



CREER... CREAR... CRECER

TRABAJO FINAL

LICENCIATURA EN QUÍMICA

“Evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos frente a la especie oxígeno singlete”

Autor: Toledo, Karina Itatí

Directora: Dra. Criado, Susana Noemí

Co-Directora: Dra. Altamirano, Marcela Susana

Tutores: Dra. Rivarola, Claudia

Dra. Milanesio, M. Elisa

Departamento de Química

Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales

Universidad Nacional de Río Cuarto

AÑO: 2019

INDICE:

| | |
|---|----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 1.1 Oxígeno..... | 3 |
| 1.2 Generación de $O_2(^1\Delta_g)$ | 4 |
| 1.2.1 Mecanismos de fotosensibilización tipo I y tipo II..... | 5 |
| 1.3. Sensibilizadores utilizados en la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ | 6 |
| 1.4. Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ | 7 |
| 1.4.1. Reacciones características de $O_2(^1\Delta_g)$ | 8 |
| 1.5. Oxidación lipídica en alimentos..... | 10 |
| 1.6. Antioxidantes en alimentos..... | 12 |
| 1.6.1. Antioxidantes fenólicos..... | 13 |
| 1.6.2. Interacción de antioxidantes..... | 18 |
| 1.7. Importancia de grupos funcionales en la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos..... | 20 |
| 1.7.1. Importancia de la presencia de compuestos fenólicos en los alimentos..... | 22 |
| 1) OBJETIVOS..... | |
| 2.1. Objetivo general..... | 24 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL..... | |
| 3.1. MATERIALES..... | |
| 3.1.1. Reactivos..... | 25 |
| 3.1.2. Solventes..... | 27 |
| 3.2. INSTRUMENTACIÓN..... | |
| 3.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Visible..... | 27 |
| 3.2.2. Fotólisis estacionaria..... | 28 |
| 3.2.3. Medidas resueltas en el tiempo | 29 |
| 3.3. METODOLOGÍA | |
| 3.3.1. Ensayos de solubilidad..... | 31 |
| 3.3.2. Estimación de pKa de los sustratos..... | 31 |
| 3.3.3. Determinación de coeficientes de absorptividad molar..... | 32 |
| 3.3.4. Preparación de soluciones..... | 32 |
| 3.3.5. Experimentos de consumo de sustrato, sensibilizados por PN..... | 33 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.3.6. | Determinación de las constantes de velocidad de desactivación reactiva (k_r) de $O_2(^1g)$ por los sustratos..... | 33 |
| 3.3.7. | Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1g)$ por los sustratos..... | 34 |
| 3.3.8. | Determinación de la capacidad antioxidante de los sustratos frente a aditivos comerciales..... | 35 |
| 3.3.9. | Determinación del efecto antioxidante de mezclas de los sustratos con antioxidantes comerciales..... | 35 |
| 3.3.10. | Evaluación de la participación de la especie $O_2(^1g)$ en la fotooxidación de los sustratos sensibilizada por PN..... | 35 |
| 3.3.11. | Determinación de la capacidad prooxidante de los sustratos..... | 36 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| 4.1. | Caracterización espectroscópica de los sustratos..... | 38 |
| 4.2. | Determinación del coeficiente de absortividad molar de los compuestos en estudio..... | 43 |
| 4.3. | Asociación oscura sensibilizador-sustratos..... | 46 |
| 4.4. | Experimentos de consumo de sustrato, sensibilizado por PN..... | 49 |
| 4.5. | Determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva (k_r) de $O_2(^1g)$ por los sustratos..... | 53 |
| 4.6. | Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1g)$ por los sustratos..... | 56 |
| 4.7. | Capacidad antioxidante de los sustratos frente a aditivos de uso comercial..... | 60 |
| 4.8. | Interacción antioxidante de sustratos con antioxidantes comerciales..... | 62 |
| 4.9. | Evaluación de la participación de la especie $O_2(^1g)$ en la fotooxidación de los sustratos, sensibilizada por PN..... | 64 |
| 4.10. | Capacidad prooxidante de los sustratos..... | 67 |
| 5. | CONCLUSIONES | 70 |
| 6. | REFERENCIAS | 71 |

RESUMEN

Los lípidos constituyentes de los alimentos son muy susceptibles a sufrir autooxidación cuando éstos se hallan expuestos a factores como luz, elevadas temperaturas, presencia de oxígeno, entre otros, que llevan a la pérdida de las propiedades sensoriales y nutritivas del producto. La autooxidación se inicia a partir de la reacción de los ácidos grasos insaturados con el oxígeno y es desencadenada o acelerada por la exposición del producto alimenticio a la luz ambiental. En estos casos, ocurre un proceso denominado **fotooxidación sensibilizada**, con la participación de una especie reactiva de oxígeno, el oxígeno singlete $O_2(^1g)$.

