k_t es de $5.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ en el solvente empleado, según lo indica M. Gutiérrez en su tesis doctoral.⁶

Debe destacarse que los valores de k_r en ambos solventes deben ser tomados como límites superiores debido a que se advierte la existencia simultánea de Procesos de Tipo I. En la sección de discusión se analizará con detalle lo antedicho.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 4.2 y 4.3 para agua y solvente orgánico, respectivamente.

Ya que k_r y k_t independientemente no permiten evaluar la reactividad de un sustrato, un parámetro más adecuado que las constantes específicas de velocidad es la eficiencia reactiva,⁷ dada por la siguiente expresión:

$$\phi_r = k_r[\text{TC}] / (k_d + k_t[\text{TC}])$$

$$\text{con } [\text{TC}] = 1 \text{ mM y } k_d = 1/\tau^0.$$

Los resultados de tales cálculos se presentan en las Tablas 4.2 y 4.3.

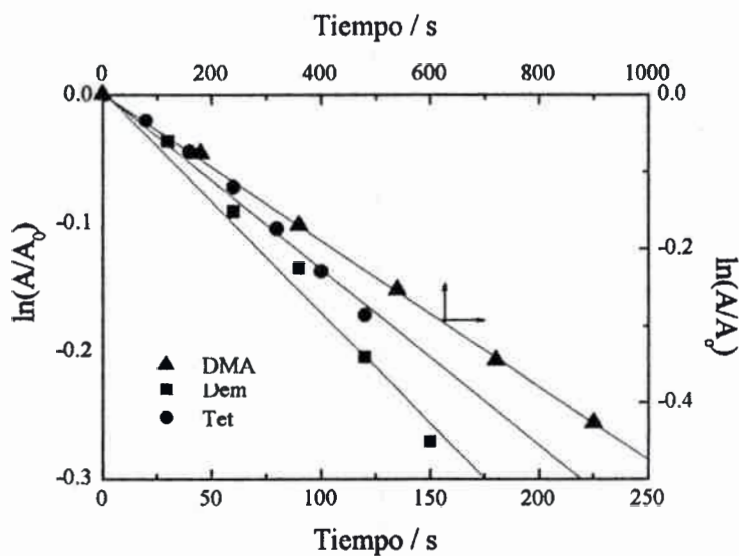


Figura 4.13: Gráficos de primer orden para el consumo de Dem, Tet y DMA en MeCN MeOH 8:2 en v con NaOH 10 mM. Sensibilizador: Eo.

Tabla 4.2: Constantes reactivas, globales y eficiencia reactiva de interacción de TCs con $O_2(^1\Delta_g)$ en solución acuosa de NaOH 10 mM

Tetraciclina	$k_t / 10^8 M^{-1} s^{-1} (\pm 5\%)$	$k_r / 10^8 M^{-1} s^{-1} (\pm 5\%)$	ϕ_r
Tet	2.5	1.3	0.26
Clo	2.9	0.9	0.17
Dox	2.0	1.5	0.33
Oxi	2.0	1.3	0.28
Met	4.5	2.4	0.34
Rol	4.2	1.7	0.25
Dem	2.8	1.7	0.32
Min	6.4	1.1	0.12

Tabla 4.3: Constantes reactivas y globales y eficiencias reactivas, para TC en MeCN-MeOH 8:2 v/v con NaOH 10 mM

Tetraciclina	$k_t / 10^8 M^{-1} s^{-1}$	$k_r / 10^8 M^{-1} s^{-1}$	ϕ_r
Tet	2.6	1.7	0.56
Clo	3.0	nd	nd
Dox	4.4	1.2	0.25
Met	3.2	1.2	0.33
Rol	3.8	1.6	0.38
Dem	2.8	2.1	0.65
Min	4.6	1.8	0.35

nd: no determinado.

4.8 Efecto de pH.

Los compuestos fenólicos son reactivos frente a $O_2(^1\Delta_g)$, particularmente en medio alcalino, en el cual prevalece la especie fenóxido.⁸

Las constantes de velocidad reactivas para fenol han sido determinadas en medios de diversos pH. Si se representa $\log k_r$ en función de pH se encuentra una curva del tipo sigmoidea, semejante a una curva de titulación.⁹

Debido a que TCs contienen un grupo fenol en su estructura es conveniente analizar el efecto de pH sobre las constantes de velocidad. Se trabajó con Tet y Dem como representativas.

Se observa un efecto semejante al de los compuestos fenólicos, aunque con una reactividad de TCs más elevada en medio ácido, como se puede apreciar en la Figura 4.14, en la que se incluye la curva para fenol obtenida de datos de bibliografía.⁷

Ya se mencionó, en la pag. 28 que Woodward y col¹⁰ determinaron que TCs poseen tres grupos ácidos, los valores de pK correspondientes reportados por ellos y por Wiebe y Moore¹¹ se presentan en la Tabla 4.4.

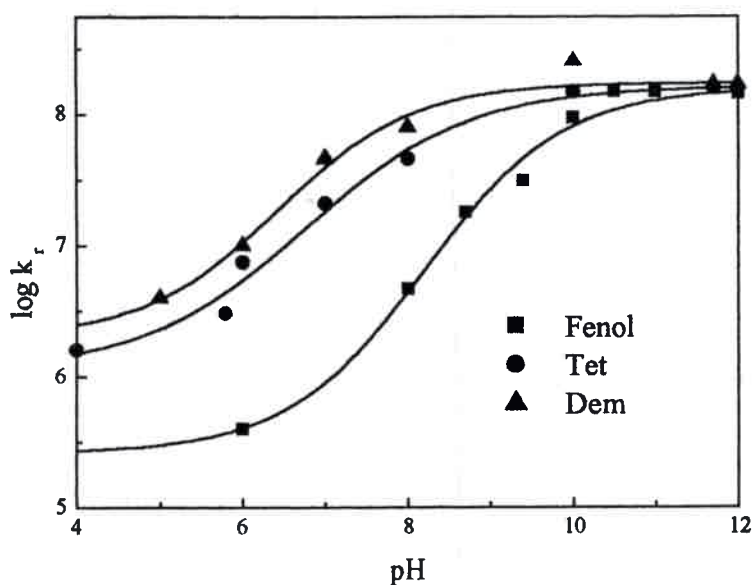


Figura 4.14: Efecto de pH sobre las constantes de velocidad reactivas de Tet, Dem y fenol. Solvente: H₂O. Sensibilizador Eo.

Tabla 4.4: Valores de pK para los grupos ácidos de TCs.

Tetraciclina	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Tet	3,30	7,68	9,69
Clo	3,30	7,44	9,27
Oxi	3,27	7,32	9,11
Dox	3,40	7,70	9,70
Dem	3,30	7,16	9,25

4.9 Rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ por TCs y sus productos de fotooxidación.

Las señales de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por TCs en soluciones de acetonitrilo y de D_2O están por debajo del límite de detección del equipo de TRPD con el que se dispone en el laboratorio, aproximadamente ($\Phi\Delta=0.03$).

Otros autores¹², reportan que Dem, Tet, Clo y Dox son generadores de $O_2(^1\Delta_g)$ en etanol alcalino con valores de $\Phi\Delta$ muy bajos, entre 0.04 para Dem y 0.01 para Dox, mientras que no es detectable para Min.

Considerando que el producto de fotólisis por irradiación directa, según Davies et al.¹³ es un compuesto quinónico, denominado por ellos "Producto rojo" (PR), y sabiendo que los compuestos quinónicos son generadores de $O_2(^1\Delta_g)$ ^{14,15}, se procedió a llevar a cabo la producción de PR fotolizando una solución acuosa de pH 10 de Tet 0.5 mM.

La Figura 4.15 muestra los espectros de absorción antes y después de la mencionada fotólisis.

El fotolizado, sin tratamiento posterior, mostró una interesante señal fosforescente a 1270 nm, correspondiente a $O_2(^1\Delta_g)$.

Se determinó para este fotolizado un $\Phi\Delta=0.24$ atribuido a PR, empleando como compuesto de referencia a RB.

La Figura 4.16 representa los gráficos de I_0 vs. fracción de luz absorbida para PR y RB.

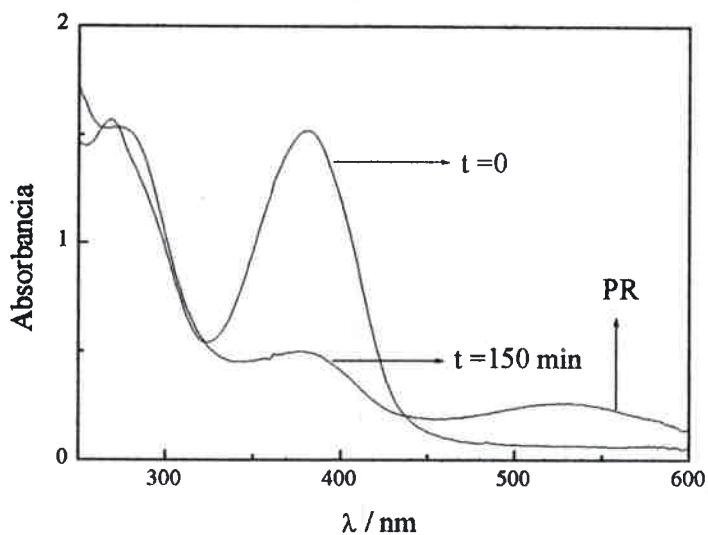


Figura 4.15: Espectros de absorción de Tet ($t=0$) y después de fotolizarla 150 minutos por irradiación directa con luz de $\lambda=400$ nm ($t=150$ min). Con este fotolizado se trabajó para determinar el $\Phi\Delta$ de PR.

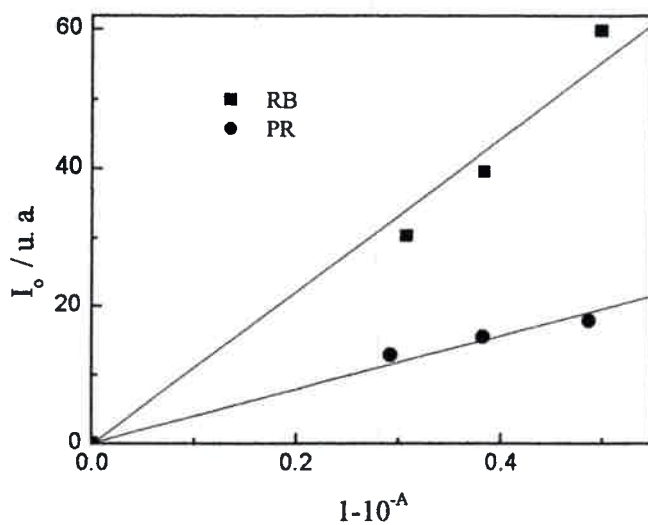


Figura 4.16: Intensidad de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ en función de la fracción de luz absorbida por PR y por el compuesto de referencia (RB).

4.10 Análisis microbiológico.

Se evaluó la actividad microbiológica de Tet antes y después de la fotooxidación sensibilizada por RB.

Los resultados se presentan en la Figura 4.17. Estos datos fueron aportados por E. Sanchez, M. Garavano y M. López, de la Fac. de Cs. Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia SJB de Comodoro Rivadavia.