Ante la necesidad de evitar o minimizar este proceso natural de oxidación, las industrias recurren a diferentes técnicas a la hora de preservar los alimentos. Una de ellas es el agregado de antioxidantes, con el fin de que estos compitan frente a los ácidos insaturados por el $O_2(^1g)$. Debido a recientes evidencias que muestran efectos tóxicos de algunos antioxidantes hacia la salud de los consumidores, se ha comenzado a investigar las propiedades de antioxidantes de origen natural. Dentro de ellos, los fenoles han despertado un creciente interés, dada su ubicuidad dentro del reino vegetal y su eficiente función protectora frente a la oxidación lipídica.

En este contexto se mostrará mediante el presente trabajo, la capacidad antioxidante de tres compuestos; vanilina, 4-hidroxifenilalcohol y ácido cinámico, y el tipo de efecto antioxidante de mezclas con aditivos de uso comercial, con el fin de proponerlos como potenciales antioxidantes en la elaboración, procesamiento y almacenamiento de alimentos de consumo humano.

1. INTRODUCCION

Los lípidos son nutrientes indispensables en la alimentación diaria de los seres vivos. Presentan la función de reserva energética, intervienen en el crecimiento de algunos tejidos y en la regulación hormonal. El cuerpo humano no tiene la capacidad de sintetizarlos, por lo que deben ser incorporados mediante la dieta¹.

A diferencia de las otras macromoléculas presentes en los alimentos, son muy susceptibles de sufrir alteraciones en sus estructuras debido a procesos tales como pardeamiento enzimático, pardeamiento no enzimático y autooxidación que conducen a la formación de compuestos de potencial toxicidad. Factores como la luz, la temperatura y la presencia de oxígeno, son responsables del inicio de uno de los mecanismos naturales más frecuente a través del cual se deterioran los alimentos: la rancidez oxidativa. Ésta consiste en una serie de reacciones radicalarias en cadena, aceleradas por la exposición del alimento a la luz ambiental. En estos casos, ocurre un proceso denominado **fotooxidación sensibilizada**, con la participación de una especie reactiva de oxígeno, el *oxígeno singlete* $O_2(^1\Delta_g)$. Esta especie se genera por transferencia de energía desde los estados excitados de una sustancia coloreada, presente en el alimento, capaz de absorber luz ambiente o solar. Luego el $O_2(^1\Delta_g)$ generado, puede decaer por interacción no reactiva con las moléculas del medio o interactuar de manera física y/o reactiva con un sustrato presente en el alimento, alterando la calidad del producto y generando, eventualmente, productos tóxicos nocivos para la salud del consumidor²⁻⁶.

Ante la necesidad de evitar o minimizar el proceso de autooxidación, las industrias recurren a diferentes técnicas a la hora de preservar sus productos alimenticios. Una de ellas es el agregado de antioxidantes, con el fin de que estos compitan frente a los ácidos insaturados presentes en los alimentos, por el $O_2(^1\Delta_g)$. Los más utilizados son los antioxidantes artificiales como butil hidroxitolueno, hidroxibutianisol, terbutil hidroquinona, ácido ascórbico, alfa-tocoferol y derivados del ácido rosmarínico. Debido a recientes evidencias que muestran algunos efectos nocivos de éstos hacia la salud de los consumidores, se comenzaron a estudiar las propiedades de antioxidantes de origen natural, tales como, los polifenoles^{7,8}.

En este contexto, en el presente trabajo, se estudia la capacidad antioxidante de compuestos; 4-hidroxifenilalcohol (o 4-(2-hidroxietil) fenol), vanilina y ácido cinámico frente a la especie reactiva fotogenerada $O_2(^1\Delta_g)$, en diferentes condiciones de reacción, y su

potencial capacidad antioxidante comparada a la de aditivos utilizados actualmente en la industria alimentaria como antioxidantes.

Teniendo en cuenta que este estudio se encuentra orientado a la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos frente a una de las especies reactivas de oxígeno, $O_2(^1\Delta_g)$, se explicarán a continuación una serie de fundamentos teóricos en los cuales se basa el presente trabajo.

1.1. OXÍGENO

El oxígeno es uno de los elementos predominantes de la atmósfera terrestre. Se encuentra en forma de molécula biatómica gaseosa (O_2). En su estado basal y a temperatura ambiente, presenta poca reactividad frente a sustratos orgánicos. Esto se debe a la configuración electrónica de menor energía en la que sus dos electrones externos se hallan desapareados con igual sentido de giro o espín (Regla de Hund) llamando a este estado, estado electrónico triplete. Cuando el oxígeno en su estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$), absorbe energía, puede alcanzar dos estados electrónicamente excitados próximos en energía denominados oxígeno singlete, estos son: sigma ($^1\Sigma_g^+$) y delta ($^1\Delta_g$).

En la Figura 1 se muestra un diagrama de los estados electrónicos del oxígeno.

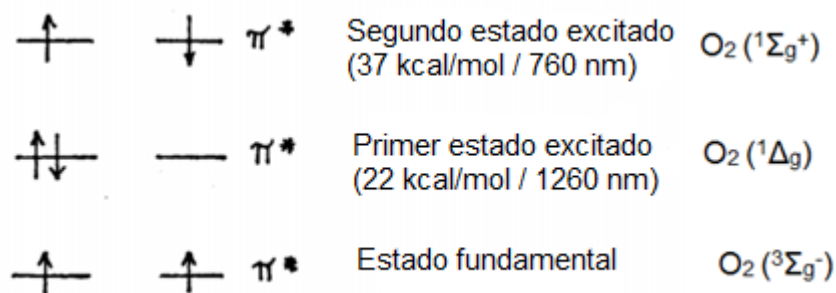


Figura 1: Estados electrónicos del oxígeno.

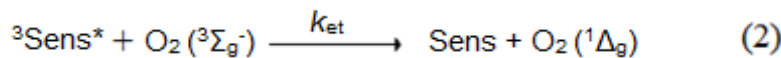
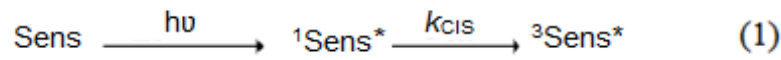
El primer estado (de mayor energía) conserva cada electrón desapareado en sentido antiparalelo en los diferentes orbitales moleculares externos $2\pi^*$. En dicho estado, no participa en reacciones, por su corto tiempo de vida, lo que lo lleva a decaer rápidamente hasta alcanzar la configuración del estado delta ($^1\Delta_g$), en la que los electrones se encuentran apareados ocupando sólo uno de los orbitales $2\pi^*$. Al estar este último más cercano en energía al estado basal, constituye una especie electrofílica muy reactiva, a la

cual se la denomina $O_2(^1\Delta_g)$. Esta reactividad se debe a que las sustancias con las que habitualmente reacciona se encuentran en el estado basal singlete, siendo la reacción singlete-singlete más probable que una reacción triplete-singlete, como debería ser con el oxígeno molecular en su estado basal^{9,10}.

La transición del estado excitado $^1\Delta_g$ al estado basal $^3\Sigma_g^-$ es prohibida por espín, por lo que el estado $^1\Delta_g$ posee un tiempo de vida relativamente largo, comprendido 10^{-6} - 10^{-3} s. El segundo estado excitado de mayor energía $^1\Sigma_g^+$, posee un tiempo de vida corto 10^{-11} - 10^{-9} s debido a que las transiciones al estado excitado de menor energía son permitidas por espín¹¹.

1.2. GENERACION DE $O_2(^1\Delta_g)$

Existen diversas fuentes para generar $O_2(^1\Delta_g)$, clasificadas dentro de tres grandes grupos, dependiendo si la generación ocurre de forma química, biológica o fotoquímica. La fuente fotoquímica, la cual cobra interés en el presente trabajo, involucra el proceso de **fotosensibilización**, (Esquema 1) que consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada denominada *sensibilizador*, al oxígeno molecular en estado basal presente en el medio. Como resultado de esta transferencia¹⁰, el sensibilizador vuelve a su estado fundamental y el oxígeno molecular se excita a su estado singlete $O_2(^1\Delta_g)$.



Esquema 1: Generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por fotosensibilización.

El sensibilizador en el estado fundamental (Sens) absorbe luz de una cierta longitud de onda para generar el estado electrónico singlete excitado ($^1\text{Sens}^*$). Mediante un proceso denominado cruzamiento entre sistemas (k_{CIS}) es posible la generación del estado electrónico triplete excitado del sensibilizador ($^3\text{Sens}^*$), en el cual ocurre la inversión del espín del electrón. Desde este estado del sensibilizador, ocurre un proceso de transferencia de energía por intercambio electrónico con las moléculas de oxígeno presentes en el medio, produciendo la generación de oxígeno en estado electrónico singlete excitado $O_2(^1\Delta_g)$ y la

relajación del sensibilizador excitado al estado fundamental (Sens). Es importante destacar que este proceso es posible termodinámicamente cuando la energía del estado electrónico triplete excitado del sensibilizador es superior a la energía necesaria para la activación del oxígeno molecular a su estado electrónico singlete excitado^{9,12}.

El diagrama de Jablonski para la sensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$, mostrado en la Figura 2, permite representar gráficamente los procesos físicos que puede sufrir una molécula al absorber energía⁹. En él se pueden observar los procesos de absorción ($h\nu$), de relajación vibracional (RV), cruzamiento entre sistemas (CIS), conversión interna (CI), fluorescencia ($h\nu'$) y fosforescencia ($h\nu''$), junto a los valores de energía involucradas en cada proceso.