En la Figura 4.17 se puede observar que después de un 53% de conversión de Tet (basado sobre la disminución del máximo de intensidad de la banda de absorción de 357 nm) debido a la fotooxidación, el diámetro del halo inhibitorio (indicativo del poder antimicrobiano), disminuye en un 16%.

No se encontraron diferencias en el diámetro del halo inhibitorio cuando se llevaron a cabo los antibiogramas con soluciones de Tet-RB sin irradiar a pH 7 y 10.

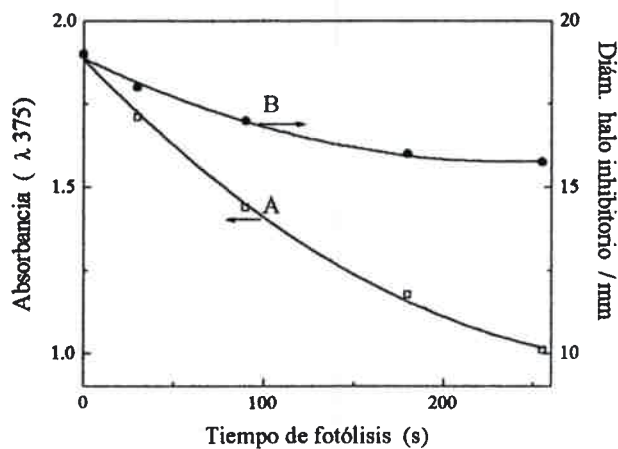


Figura 4.17: Disminución de la concentración de tetraciclina (determinada por la disminución de su absorbancia a 375 nm) (A) y disminución de la actividad antimicrobiana (determinada por el halo inhibitorio) (B), por fotooxidación de Tet, sensibilizada por RB.

5 TETRACICLINAS: DISCUSIÓN

Es evidente que ocurren interacciones entre TCs y los sensibilizadores empleados, Eo y RB, ya que con ambos se observa consumo de sustrato al fotolizar soluciones sin O₂ y con radiación que sólo el sensibilizador absorbe ($\lambda > 500$ nm). Además los espectros de absorción del fotolizado son distintos si se comparan soluciones irradiadas con y sin O₂, Figuras 4.6 y 4.7, pag. 60 y 61.

También se ha comprobado que con RB existen interacciones entre Tet y ³RB* con una constante de velocidad apreciable, $3,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mientras que no se advierten asociaciones entre sus estados fundamentales, ya que los espectros de absorción del sensibilizador y el de Tet no cambian si los compuestos están puros o mezclados.

En presencia de N₃Na 50 mM (un inhibidor selectivo de O₂(¹Δ_g)⁵ se encuentra que para la referencia (FFA) se inhibe completamente el consumo de O₂, mientras que para Tet se mantiene una reactividad residual de aproximadamente un 20% cuando el sensibilizador es RB y algo mayor si se trabaja con Eo.

Por otra parte, la velocidad de consumo de O₂ no es afectada en presencia de SOD cuando la fotólisis se lleva a cabo con Eo, el sensibilizador empleado para evaluar las constantes reactivas. Estos resultados señalan que si bien operan procesos de Tipo I¹⁶, las interacciones son entre Tet y los sensibilizadores y no debidas a reacciones con O₂⁻, al menos con Eo.

La existencia de la interacción entre TCs y el estado triplete excitado del sensibilizador constituye un camino competitivo con la reacción de transferencia de energía en la generación de O₂(¹Δ_g) (Esquema cinético, Ec. 3.2 y 3.3).

En las condiciones de trabajo [O₂]_{H₂O} = 0,25 mM y [Tet] = 0,5 mM. k_{diff} en agua es $6,2 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ y k_q^T para Tet es de $3,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Además k_{TE} = 1/9 k_{diff}¹⁷ = $6,8 \times 10^8$. Por lo tanto, considerando que k_{TE} [O₂] ≅ k_q^T [Tet], la reacción representada por la Ec (3.2) compite en igual medida con la reacción representada por la Ec. (3.3).

Sin embargo, si se observan los espectros de consumo de sustrato en ausencia de O₂ se advierte, además, consumo del sensibilizador, mientras que no sucede lo mismo cuando la fotólisis se lleva a cabo en soluciones equilibradas con aire, (Figuras 4.6 y 4.7). Estos hechos orientan a pensar que en presencia de O₂, la reacción sigue un

proceso de Tipo II con mayor eficacia que la correspondiente a los de Tipo I, ya que si O_2 está presente en la solución el sensibilizador no se consume.

Lo mismo señala el significativo incremento del consumo de oxígeno cuando no hay inhibidor de $O_2(^1\Delta_g)$ en el medio de reacción.

Todas estas observaciones conducen a admitir que las constantes cinéticas reactivas de TCs frente a O_2 (k_r) presentadas en las Tablas 4.1 y 4.2 deben ser tomadas como un límite superior, ya que no son únicamente debidas a procesos de Tipo II. No obstante estos procesos compiten fuertemente con los de Tipo I.

Con respecto a las constantes de inhibición global de $O_2(^1\Delta_g)$, son confiables e indiscutibles debido a que fueron determinadas por un método absoluto (detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo).

Analizando los resultados mostrados en las Tablas 4.1 y 4.2 se observa que la interacción global entre TCs y $O_2(^1\Delta_g)$ no es muy sensible a la estructura química de TCs, excepto para casos notables como son Min, Rol y Met, las cuales presentan los mayores valores de k_t . Si se analiza la estructura de cada una de ellas vemos que tanto Min como Rol contienen un grupo amino adicional, el cual es característico inhibidor¹⁸ de $O_2(^1\Delta_g)$. En el caso de Met, la existencia de un doble enlace conjugado en la posición de R_2 ofrece otro sitio de ataque para $O_2(^1\Delta_g)$ (Estructura química, pag 27).

Clo y Dem presentan los mismos valores de k_t , y mayores que el de Tet, indicando algún efecto activador en el proceso de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte del átomo de cloro en posición 4 con respecto al grupo fenol. Tal efecto también se advierte cuando se comparan los valores correspondientes de k_t entre fenol y 4-clorofenol.¹⁷ Este hecho, entre otros que se discutirán más adelante, señala una participación, al menos moderada del grupo fenólico de TCs en la interacción con $O_2(^1\Delta_g)$.

Como se puede advertir, comparando los resultados de las Tablas 4.2 y 4.3, no hay una tendencia definida en el efecto de solvente sobre los valores de k_t . Para la mayoría de las TCs no hay diferencias destacables, para Min y Met la disminución en la polaridad disminuye k_t , mientras que para Dox se duplica. Este es un hecho que distingue a TCs de los fenoles, con los cuales se aprecia un notable efecto de la polaridad del solvente sobre k_t .

En cuanto a las constantes de velocidad reactivas frente a $O_2(^1\Delta_g)$, se advierte que el cambio de solvente no produce un efecto importante. Sin embargo los cálculos de las eficiencias reactivas resultan mayores para el solvente orgánico que en agua. Esto se debe a que para el primero el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ es alrededor de un orden de magnitud mayor que en agua.

Es destacable el valor relativamente elevado de ϕ_r en casi todos los casos. Ésta es otra diferencia que presentan las TCs comparadas con fenoles, en los cuales la eficiencia reactiva es muy baja.⁷ Esta observación señala la presencia de otros sitios reactivos en la molécula.

Haciendo un análisis de la relación estructura química - reactividad se destaca el hecho de que Clo es la menos reactiva, probablemente por el efecto atractor de electrones del cloro sobre el fenol; Met es la que muestra mayor reactividad química en agua, posiblemente debido a la oferta de un sitio reactivo extra para $O_2(^1\Delta_g)$, el doble enlace conjugado en R_2 .

En general se observa que los cambios de grupos metilo por hidrógeno u oxhidrilo en las posiciones R_2 , R_3 y R_4 , no tienen efecto directo sobre los sitios reactivos, excepto para Dem, en la cual el $-OH$ en posición R_3 parece ejercer un aumento en la velocidad de reacción, comparado con Clo.

Con respecto al efecto de pH sobre las constantes de velocidad reactivas, en la Tabla 4.4 se presentaron los valores de pK de la mayoría de las TCs con las que se ha trabajado. El valor de pK_1 corresponde al centro tricarbónico del anillo A, pK_2 a la función dimetilamina del anillo A y pK_3 al sistema fenólico β dicetona de los anillos D C B.

Ya se ha mencionado que la mayor reactividad de TCs se manifiesta cuando sus grupos ácidos se hallan ionizados.

Se determinaron los valores de las constantes reactivas en función del pH con el fin de observar tal efecto.

En la Figura 4.14 se puede apreciar que a pH mayor que 10 las constantes reactivas para TCs y fenol son comparables, aunque para las primeras es ligeramente superior. Al disminuir el pH la reactividad cae en todos los casos, no obstante el efecto

es más notable para fenol, restando para TCs una reactividad importante en medio ácido en algo más de un orden de magnitud.

Estos hechos indican que otros grupos reactivos frente a $O_2(^1\Delta_g)$ de la molécula mantienen su efecto aún en medio ácido, aunque su reactividad es sensiblemente inferior a la del grupo fenólico. Estos grupos son los enol de los anillos A y B (ver Figura 4.1, Tet).

Ya se mencionó, en la sección 4.9 que TCs poseen $\Phi\Delta$ muy bajos. En cuanto al producto de fotooxidación por irradiación directa de Tet (producto rojo (PR)), básicamente un compuesto quinónico, se ha encontrado que es un relativamente buen sensibilizador de $O_2(^1\Delta_g)$, su rendimiento cuántico es de 0.24, determinado usando RB como referencia. Este resultado se aproxima a los reportados por otros autores para benzoquinona,¹⁵ quienes establecieron que este compuesto es generador de $O_2(^1\Delta_g)$ con $\Phi\Delta = 0,38$. Es posible que el valor más bajo de PR con respecto a benzoquinona se deba a que contiene grupos que son inhibidores de $O_2(^1\Delta_g)$, tales como fenol y dimetilamino.

Con estos resultados podríamos asignar a este “producto rojo” como una de las posibles causas de la fototoxicidad de TCs.

Con respecto al análisis microbiológico, al evaluar la actividad antimicrobiana de Tet antes y después de la fotooxidación sensibilizada, se encontró que el poder antibiótico disminuye en mucha menor proporción que lo que lo hace la concentración de Tet a lo largo de la fotólisis. Es decir, la caída en la concentración de Tet por fotólisis es mayor que la pérdida en el poder antibiótico, lo cual induce a pensar que los productos de fotooxidación poseen una actividad residual contra *Staphylococcus aureus*, bacteria empleada en el ensayo.

El hecho de que no se hayan detectado diferencias al comparar el poder antibacteriano de soluciones no irradiadas de Tet-RB a pH 7 y 10 señala que en las condiciones de trabajo, el efecto antibacteriano de las soluciones alcalinas antes y después de la fotólisis no se debe al pH sino a la acción de Tet o de sus productos de fotólisis.

6 HORMONAS TIROIDAS: RESULTADOS

Dentro de este grupo de compuestos, como ya se mencionó en la introducción, se estudian los aminoácidos tirosina, 3-iodotirosina y 3,5-diiodotirosina. Los cuales son precursores de la síntesis biológica de las hormonas triiodotironina y tetraiodotironina, esta última más conocida como tiroxina. Además se estudian, con fines comparativos las cinéticas de fotooxidación de tironina, diiodotironina y fenoxifenol.

Las estructuras correspondientes a los compuestos mencionados se presentan a continuación.

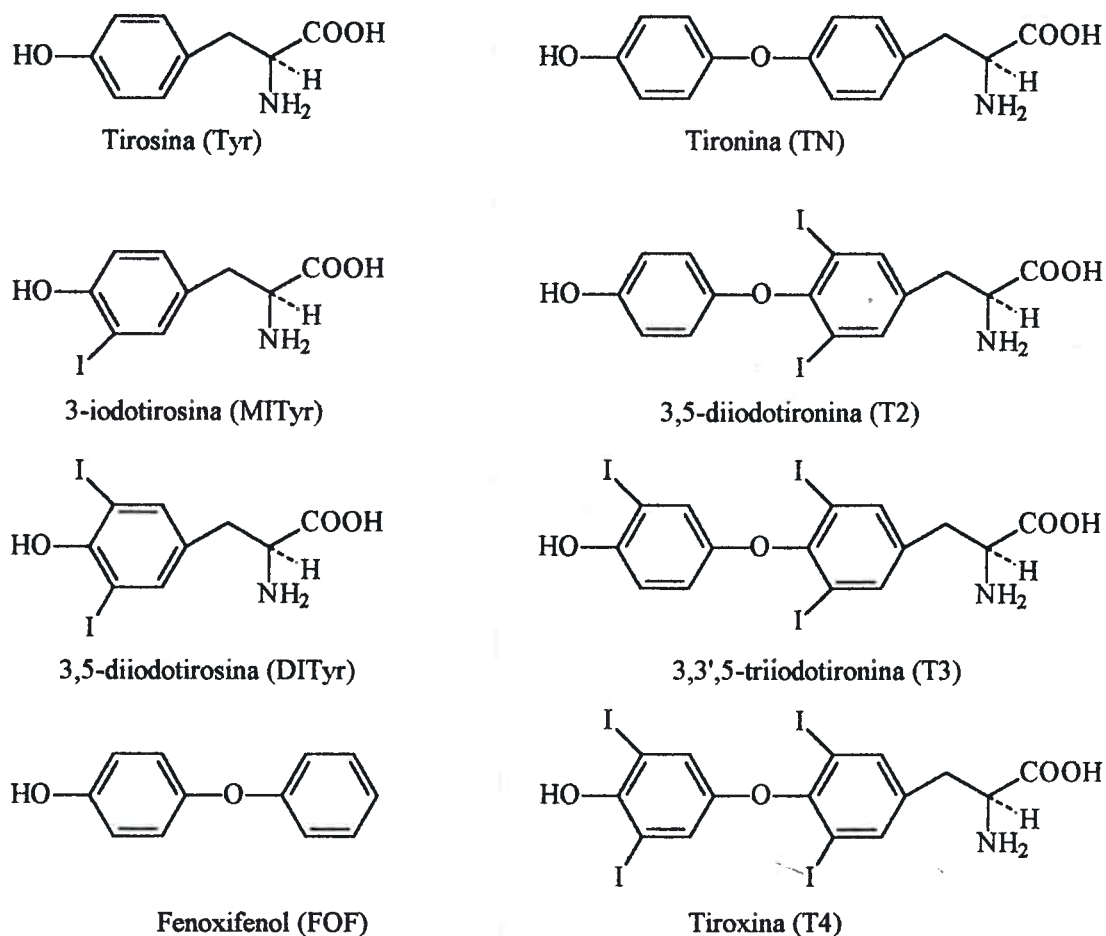


Figura 6.1: Estructura química de las hormonas tiroideas y compuestos estructuralmente relacionados (HTs).

Los compuestos binucleares y particularmente las hormonas son insolubles en todos los solventes de uso corriente.¹⁹ Sólo son solubles en medios altamente alcalinos o

ácidos. Es por ello que en todos los casos se ha trabajado en soluciones de NaOH 10 mM, excepto cuando se indique lo contrario.

6.1 Coeficientes de extinción molar.

Se determinaron en agua y mezcla de MeCN-MeOH 8:2 en ambos casos en presencia de NaOH 10 mM, ya que en estos medios es donde se llevaron a cabo todos los experimentos.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6.1: Coeficientes de extinción molar de HTs en soluciones de NaOH 10 mM.

Compuesto	$\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda_{\text{max}} / \text{nm})$	$\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda_{\text{max}} / \text{nm})$
	H ₂ O	MeCN-MeOH 8:2
Tyr	2227 (295)	2942 (300)
MITyr	3946 (304)	5777 (312)
DITyr	4987 (310)	5824 (318)
TN	2886 (300)	2690 (310)
T2	3070 (304)	3187 (310)
T3	4376 (320)	4395 (326)
T4	4750 (330)	5544 (334)

6.2 Interacciones con O₂(¹Δ_g).

6.2.1. Constantes de interacción global (k_t)

La presencia de cualquiera de los ocho compuestos estudiados disminuye el tiempo de vida de O₂(¹Δ_g) (τ). A modo de ejemplo se muestra la Figura 6.2, en la cual se observa el efecto de T4 de concentración 7x10⁻² mM, sobre la señal fosforescente de O₂(¹Δ_g).

A partir de los valores de 1/τ en función de la concentración de los sustratos se obtuvieron los valores de k_t. Los gráficos de Stern Volmer correspondientes para Tyr y T4 se muestran en la Figura 6.3.

Se empleó RB como sensibilizador y el solvente fue una solución de NaOH 10 mM en D₂O. Los resultados de k_f para todos los compuestos estudiados se presentan más adelante, en las Tablas 6.3 y 6.4.

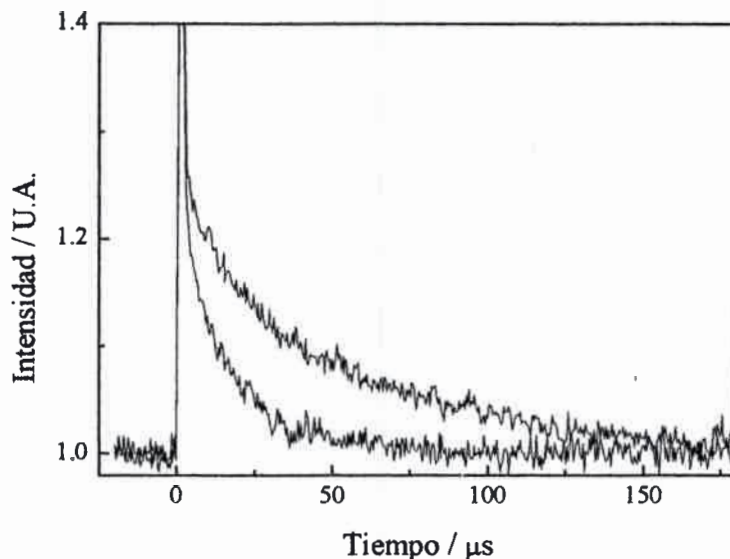


Figura 6.2: Decaimiento de la señal fosforescente de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelto en el tiempo en ausencia (curva superior) y en presencia de T4 7×10^{-2} mM (curva inferior).

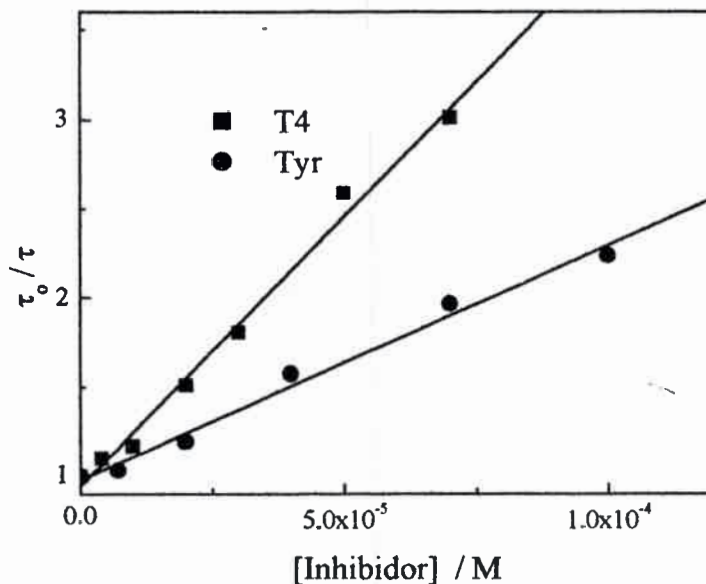


Figura 6.3: Gráficos de Stern Volmer para la inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por T4 y Tyr en solución de D₂O.

6.3 Fotólisis en estado estacionario.

6.3.1. Consumo de O₂ a bajas conversiones.

Se llevó a cabo irradiando soluciones acuosas alcalinas (NaOH 10 mM) equilibradas con aire, de TNs 0,5 mM empleando RB como sensibilizador, con una absorbancia de 0,5 a 548 nm, y PN de absorbancia 0,4 a 400 nm. Este último sensibilizador se empleó debido a que con RB, como se verá más adelante, se observan interacciones con los sustratos.

Si se sigue el curso de la reacción por consumo de oxígeno, y se trabaja a bajas conversiones (5-10% de oxígeno disuelto), se encuentra, haciendo un tratamiento cinético de pseudoprimer orden, un ajuste lineal de los datos obtenidos para todos los compuestos en estudio, como se aprecia en la Figura 6.4.

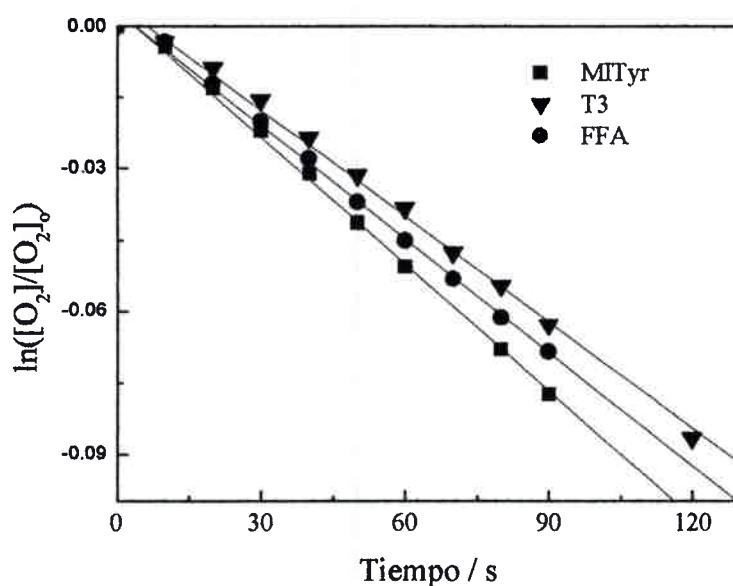


Figura 6.4: Gráficos de primer orden de consumo de O₂, para MITyr, T3 y FFA. Todos 0.5 mM en agua, NaOH 10 mM. Sensibilizador PN

6.3.2. Efecto de azida de sodio.

Se realizaron idénticas experiencias a las anteriores agregando a la solución azida de sodio 50 mM y el consumo de oxígeno fue suprimido masivamente. Esta observación señala que la reacción que involucra a oxígeno procede fundamentalmente

por la vía de $O_2(^1\Delta_g)$, aunque se debe destacar que con el sensibilizador empleado (RB) se advierte una reactividad residual en ausencia de $O_2(^1\Delta_g)$.