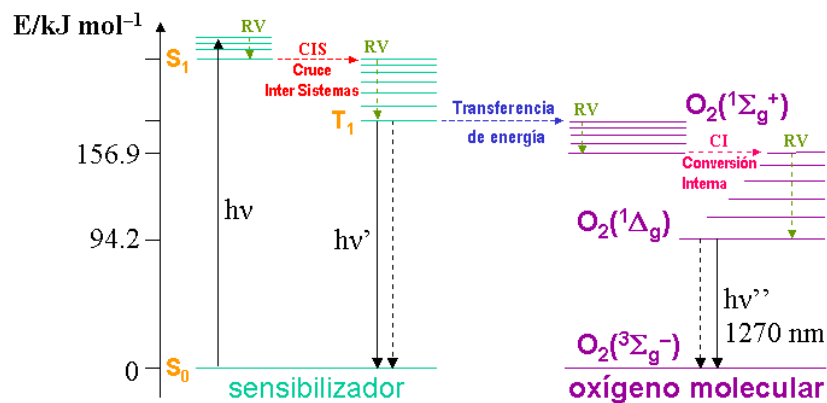
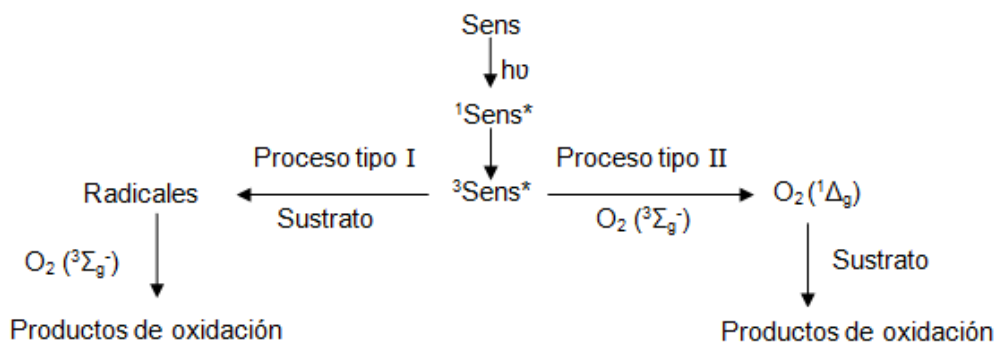


Figura 2. Diagrama de Jablonski para el proceso de sensibilización de $O_2(^1\Delta_g)$.

1.2.1. Mecanismos de fotosensibilización tipo I y tipo II

Una vez que el sensibilizador logra alcanzar su estado electrónico triplete excitado ($^3Sens^*$), se produce una competencia entre dos procesos que pueden ocurrir de manera simultánea y que se denominan *Mecanismo tipo I* y *Mecanismo tipo II*, tal como se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2: Mecanismos de sensibilización tipo I y tipo II.

El mecanismo tipo I involucra la reacción del sensibilizador en estado electrónico triplete excitado ($^3\text{Sens}^*$) directamente con el solvente o el sustrato mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno o la transferencia de un electrón, produciendo radicales libres. Estos radicales libres pueden reaccionar con oxígeno y formar alguna especie reactiva de oxígeno, la cual, puede interactuar con compuestos presentes en el medio y generar productos oxidados.

En el mecanismo tipo II, el sensibilizador en estado electrónico triplete excitado ($^3\text{Sens}^*$) transfiere su energía a una molécula de oxígeno en su estado basal $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ generando la especie reactiva $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, la cual puede reaccionar con un sustrato presente en el medio, produciendo la oxidación del mismo. El hecho de que una reacción siga uno u otro mecanismo depende del sensibilizador, del sustrato y de las condiciones de reacción¹⁰.

1.3. SENSIBILIZADORES UTILIZADOS EN LA GENERACIÓN DE $\text{O}_2(^1\Delta_g)$

Generalmente el sensibilizador utilizado para la generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ consiste en un colorante orgánico, cuya estructura química presenta grupos cromóforos responsables de absorber la luz UV-Visible. Un sensibilizador ideal debe poseer las siguientes características:

- 2) Presentar un elevado rendimiento cuántico de cruzamiento entre sistemas (lo más próximo a la unidad), asegurando una óptima población de sus estados tripletes excitados.
- 3) Poseer una elevada energía en el estado triplete excitado de modo que permita maximizar la eficiencia del proceso de transferencia de energía hacia el oxígeno en estado fundamental.

- 4) Tener un alto coeficiente de absorptividad molar a la longitud de onda de excitación.
- 5) Presentar una baja reactividad química.
- 6) Poseer una alta estabilidad térmica y fotoquímica.
- 7) Ser soluble en el medio de reacción.

El parámetro más importante al seleccionar un sensibilizador es la diferencia de energía entre el sensibilizador excitado y el oxígeno, ya que solamente ocurrirá la sensibilización si la transferencia de energía es exotérmica¹³.