La Figura 6.5 muestra un gráfico de consumo de O_2 en ausencia y presencia de NaN_3 , para TN y el compuesto de referencia (FFA).

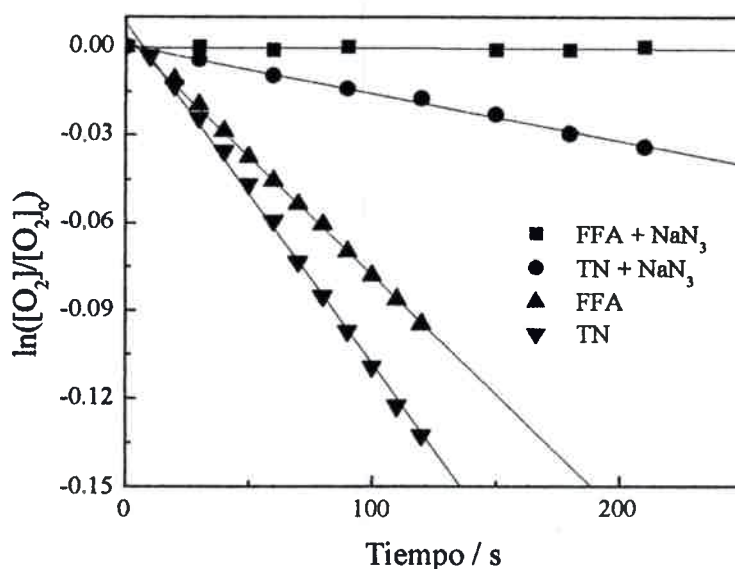


Figura 6.5: Consumo de O_2 con y sin azida de sodio en agua, NaOH 10 mM por TN y FFA. Sensibilizador: RB.

6.4 Interacciones con los sensibilizadores.

Debido a la observación señalada en la sección anterior, es decir un consumo de oxígeno aún en presencia de NaN_3 , es que se procedió a evaluar las posibles interacciones entre HTs y los sensibilizadores.

6.4.1. Experiencias resueltas en el tiempo.

En este estudio se empleó la técnica de láser flash fotólisis y se trabajó con Eo y RB. En ambos casos se irradió pulsos láser de $\lambda = 532$ nm y la λ de observación fue de 550 nm cuando se estudió Eo, ya que ese es el máximo de absorción de $^3Eo^*$ en agua.²⁰ Con RB la λ de observación fue de 650 nm, al igual que como se trabajó con TCs, pág.61.

Se llevaron a cabo estudios de inhibición de estados triplete de RB y de Eo por TN y T4. Para ambos sustratos se encontró que existen interacciones con los estados

excitados de los dos sensibilizadores. Aquí, al igual que como se mencionó anteriormente, las interacciones no son con los estados singlete excitados de los sensibilizadores debido a su corto tiempo de vida. Es decir que las interacciones observadas son con el estado triplete.

El efecto de la presencia de T4 sobre el tiempo de vida de $^3\text{RB}^*$ se muestra en la Figura 6.6.

Las constantes de inhibición de tripletes (k_q^T) se determinaron mediante la ecuación de Stern Volmer a partir de gráficos como el que se muestra en la Figura 6.6, el cual corresponde a la inhibición de $^3\text{Eo}^*$ por TN.

Los resultados se presentan en la Tabla 6.5.

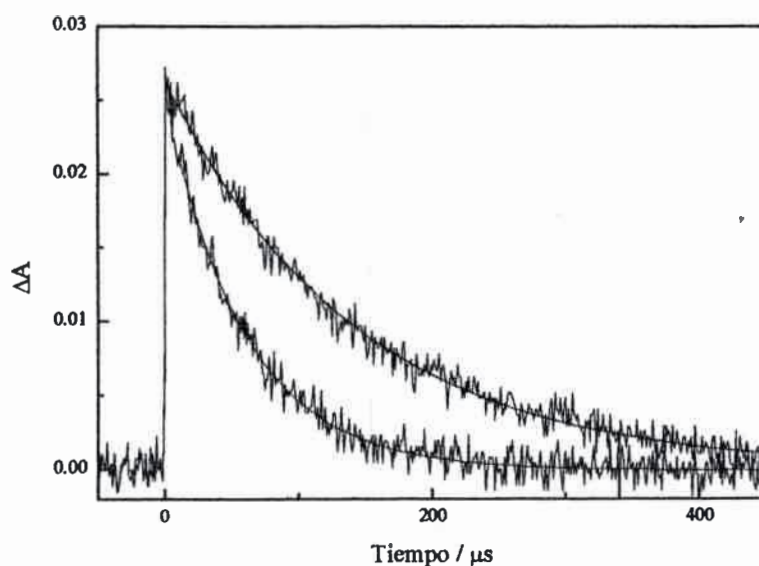


Figura 6.6: Efecto de la presencia de T4 5×10^{-2} mM sobre el tiempo de vida de $^3\text{RB}^*$. Curva superior: Decaimiento de $^3\text{RB}^*$. Curva inferior: $^3\text{RB}^* + \text{T4}$.

Tabla 6.2: Constantes de inhibición de estados triplete de Eo y RB por TN y T4.

Sensibilizador	Inhibidor	$k_q^T / 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 10\%$)
RB	T4	22
Eo	T4	6,0
Eo	TN	4,0

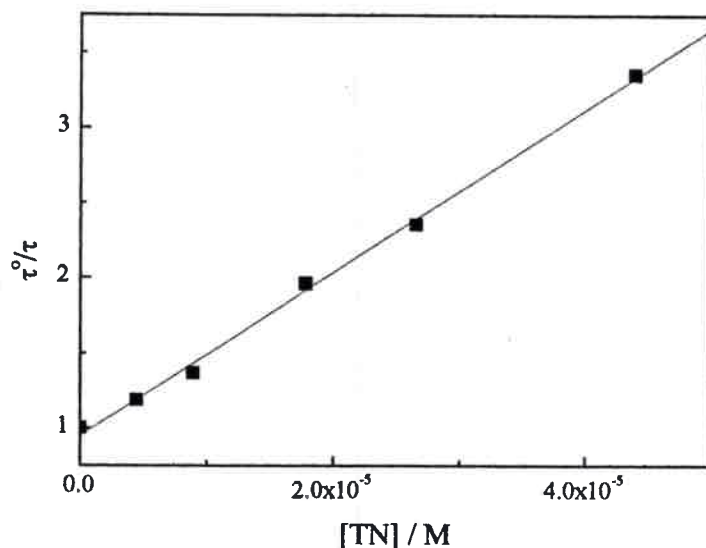


Figura 6.7: Gráfico de Stern Volmer para la inhibición de $^3Eo^*$ por TN, en agua, NaOH 10 mM.

6.4.2. Interacciones en el estado fundamental entre HTs y los sensibilizadores.

No se observan cambios espectrales de los sensibilizadores ni de los sustratos cuando ambos están juntos en la solución.

6.4.3. Fotólisis en ausencia de O_2 .

Debido a que las HTs inhiben en gran medida a los estados triplete de los sensibilizadores Eo y RB, se decidió buscar algún otro sensibilizador que permitiera reacciones más “limpias” con $O_2(^1\Delta_g)$. Se optó por perinaftenona (PN). Se trata de un compuesto de muy baja solubilidad en agua, pero la suficiente como para conseguir absorciones alrededor de 0.4 a 400 nm. Debido a que este compuesto presenta un rendimiento cuántico de $O_2(^1\Delta_g)$ cercano a la unidad, con la concentración empleada basta para llevar a cabo esas experiencias en H_2O .

Con respecto a los estudios con PN, no fue posible determinar las interacciones entre los sustratos y su estado excitado triplete debido a que a 355 nm (λ de excitación del láser en donde PN absorbe) también absorben los compuestos en estudio.

Por lo tanto para determinar potenciales interacciones con este sensibilizador se fotolizaron soluciones sin O_2 de Tyr y MITyr y no se observó consumo de sustrato en ambos casos. Por esa razón se cree que los resultados de velocidades de consumo de O_2 obtenidas empleando PN como sensibilizador representan procesos de tipo II con exclusividad.

Las Figuras 6.8 y 6.9 muestran la evolución espectral de DITyr por fotólisis sensibilizada por PN en presencia y ausencia de O_2 , respectivamente.

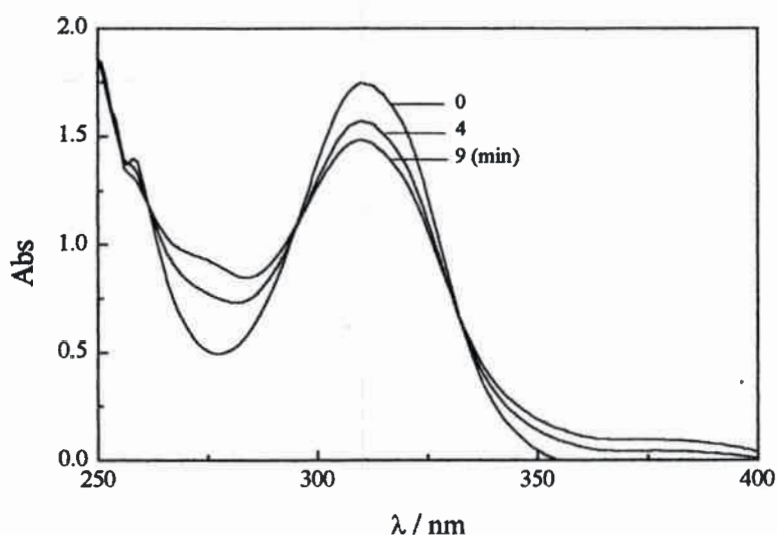


Figura 6.8: Consumo de DITyr en presencia de O_2 . Sensibilizador PN, solvente: H_2O , NaOH 10 mM.

6.5 Estequiometría de la reacción

Se determinó la relación estequiométrica O_2 /Tyrs. Para Tyr y sus derivados iodados, el consumo de sustrato se determinó por espectrofotometría. Para TN y sus derivados iodados no fue posible aplicar este método porque los espectros de absorción de los productos se superponen con los de los reactivos.

Los resultados son un promedio de cinco determinaciones. Para todos los casos la relación estequiométrica es de 1,5.