Los sensibilizadores más comúnmente utilizados y comercialmente disponibles para la generación de $O_2(^1\Delta_g)$, son colorantes cuya estructura presenta un elevado rendimiento cuántico del estado triplete excitado, tales como: fenalenona, con un valor de rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ ($\Phi_\Delta = 1$) y rosa de bengala ($\Phi_\Delta = 0.75$). Dichos valores de Φ_Δ han sido obtenidos como promedio en un amplio número de solventes y mezclas que cubren casi la totalidad de la escala de polaridad y con propiedades químicas muy variadas^{14,15}.

En este trabajo, se utilizó el colorante orgánico fenalenona conocida comercialmente como Perinaftenona (PN)¹⁵⁻¹⁷.

1.4. DESACTIVACION DE $O_2(^1\Delta_g)$

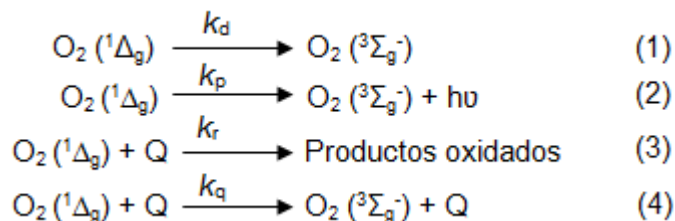
El $O_2(^1\Delta_g)$ puede desactivarse por diversas vías, como se muestra en el Esquema 3.

- *Desactivación no radiativa* (proceso 1), es un tipo de desactivación física, en la que el oxígeno en estado electrónico singlete excitado por interacción con el solvente, retorna nuevamente a su estado fundamental triplete. Dicho proceso ocurre con una constante de velocidad denotada por k_d .

- *Desactivación radiativa* (proceso 2), a través de esta vía, el $O_2(^1\Delta_g)$ se desactiva emitiendo luz, proceso llamado fosforescencia, cuya constante de velocidad se denota k_p . En general, la velocidad de esta vía de desactivación es mucho menor que la forma no radiativa ($k_d \gg k_p$).

- *Desactivación por interacciones con compuestos desactivantes presentes en el medio (quencher)*. El $O_2(^1\Delta_g)$ puede ser desactivado por moléculas orgánicas e inorgánicas, (sustrato Q). Este proceso de desactivación puede ser químico, el cual mediante rupturas o generación de enlaces da origen a nuevos productos (constante de velocidad k_r) (proceso 3) y/o físico (constante de velocidad k_q), ya sea por transferencia de energía o por

transferencia de carga, cuyo mecanismo transcurre en presencia de moléculas ricas en electrones^{10,14} (proceso 4), generando la desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ a su estado fundamental.



Esquema 3: Vías de desactivación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$.

1.4.1. REACCIONES CARACTERÍSTICAS DE $O_2(^1\Delta_g)$

El $O_2(^1\Delta_g)$ tiene la capacidad de oxidar sustratos que no son afectados por el oxígeno molecular en su estado fundamental ($O_2(^3\Sigma_g^-)$). Al ser más electrofílico que el $O_2(^3\Sigma_g^-)$ reacciona rápidamente con enlaces insaturados y nucleófilos neutros, tales como sulfuros, aminas y fenoles. Presenta la habilidad de formar complejos con metales, especialmente con Níquel (II). Puede además reaccionar con olefinas con dos o más sustituyentes alílicos causando una ruptura del doble enlace y formando endoperóxidos (cicloadiciones [4 + 2] con 1,3-dienos), dioxoetanos (cicloadiciones [2+2] con alquenos aislados), e hidroperóxidos¹⁰.

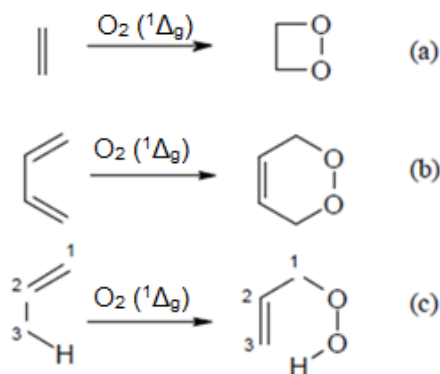


Figura 3: Reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$: (a) cicloadición [2 + 2], (b) cicloadición [2+ 4], (c) adición 1,2-eno.

Actualmente se sabe que las reacciones bimoleculares entre $O_2(^1\Delta_g)$ y sustratos tales como índoles^{18,19}, aminas²⁰ y fenoles²¹⁻²³ se llevan a cabo a través de un mecanismo que involucra un complejo de encuentro.

Gorman y col.^{18,23} han demostrado que las reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ proceden vía la formación rápida y reversible de un complejo de encuentro [$O_2(^1\Delta_g)$ -sustrato], con carácter parcial de transferencia de carga, actuando el $O_2(^1\Delta_g)$ como aceptor de electrones^{18,23,24}.