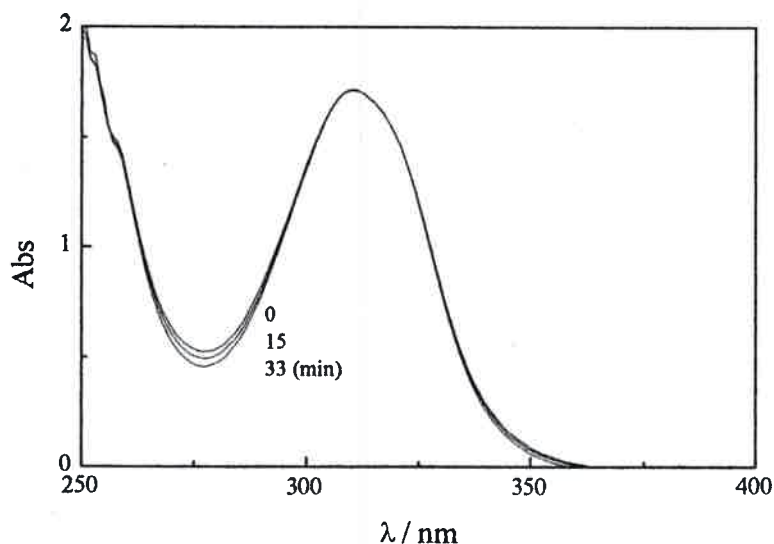


Figura 6.9: Consumo de DITyr en ausencia de O_2 . Idénticas condiciones a las de la Figura 6.7.

6.6 Constantes de velocidad de interacción reactiva con $O_2(^1\Delta_g)$.

Con el fin de determinar las constantes reactivas de los compuestos en estudio con $O_2(^1\Delta_g)$ se aplicó el método descrito en la pag. 44, usando como compuesto de referencia alcohol furfúrico (FFA).

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 6.3 y 6.4.

Tabla 6.3: Constantes de velocidad reactivas y globales para Tyrs en solución acuosa de NaOH 10 mM.

Compuesto	$k_r / 10^8 M^{-1} s^{-1}$ Sens: PN	$k_r / 10^8 M^{-1} s^{-1}$ Sens: RB	$k_t / 10^8 (M^{-1} s^{-1})$	k_r/k_t
Tyr		1.50	2.1	0.71
MITyr	0.64	0.89	2.2	0.40
DITyr	0.43	0.76	2.1	0.36

Con respecto al grupo de las Tironinas, no se ha determinado el coeficiente estequiométrico de la reacción y por tanto, en la Tabla 6.4 se informa el producto $k_r\alpha$, es

decir las constantes de velocidad reactivas multiplicadas por el coeficiente estequiométrico.

Tabla 6.4: Constantes de velocidad globales y reactivas para TNs.

Compuesto	$k_r \alpha / 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 5\%$) Sens: PN	$k_r \alpha / 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($\pm 5\%$) Sens: RB	$k_t / 10^8 (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ ($\pm 5\%$)	$k_{r(PN)} / k_t$
TN	1.10	1.70	3.5	0.31
T2	0.61	1.26	4.2	0.15
T3	0.47	1.22	5.0	0.09
T4	0.39	0.83	6.2	0.06
FOF	0.85	0.90	2.8	0.30

6.7 Fotólisis estacionaria a altas conversiones de reactivos.

Si se lleva a cabo una fotólisis a altas conversiones de reactivo, aplicando un tratamiento de pseudoprimer orden para los datos de consumo de oxígeno, se observa un quiebre en la recta obtenida como se muestra en la Figura 6.10 (se produce aumento de la velocidad de consumo de oxígeno con el avance de la fotólisis).

Si además se trabaja de igual manera con el consumo de sustrato, determinado por HPLC, se observa la traza de la Figura 6.11 (se produce disminución en la velocidad de consumo de T4 con el avance de la fotólisis).

Trabajando con T3, y con medidas de HPLC con un detector de arreglo de diodos, se encuentra la aparición de cuatro productos importantes, concomitantes con la desaparición de reactivo. Un cromatograma análogo se observa cuando se inyecta el fotolizado en un HPLC Masa.

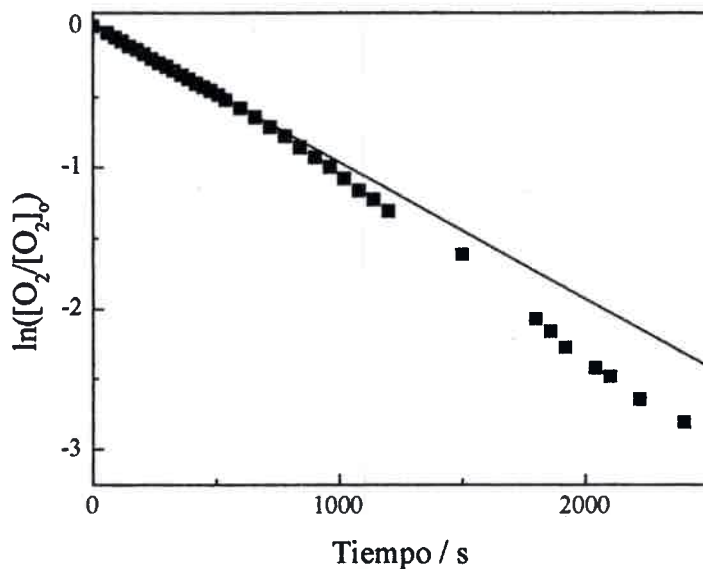


Figura 6.10: Consumo de O_2 por T4 a altas conversiones. Sens: RB. Solvente: H_2O , NaOH 10 mM

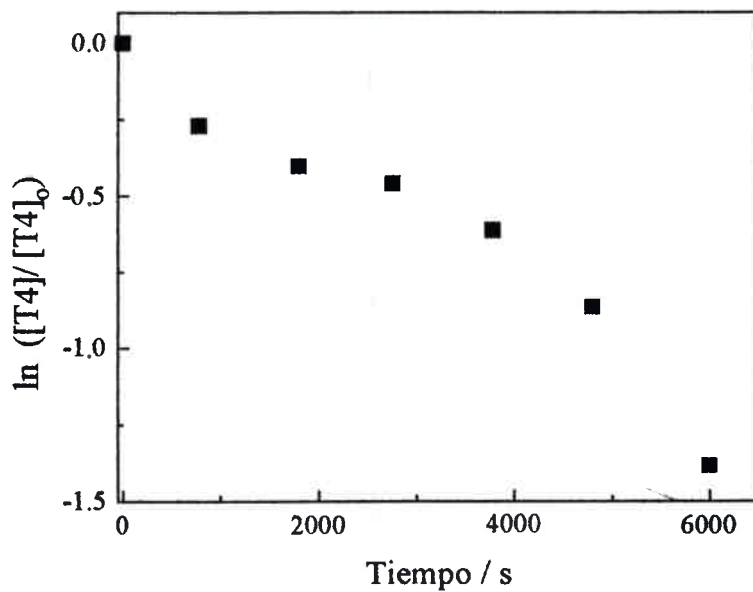


Figura 6.11: Consumo de T4 a altas conversiones. Sens: RB. H_2O , NaOH 10 mM

6.8 Consumo de grupo amino.

En la Figura 6.12 se observa otro hecho de interés para dilucidar el mecanismo de reacción. Se advierte consumo de grupo amino cuando se lleva a cabo fotólisis sensibilizada de T3 y T4 en agua (siempre con NaOH 10 mM y RB como sensibilizador). Estos resultados se obtuvieron aplicando el método de la fluorescamina descrito en la pag. 50.

Se sabe por literatura que Tirosina muestra un comportamiento análogo,²¹ su evolución también está mostrada en la Figura 6.12.

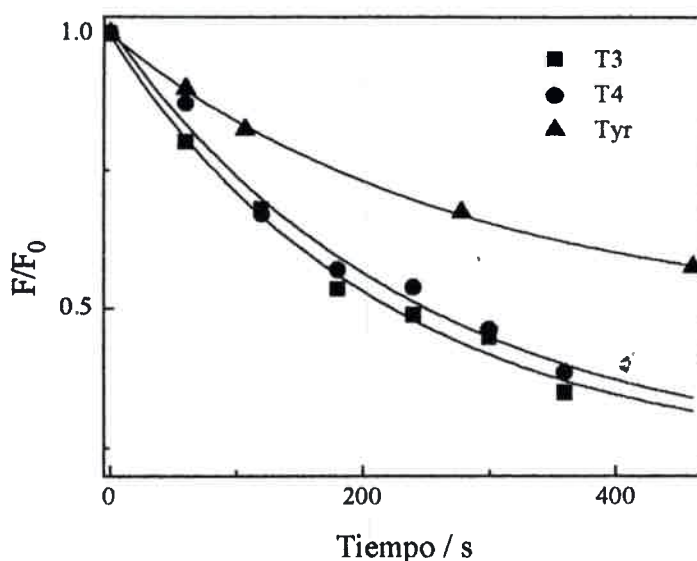


Figura 6.12: Consumo del grupo amino de T3, T4 y Tyr por fotólisis sensibilizada con RB en H₂O, NaOH 10 mM.

6.9 Algunos estudios de los productos de fotooxidación sensibilizada de HTs.

Con el fin de establecer si algún mecanismo de reacción análogo al de Tyr se lleva a cabo con TNs, se intentó analizar los productos de su fotooxidación. En principio, se esperaba encontrar p-benzoquinona como fotoproducto de TNs (ver discusión, más adelante).

Se fotolizaron soluciones acuosas de pH 12 de TN a altas conversiones de reactivo, empleando RB como sensibilizador, posteriormente se neutralizó la solución con HCl y se extrajo con éter etílico, luego de concentrar el extracto se inyectó en un

cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, no se registró la presencia de compuestos con el peso molecular de para-benzoquinona. Se supuso que debido al prolongado tiempo de fotólisis este compuesto podría haber reaccionado también. Por esta razón es que se reprodujo la fotólisis en las condiciones mencionadas pero a baja conversión, y el fotolizado crudo fue inyectado en el cromatógrafo. No se encontraron señales en el cromatograma. Este hecho estaría indicando que no hubo suficiente acumulación de producto como para ser detectada, o los productos primarios de la reacción son iónicos al pH de trabajo.

Por tales motivos se solicitó al laboratorio del Dr A. Zanocco de la Universidad de Chile que las experiencias se llevaran a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas como detector. En ese caso, el compuesto fotolizado fue T3, nuevamente fue necesario fotolizar a altas conversiones (alrededor de un 40%) para poder tomar el cromatograma. Tampoco se detectó la presencia de la correspondiente quinona.

Estudios publicados recientemente por otros autores sobre la fotooxidación de fenoles muestran que la formación de quinona se obtiene como único producto si la reacción se lleva a cabo en medios neutros. Li and Hoffman²² reportan que el rendimiento cuántico de formación de parabenzoquinona es cero a pH mayores que 11. Por otra parte Gerdes y col²³ proponen que en medio alcalino la para-benzoquinona reacciona con $O_2(^1\Delta_g)$ y OH para dar productos altamente oxidados de bajo peso molecular.

En nuestro laboratorio se verificó que las soluciones alcalinas de para-benzoquinona son altamente inestables y descomponen rápidamente para dar una solución de color pardo- marrón. Tal aspecto es el que toman las soluciones irradiadas por largos períodos de tiempo de TN, T3 y T4. De todos modos se considera que tal observación espectral no es prueba suficiente de la formación del producto buscado.

Con respecto a la fotólisis de T3, el análisis de productos luego de un 40% de conversión de reactivo, mediante las experiencias llevadas a cabo con HPLC-MS mostró la formación de cuatro productos de alto peso molecular. Uno de ellos responde al PM de $T3+O_2$. Otro de los productos, presenta un PM asignable a una estructura $T3+O_2 - I$. Los otros dos presentan PM de 676 y 640 g/mol. Estos últimos no son

explicables por algún mecanismo conocido de reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ y probablemente no se trate de productos primarios de reacción.

6.10 Potenciales de oxidación de media onda.

Debido a que las constantes de velocidad reactivas y totales siguen tendencias inversas en la serie de TNs, se decidió determinar los potenciales de oxidación de estos compuestos en el solvente empleado para medir tales constantes. Considerando que en la inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por fenoles (estructuralmente relacionado con los compuestos en estudio) opera un mecanismo de transferencia de carga y, por lo tanto, se espera que el incremento en el $E_{1/2}$ produzca una disminución en k_t .

En las Figuras 6.13 y 6.14 se muestran los voltagramas de barrido lineal para la oxidación de TN, T2 y T4 respectivamente.

Se observa que una señal aparece alrededor de 350 mV (versus ECS), la cual se corresponde con la descarga de la especie fenóxido presente en las moléculas estudiadas.²⁴

A partir de los voltagramas cíclicos es difícil establecer si existen diferencias entre los potenciales de pico. Es por esta razón que a dicho voltagramas se les aplicó la técnica de análisis semiintegral o de convolución, ya descrito en la pag. 51. Los resultados se muestran en las Figuras 6.13, 6.14 y 6.15, correspondientes a T4 en solución acuosa de NaOH 10mM. Análisis idénticos se aplicaron a los voltagramas de TN y T2.

Se puede observar que las corrientes convolucionadas alcanzan una corriente límite y que el gráfico de E vs. Y es lineal para cada uno de los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5: Potenciales de oxidación de media onda de TNs

Compuesto	$E_{1/2}/V \pm 0.005$
TN	0.294
T2	0.314
T4	0.323

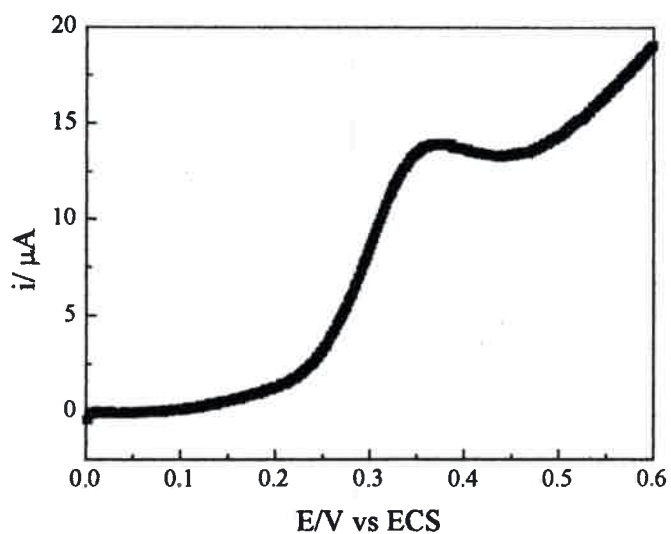


Figura 6.13: Voltagrama de barrido lineal de T4 en H₂O, NaOH 10 mM.

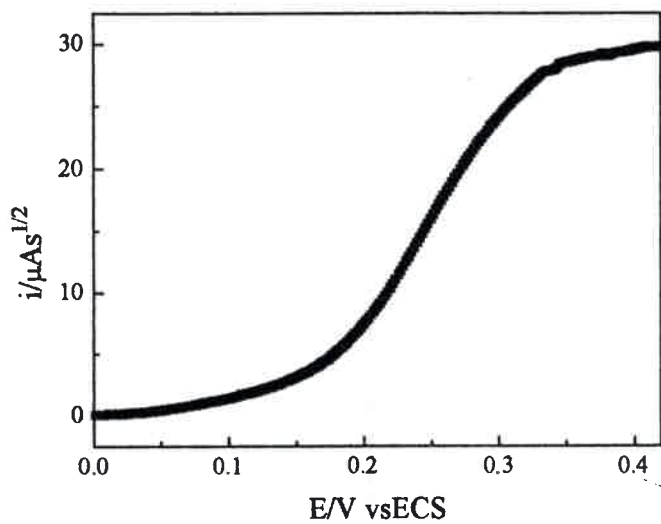


Figura 6.14: Corriente convolucionada correspondiente al voltagrama de la Fig. 6.13.

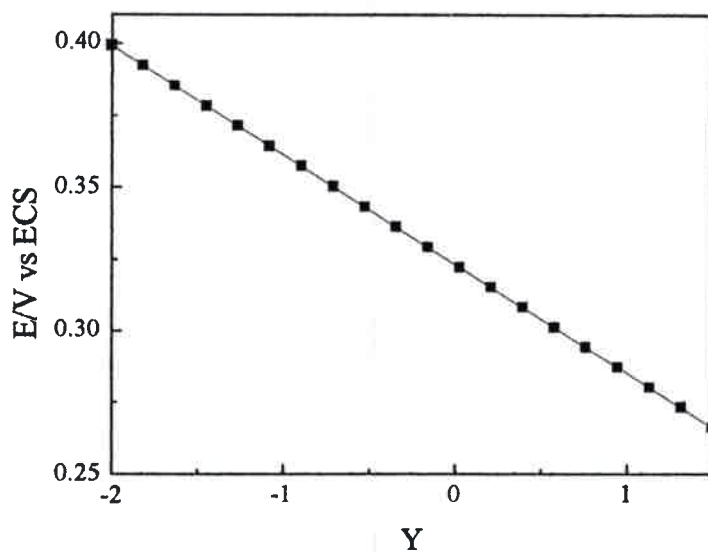


Figura 6.15: Potencial de oxidación vs. $Y (= \ln(\frac{I_L - I(t)}{I(t)}))$. Gráfico resultante del análisis de los datos por el método semiintegral.

7 HORMONAS TIROIDEAS: DISCUSION

A partir de los resultados experimentales es indudable que todos los miembros del grupo de compuestos estudiado reaccionan por fotólisis sensibilizada y que las interacciones con oxígeno singlete presentan altas constantes de velocidad.

Sin embargo, debido a que las interacciones con algunos sensibilizadores son importantes es necesario analizar detalladamente los resultados con el fin de establecer qué tipos de mecanismos operan en estas reacciones y en qué extensión lo hace cada uno de ellos.

Con los colorantes xanténicos los procesos de fotooxidación no son puramente de Tipo II ya que se advierte consumo de HTs en ausencia de oxígeno y se encuentran interacciones importantes entre el estado triplete excitado de los colorantes y HTs, el mecanismo de inhibición podría ser atribuido a un proceso de transferencia de electrones, en donde HTs actúan como donores de electrones, en un proceso similar al reportado por Zwicker y Grossweiner²⁵ y por Okamoto et al.²⁶ para interacciones del triplete de Eo y RB respectivamente con derivados fenólicos, con constantes de velocidad semejantes a las obtenidas para HTs, en el caso de RB.

Empleando el colorante carbonílico PN como sensibilizador, no se encontraron evidencias de reacciones adicionales diferentes de aquellas correspondientes a un mecanismo de Tipo II puro. Haciendo un análisis de los datos cinéticos de la Tablas 6.3 y 6.4 se pueden destacar algunos puntos interesantes:

-Las constantes de velocidad globales, k_t , incrementan con el número de átomos de yodo sustituyentes en la estructura de TN. Este comportamiento es paralelo con el aumento en el potencial de oxidación de estos compuestos.

-Los valores de k_r disminuyen con el aumento en el número de átomos de yodo en la serie de Tyrs. Si se supone igual valor de α para la serie de TNs, se advierte la misma tendencia para tal serie.

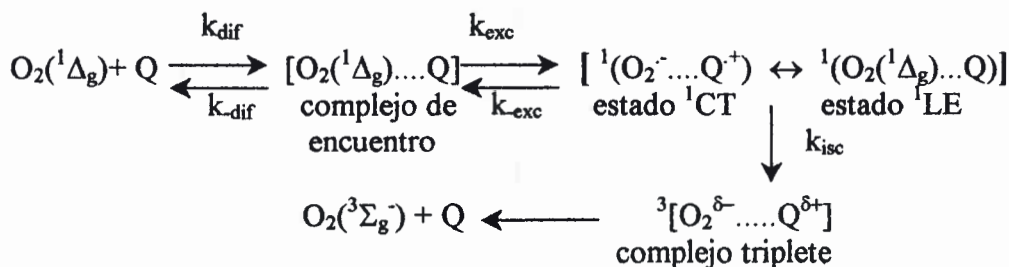
-Los cocientes k_r/k_t , que dan cuenta de la eficiencia del proceso fotooxidativo, en HTs, disminuye con el aumento del número de átomos de yodo. Los valores más altos corresponden a los compuestos no iodados.

Con el fin de comprender y racionalizar estos resultados se deberían tener en cuenta las siguientes consideraciones:

El proceso de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por fenoles ha sido muy estudiado²⁷⁻²⁹ y se encontró que en general se debe al grupo OH en el anillo bencénico.

La inhibición física se debe al cruce entre sistemas, inducido por acoplamiento spin órbita, dentro del complejo, el cual procede con algún grado de transferencia de carga,²⁹ pag 26, ec. 2.9. Por lo tanto, el balance entre la inhibición física y la oxidación efectiva (generación de productos), debería ser sensible al acoplamiento spin órbita y a factores entrópicos. A estas conclusiones llegaron Gorman y col.²⁸ apoyadas por experimentos precisos de efecto de solvente y de temperatura con parámetros de velocidad de compuestos modelo seleccionados. Es decir que a partir de resultados experimentales y teóricos se concluyó que las interacciones de transferencia de carga son de importancia crítica en las reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$, particularmente en fenoles³⁰, aminas y metoxibencenos³¹. Se ha postulado la formación de un exciplexo como etapa determinante de la velocidad.^{27, 31}

Un esquema cinético, basado en la aproximación original de Rehm y Weller de un estado estacionario en dos etapas para el proceso de inhibición es el que se muestra en el esquema 7.1.



Esquema 7.1: Inhibición de oxígeno singlete molecular por Q, según un mecanismo de Rehm Weller para inhibición por transferencia de electrones.

En este esquema k_{dif} representa a la constante difusional en el solvente empleado k_{exc} es la constante de formación del exciplexo, CT es transferencia de carga, LE es el estado localmente excitado y k_{isc} es la constante de cruce intersistemas. No se asigna una constante de velocidad para el proceso de disociación del complejo triplete porque se supone que se trata de un proceso rápido e irreversible.

De acuerdo con este mecanismo, pueden operar simultáneamente la inhibición física y química, y la importancia relativa de cada proceso está reflejada por el balance entre las respectivas constantes de velocidad, k_q y k_r .