En la Figura 4 se observa el mecanismo propuesto^{25,26} para las reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ donde k_{exc} y k_{-exc} son las constantes de velocidad de formación y disociación del complejo de encuentro, respectivamente, k_r es la constante de velocidad de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$, k_{CIS} es la constante de velocidad de cruce entre sistemas singlete- triplete y k_q corresponde a la constante de velocidad para la desactivación física de $O_2(^1\Delta_g)$.

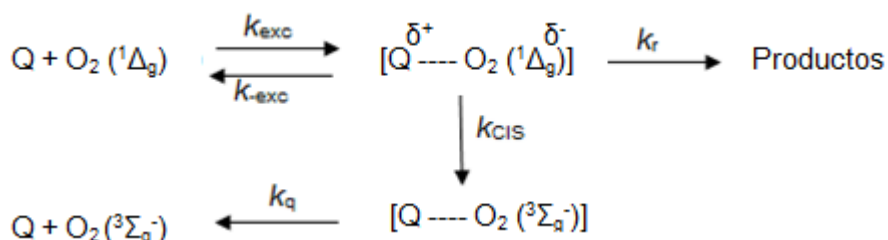


Figura 4: Formación del complejo de encuentro para la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por un sustrato Q.

Gorman y col.²⁷⁻²⁹ postulan, además, que tal mecanismo opera generalmente para reacciones de $O_2(^1\Delta_g)$ con sustratos orgánicos dentro de los límites $k_r \gg k_{CIS}$ (desactivación reactiva) y $k_{CIS} \gg k_r$ (desactivación física). El balance entre estas constantes de velocidad es sensible a la función de acoplamiento espín-orbita y a factores de entropía. Las evidencias experimentales que favorecen este mecanismo, indican que el complejo de encuentro se forma en un equilibrio rápido y reversible.

Por otro lado, dado el carácter de separación de cargas que se ha planteado para el complejo de encuentro que se forma, es importante considerar que su formación tendrá una gran dependencia con la capacidad dadora de electrones del sustrato, puesto que este factor podría modificar las restricciones de entropía del estado de transición, como los requerimientos de reorganización del solvente.

1.5. OXIDACIÓN LIPÍDICA EN ALIMENTOS

La oxidación lipídica en alimentos, es afectada por factores internos y externos a éstos, tales como la composición de ácidos grasos, actividad pro- y antioxidante, luz, temperatura, presencia de oxígeno, área superficial en contacto al oxígeno, entre otros.

La oxidación de los lípidos polinsaturados en los alimentos puede ocurrir a través de tres vías: I) autooxidación no enzimática de la cadena, mediada por radicales libres, II) fotooxidación y III) oxidación enzimática llevada a cabo por lipoxigenasas.

La primera vía involucra una serie de reacciones en cadena de radicales libres en presencia del oxígeno, y ocurre en tres fases; I) iniciación, II) propagación y III) terminación^{24,30}, tal como se menciona en la Figura 5.

La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno en estado electrónico triplete $O_2(^3\Sigma_g^-)$ está prohibida por el principio de conservación de espín, ya que la multiplicidad de los lípidos en su estado de menor energía es singlete. La conversión de $O_2(^3\Sigma_g^-)$ a $O_2(^1\Delta_g)$ necesita la presencia de sensibilizadores³¹.