Si el cruce entre sistemas depende del proceso de transferencia de carga, k_{isc} debería aumentar a medida que el carácter de transferencia de carga del exciplojo aumenta, como resultado del incremento en el acoplamiento spin órbita. El grado de transferencia de carga, a su vez, aumenta cuando disminuye el potencial de oxidación del compuesto donante de carga (Q).

Considerando que HTs son compuestos fenólicos, el esquema 7.1 es aplicable al proceso de inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por estos compuestos. Esta afirmación está avalada por algunas observaciones experimentales, ya que si bien no es posible determinar cuál es el efecto del pH sobre las constantes de velocidad, debido a que HTs son insolubles en medios neutros. Se debe destacar que cuando, para comparar, se determinó la velocidad de la reacción en metanol con NaOH 1 mM para TN, la constante reactiva correspondiente resultó ser de un orden de magnitud menor que en agua-NaOH 10 mM. Este hecho muestra que la interacción $O_2(^1\Delta_g)$ -HT está favorecida por la presencia de la forma ionizada de los fenol derivados, considerando su mayor capacidad de transferir electrones, comparada con la forma protonada. Este es un hecho conocido y demostrado para un número importante de compuestos fenólicos solubles en agua.³²

Sin embargo, para el grupo de TNs, para las cuales se han determinado los $E_{1/2}$, se advierte que k_t aumenta con el incremento de $E_{1/2}$. Este hecho estaría indicando que otro proceso, además de la transferencia de carga estaría afectando y dominando al proceso de inhibición.

Esta observación demanda un análisis más detallado de la situación.

El cruce entre sistemas es un proceso de transferencia de energía singlete triplete involucrado en la desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_{isc}). Está controlado por dos factores, uno es la constante de acoplamiento electrónico, la cual da el factor preexponencial y la otra es la reorganización nuclear, relacionada con la barrera de energía para el proceso.³³ Debido a que el cruce de singlete a triplete es prohibido por spin, se espera que la magnitud del factor preexponencial dependa del efecto de átomo pesado. Éste, a su vez, está dado por el número y la posición de los átomos de iodo sustituyentes en HT.

De este modo, k_{isc} puede ser escrita como:





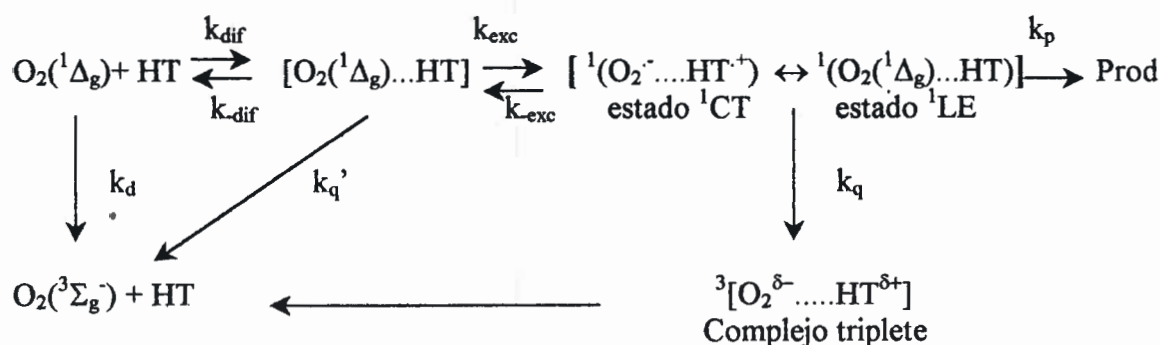
$$k_{isc} = B \sum \zeta^2 \exp(-\Delta E^* / RT) \quad (7.1)$$

Donde B es una constante para una serie de aceptores de energía, y ζ son las constantes de spin órbita para el halógeno sustituyente. La suma es sobre el número de átomos de halógeno en HT.

Así, la ecuación 7.1 predice que un incremento en $\sum \zeta^2$ producirá un aumento en el valor de k_q .

Por otra parte, volviendo al esquema 7.1, se encuentra que desde el complejo de encuentro previo a la formación del exciplexo, habría una contribución adicional al cruce entre sistemas, dada por el efecto de los átomos pesados, aumentando el valor de la constante de inhibición física, que no existe si los átomos pesados no están presentes.

Esta propuesta introduce algunas modificaciones en el esquema 7.1, una adaptación para el caso particular de HTs es la que se muestra en el esquema 7.2.



Esquema 7.2: Esquema cinético propuesto para la inhibición de $O_2(^1\Delta_g)$ por HTs

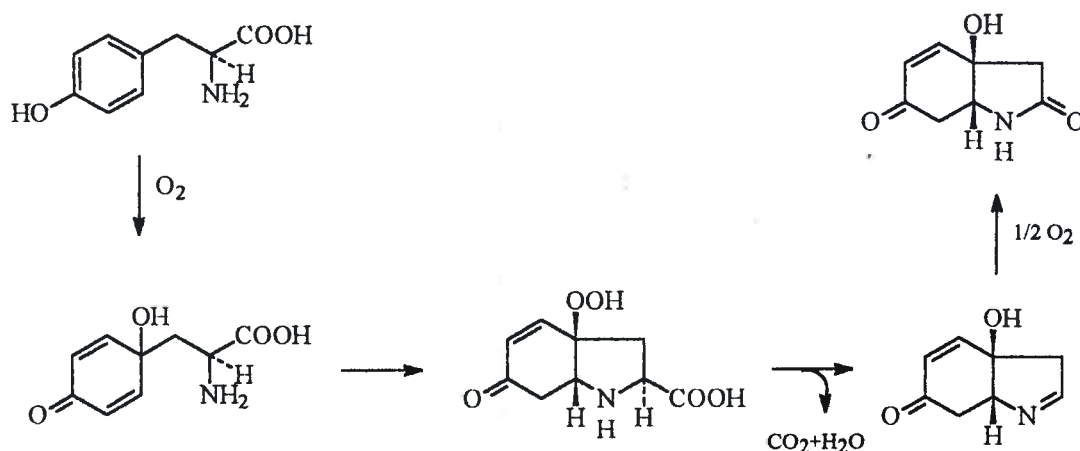
Resumiendo la idea, se encuentran dos posibles caminos para la desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$ dados por k_q y k_q' en el esquema 7.2, los cuales compiten con la formación de productos (k_p). Por ello, a medida que aumenta el número de átomos pesados las constantes de inhibición totales aumentan, a pesar del aumento en el potencial de oxidación de media onda de los compuestos. Además las constantes reactivas disminuyen debido a dos factores, el aumento en $E_{1/2}$ y el aumento en la inhibición física que constituye una vía competitiva a la formación de productos.

Este comportamiento ya ha sido predicho, pero nunca confirmado con datos experimentales, hasta donde se sabe.^{28, 34}

Los compuestos no iodados, que sólo difieren en la presencia del grupo aminoácido, obviamente no sufren asistencia de átomo pesado y se comportan cinéticamente de modo similar, considerando el balance k_r/k_t .

El residuo aminoácido, presente en todas la HTs, participa en la generación de productos de oxidación, según lo sugieren los experimentos realizados con fluorescamina. Además, las velocidades relativas de consumo de grupo amino, estimadas a partir de las pendientes iniciales de las correspondientes curvas de consumo los respectivos valores de k_r .

Con respecto al mecanismo de reacción para Tyr, que da cuenta del consumo de grupo amino, el mecanismo de reacción propuesto por Katsuya et al.³⁵ es el que se muestra a continuación:

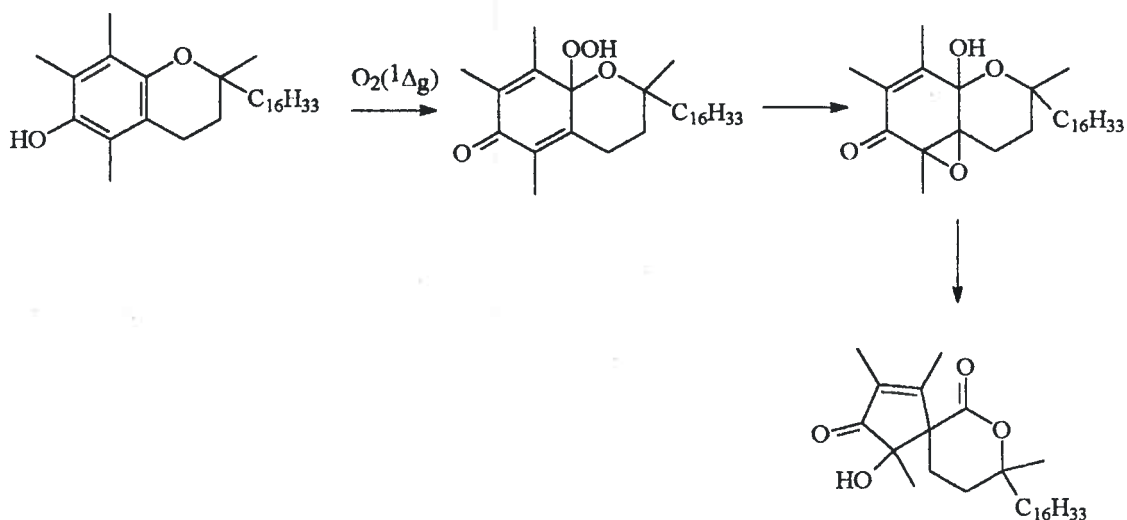


El cual es consistente con los datos experimentales relacionados con la estequiometría de la reacción y el consumo observado de grupo amino.

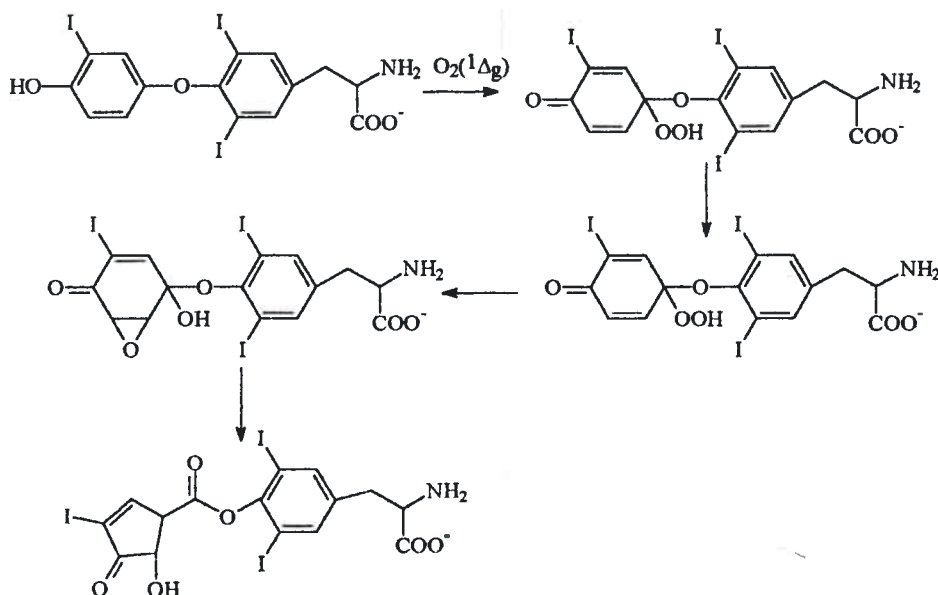
Si se supone un mecanismo análogo para la serie de los compuestos binucleares se esperaría la producción de p-benzoquinona como uno de los productos de reacción. Los estudios realizados con TN no muestran evidencia sobre la formación de tal compuesto, ya se discutió en los resultados las posibles causas de esta observación.