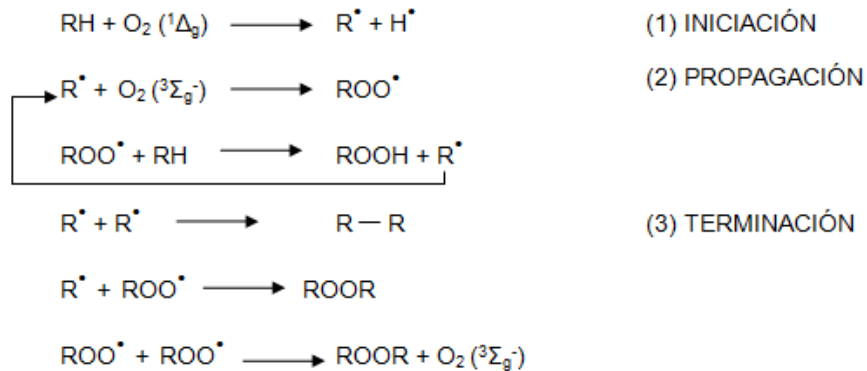


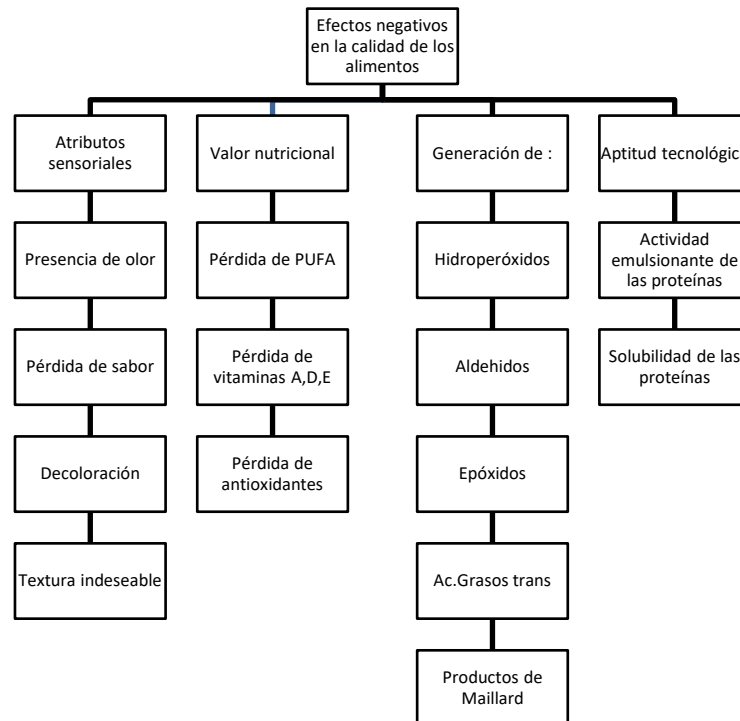
Figura 5: Mecanismo de oxidación de lípidos insaturados.

En la etapa de iniciación (paso 1), el lípido denotado como RH, en presencia de un iniciador, en este caso $O_2(^1\Delta_g)$, pierde un átomo de hidrógeno situado en la posición α al doble enlace de la cadena de ácido graso, generando el radical lipídico R^\bullet . Dicho radical rápidamente reacciona con una molécula de oxígeno presente en el medio, dando como producto el radical peroxilo, ROO^\bullet (paso 2), el cual elimina un átomo de hidrogeno de otra molécula de lípido insaturado, formando un nuevo radical R^\bullet , junto al hidroperóxido lipídico ROOH, iniciando cíclicamente la secuencia de propagación. La etapa de propagación es

interrumpida por reacciones de terminación, en las cuales hay formación de productos no radicales muy estables (paso 3).

Los hidroperóxidos ROOH constituyen los productos primarios de oxidación y se caracterizan por su inestabilidad, por lo que son capaces de interactuar con otras moléculas y/o sufrir procesos de descomposición, generando los denominados productos secundarios de oxidación tales como ésteres, cetonas, aldehídos, hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos volátiles con atributos sensoriales a muy bajas concentraciones. Estos compuestos son los responsables del olor y cambios de sabor relacionados a la rancidez en los alimentos, principalmente por las interacciones con otros componentes, especialmente proteínas^{31,32}. La composición de la mezcla de compuestos encontrados en la oxidación, tanto cuali como cuantitativamente, depende del tipo de lípidos constituyentes del alimento, la presencia de prooxidantes, de antioxidantes y de las condiciones en las que se lleve a cabo la oxidación^{33,34}.

El Esquema 4, muestra de forma resumida los distintos efectos negativos de la oxidación lipídica en los alimentos.



Esquema 4: Efectos negativos de la oxidación lipídica en los alimentos.

1.6. ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS

Durante años fueron desarrollados numerosos métodos orientados a controlar la velocidad de la rancidez oxidativa. Se encontró que la adición de sustancias antioxidantes, durante el procesamiento y almacenamiento de los productos alimenticios, era el método más efectivo. Su agregado, permitía extender y preservar la calidad del producto sin ningún efecto adverso sobre las cualidades sensoriales o nutricionales, además al ser ingeridos, ayudaban a conservar la salud de los individuos que los consumían³⁵.

En 1995, Halliwell, Aeschbacht, Loligert y Aruoma³⁵, reportaron que los antioxidantes alimenticios también eran de interés biológico y clínico, ya que podían ayudar a proteger el cuerpo humano contra el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el mismo metabolismo.

Acordado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), el Código de Regulación Federal, define a los antioxidantes **como sustancias usadas para preservar los alimentos debido a que retardan el deterioro, la rancidez o la decoloración de estos, causados por el proceso natural de oxidación.**

Las sustancias utilizadas como antioxidantes deben poseer ciertos requisitos:

- ♦ Ser insípidas, inodoras, no impartir color.
- ♦ Ser económicas.
- ♦ No tóxicas.
- ♦ Efectivas a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable.
- ♦ Altamente estables en el producto a ser consumido.
- ♦ Capaces de sobrevivir al proceso de oxidación.
- ♦ Ser fáciles de incorporar al alimento.
- ♦ Buena solubilidad en el producto.

Para que un compuesto sea considerado antioxidante, debe intervenir en algún paso de la reacción de oxidación lipídica, ralentizando la aparición de productos primarios, secundarios y olores desagradables asociados a la rancidez³¹.