En cuanto a los productos encontrados, y siguiendo la analogía estructural de HTs con tocoferoles, con respecto al sitio reactivo frente a $O_2(^1\Delta_g)$ (un fenol con un éter en posición 4), Constantini et al.³⁶ reportaron que como consecuencia de la fotooxidación sensibilizada de α -tocoferol encontraron la formación de 7-

oxaspiro[4,5]dec-1-eno-3,6-diona, cuya estructura y mecanismo de formación se presenta a continuación.



Siguiendo esa línea, se podría asignar un mecanismo análogo al anterior para la formación del producto de fotooxidación de T3 que se corresponde con el PM de T3+O₂, como se presenta a continuación.



A partir del espectro de masas se encuentra un pico a 222 que sería asignable al fragmento correspondiente a la ruptura en el enlace entre el ciclopenteno y la función éster.

En el espectro de masas de T3 se destacan como los principales picos aquellos que se corresponden con la pérdida de átomos de yodo. No se encontraron tales

fragmentos en el espectro del producto supuesto. Los restantes picos del espectro no coinciden con fragmentos que mantengan la parte aromática de la molécula sin romper.

Con estos resultados no es posible asignar con seguridad la estructura del producto estudiado. Seguir indagando sobre el tema escapa a los objetivos centrales de esta Tesis.

REFERENCIAS

- ¹ M.Y. Li, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell and P. Bliski. *Photochem. Photobiol.* 74 (2001), 760-764.
- ² J. Lee, I. B. C. Matheson, J. E. Wampler, R. D. Etheridge and N. U. Curry. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Extpl. Biol.* 32 (1973) 661.
- ³ Susana Criado. Tesis Doctoral. Pag. 138. UNRC. 1997.
- ⁴ D.C. Neckers. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 47. 1. (1989)
- ⁵ F. Wilkinson, W. Phillip Helman and A. B. Ross. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 24. 663-1021. (1995).
- ⁶ María Isela Gutierrez. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. (1998).
- ⁷ N. A. García. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 22. (1994). 185-196.
- ⁸ M. J. Thomas and C. S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 22. (1977). 683.
- ⁹ P. Boule, C. Guyon and J. Lemaire. *Chemosphere.* 13 (1984). 603
- ¹⁰ C. R. Stephens, K. Murai, K. J. Brunings and R. B. Woodward. *J. Am. Chem. Soc.* 78. (1956). 4155.
- ¹¹ J. A. Wiebe and D. E. Moore. *J. Pharm. Sci.* 66. (1967). 186
- ¹² A.S. Li, C.F. Chignell and R. Hall. *Photochem. Photobiol.* 46. (1987). 379-382.
- ¹³ A. K. Davies, J. F. McKellar G. O. Phillips and A. G. Reid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* (1979), 369.
- ¹⁴ K. Gollnick, S. Held, D. O. Mártire and S. E. Braslavsky. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 69, (1992), 155.
- ¹⁵ I. Gutiérrez, S. Bertolotti, M. Biasutti, A. Solterman and N. García. *Can. J. Chem.* 75. (1997) 423-428..
- ¹⁶ C. S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659.
- ¹⁷ M. Koizumi, S. Kato N. Mataga, T. Matsuura and I. Isui. *Photosensitized reactions. Kagakudogin. Kyoto* (1978).
- ¹⁸ F. Wilkinson, J.G. Brummer. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 10. (1981) 809.
- ¹⁹ The Merck Index. 11th ed. Merck & Co. Inc. Rahway. N. J. U.S.A. (1989)
- ²⁰ I. Carmichael and G. L. Hug. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 15. (1986). 106.

-
- ²¹ S. Criado, A. Soltermann, J. Marioli and N. García. *Photochem. Photobiol.* 68(4). (1998). 453
- ²² C. Li and M. Hoffman. *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 5998-6002.
- ²³ R. Gerdes, D. Worle, W. Spiller, G. Schneider, G. Schnurpfeil and G. Schulz-Ekloff. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 111 (1997). 65-74.
- ²⁴ S. I. Bailey, I. M. Ritchie and F. R. Hewgill. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 104, (1983), 645.
- ²⁵ E.F. Zwicker and L.I. Grossweiner. *J. Phys. Chem.* 67. (1963). 549.
- ²⁶ K. Okamoto, F. Hondo, A. Itaya, and S. Kusabashashi, *J. Chem. Eng. JPN.* 15, (1982) 368.
- ²⁷ A. A. Gorman, I. R. Gould, I. Hamblett, M. C. Standen. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, (1982), 7098.
- ²⁸ A. A. Gorman, I. Hamblett, C. Lambert, B. Spencer and M. C. Standen. *J. Am. Chem. Soc.* 110, (1988). 8059.
- ²⁹ A. A. Gorman, I. R. Gould, I. Hamblett and M.C. Standen. *J. Am. Chem. Soc.* 106, (1984) 6956.
- ³⁰ M. J. Thomas and C. S. Foote. *Photochem. Photobiol.* 27 (1978). 683.
- ³¹ A. P. Darmanyan, W. S. Jenks and P. Jardon. *J. Phys Chem. A.* 102 (1998). 7420.
- ³² N.A. García. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 22, (1994). 185.
- ³³ V. Avila, C. A. Chesta, J.J. Cosa and C. M. Previtali. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90(1), (1994). 69.
- ³⁴ N. J. Turro. *Tetrahedron*, 41, (1985) 2089.
- ³⁵ E. Katsuya, K. Seya and H. Hikino. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1988) 934.
- ³⁶ C. Constantini, M. d'Ischia, A Napolitano, G. Misauraca and G. Prota. *Biochim. Biophys. Acta.* 1116 (1992) 291.

8 CONCLUSIONES

Tanto los antibióticos del grupo de las tetraciclinas como las hormonas tiroideas y sus precursores sintéticos pueden estar o están presentes, respectivamente, en los seres vivos. El riesgo de su encuentro con $O_2(^1\Delta_g)$ existe. De modo que es importante, desde el punto de vista de la acción fotodinámica, conocer la cinética de sus reacciones químicas y las consecuencias de las interacciones entre estos compuestos y $O_2(^1\Delta_g)$.

En el estudio de tetraciclinas se puede establecer que, como tendencia general, tanto k_t como k_r son insensibles a la polaridad del solvente. En soluciones de pH mayor al pK del compuesto, cuando todos los grupos ácidos están ionizados, TCs presentan su máxima reactividad y su comportamiento está francamente gobernado por la presencia del anión fenóxido en su estructura. A medida que el pH disminuye, aún se mantiene una reactividad residual (comparada con fenol), que se debe a la presencia de otros sitios reactivos como lo son los grupos enol presentes en estas moléculas.

En presencia de un inhibidor de $O_2(^1\Delta_g)$ se observa un consumo residual de O_2 , mientras que en ausencia de O_2 existe algún consumo de sustrato. En condiciones de oscuridad no se detecta reacción. Por experiencias de láser flash fotólisis se encuentra que la presencia de Tet inhibe el estado triplete excitado de RB, como se advierte en la disminución de su tiempo de vida. Estos hechos demuestran la existencia de un mecanismo de reacción fotoquímica paralelo al del tipo II. Por lo tanto las constantes de velocidad reactivas deben tomarse como límite superior.

Con respecto a la relación estructura-reactividad, la presencia o ausencia de grupos metilos y/u oxhidrilos en las posiciones de R_2 , R_3 y R_4 (pag. 27) no muestran efectos destacables. Este hecho permite concluir que tales sustituyentes no tienen intervención sobre los centros reactivos, lo cual es concordante con la suposición de que estos centros son el fenol del anillo D y los enol de los anillos A y B (pag.54).

Los rendimientos cuánticos de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por TCs son sumamente bajos, entre 0 y 0.04. Por lo tanto su fototoxicidad puede ser asignada a su producto de fotooxidación, el cual posee un $\Phi\Delta$ elevado (0,24).

En cuanto al análisis microbiológico se ha encontrado que los productos de fotooxidación de Tet conservan un poder antibiótico residual.

Para el grupo de HTs, las interacciones con $O_2(^1\Delta_g)$ son altamente efectivas en medio alcalino, donde los grupos ácidos de los sustratos están totalmente ionizados.

La presencia de un inhibidor de $O_2(^1\Delta_g)$, tal como NaN_3 disminuye masivamente el consumo de oxígeno por los compuestos estudiados, sin embargo los procesos de Tipo I son importantes si la sensibilización se produce mediante colorantes xanténicos, considerando las altas constantes de inhibición del estado triplete de estos colorantes por TN y T4. Con PN, en tanto, se consiguieron procesos de Tipo II puros.

Cuando se llevan a cabo fotólisis a altas conversiones de T4 los productos de la reacción comienzan a competir con el sustrato de partida por $O_2(^1\Delta_g)$, inhibiendo la reacción primaria.

El mecanismo de la reacción, tanto para el grupo de Tyrs como para TNs involucra pérdida de grupo amino primario, para el caso de Tyrs tal mecanismo ya ha sido propuesto por Katsuya et al. y presentado en la página 98, en el grupo de TNs se advierte la formación de varios productos de fotooxidación, uno de ellos incorpora una molécula de O_2 a la estructura de T3, tal vez mediante un mecanismo de reacción comparable al de tocoferoles.

Se advierte que el incremento en el número de átomos de iodo en la molécula favorece la desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$, frente a la reactividad química, por efecto de átomo pesado, el cual facilita el cruce intersistema del complejo de encuentro HT- $O_2(^1\Delta_g)$. Esta aseveración constituye un hecho novedoso, ya que no se registra en literatura reportes de tal efecto sobre $O_2(^1\Delta_g)$.

Si bien TCs y HTs poseen estructuras químicas francamente diferentes, ambos grupos de compuestos presentan altas constantes de velocidad globales y reactivas frente a $O_2(^1\Delta_g)$, especialmente en medio alcalino, con cierto componente de procesos de Tipo I, con los sensibilizadores xanténicos empleados. Los compuestos fenólicos se comportan de modo análogo, y considerando que es el grupo funcional que presentan en común estos compuestos, es éste es el que aparentemente domina la reactividad de todas estas sustancias con $O_2(^1\Delta_g)$.

No obstante, la complejidad de la estructura molecular y la presencia de distintos grupos funcionales juegan un rol importante y dan origen a una variedad de

matices en el comportamiento cinético de TCs y HTs que demandan un análisis particular para cada grupo de compuestos.

Por todo lo expuesto es que se debe tener especial precaución, tanto en la preparación de la fórmula farmacológica de estos compuestos en caso de ser empleados como medicamentos preparados en solución, como en la administración de los mismos, sobre todo con los antibióticos, que se acumulan en la piel y pueden causar daño fotooxidativo a través de su acción fotodinámica.



U.N.R.C.
Biblioteca Central



59102

59102