Los antioxidantes pueden actuar a través de varios mecanismos, ya sea mediante el bloqueo en la etapa de iniciación de la oxidación, reducción de la velocidad de oxidación, inactivación de los radicales libres, el control de los metales de transición, y la eliminación de $O_2(^1\Delta_g)$. Por esta razón, son clasificados de acuerdo a la etapa del proceso en la cual son partícipes, como antioxidantes primarios y secundarios³⁶.

Los antioxidantes primarios, actúan como aceptores de radicales libres, inhibiendo la etapa de iniciación o de propagación en la autooxidación, convirtiéndose en un producto no radical más estable. Los antioxidantes secundarios, son capaces de inactivar las moléculas inductoras de la oxidación lipídica. Dentro de esta categoría se encuentran:

- Inactivadores de metales: actúan como agentes quelantes de metales con actividad prooxidante a través del cambio en su potencial redox o inhibiendo las reacciones de descomposición de hidroperóxidos catalizadas por estos iones.
- Estabilizadores de hidroperóxidos: agentes reductores que convierten los hidroperóxidos en alcoholes (compuestos más estables).
- Fotoestabilizadores: inhiben la oxidación lipídica promovida por $O_2(^1\Delta_g)$. Estos compuestos actúan como desactivantes (quencher) transformando el $O_2(^1\Delta_g)$ en $O_2(^3\Sigma_g^-)$.
- Regeneradores de antioxidantes: actúan en general, reduciendo un compuesto que ya ha sido utilizado como antioxidante, para que pueda seguir actuando.
- Inhibidores de la propagación: capaces de reaccionar con los radicales lipídicos, formando compuestos más estables, e interrumpiendo así la etapa de propagación³¹.

Algunos son capaces de contribuir en más de un modo de acción. Además, la polaridad y la solubilidad de un antioxidante, permite determinar la ubicación real del antioxidante en una matriz alimenticia, que a su vez influye en la eficacia antioxidante del compuesto³⁶.

1.6.1. ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar una estructura química formada por un anillo aromático de benceno unido a uno o más grupos funcionales oxhidrilos (-OH). La presencia de estos grupos es lo que le confiere su capacidad antioxidante, debido principalmente a sus propiedades redox, que juegan un rol importante en la absorción y neutralización de radicales libres, quelando al $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2(^3\Sigma_g^-)$ o descomponiendo peróxidos^{37,38}.

La efectividad de los antioxidantes está relacionada con su energía de activación, la constante de velocidad, el potencial óxido-reducción, y la facilidad con la que algunos de ellos se pierden o destruyen³⁹.

El comportamiento de los antioxidantes en los alimentos y sus habilidades como tales, pueden variar dependiendo del contenido de lípidos del sistema, composición, pH, fuerza iónica, constituyentes no lipídicos, aditivos, emulsificadores, presencia de iones, entre otros.

Para que un polifenol sea definido como antioxidante debe satisfacer dos condiciones básicas:

1. Encontrarse presente en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, y de esta forma prevenir o retardar la autooxidación del sustrato mediante la formación de radicales libres.

2. Que el radical libre antioxidante resultante, no genere nuevos radicales libres, ni sea susceptible a una oxidación rápida por una reacción en cadena. Dicha estabilización puede ser lograda a través de uniones intramoleculares de hidrogeno, o deslocalización por resonancia del electrón desapareado dentro del anillo aromático y a la carencia de posiciones adecuadas para el ataque por el oxígeno molecular⁴⁰⁻⁴³.

Los antioxidantes fenólicos inhiben la autooxidación de lípidos atrapando al radical intermediario peroxil (ROO^\bullet) de dos formas diferentes: (Figura 6)

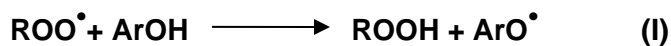


Figura 6: Inhibición de la autooxidación de lípidos por el radical peroxil

Primero el radical peroxil abstrae un átomo de hidrógeno del antioxidante fenólico (ArOH), generando el radical hidroperóxido y radical aroxil (I). Luego el radical aroxil reacciona con el peróxido mediante un acoplamiento radical-radical para dar lugar a la formación de un producto no reactivo (II).

Para determinar las velocidades de oxidación de lípidos inhibidas por antioxidantes fenólicos, se deben considerar las siguientes reacciones (Figura 7); teniendo en cuenta, que el radical aroxil, formado con la oxidación del antioxidante, también puede reaccionar en algunos casos, contribuyendo a la producción de nuevos radicales libres (III) y (V) o producir la finalización de la reacción al reaccionar dos radicales aroxil, con lo que se rompería la cadena de oxidación (IV)⁴⁴.



Figura 7: Mecanismo de acción del radical aroxil en la oxidación lipídica.

Por impedimento estérico de fenoles (hidroxitirosol, ácido cafeico) (Figura 8), las velocidades de las reacciones (II) y (IV) exceden las velocidades de las reacciones (III) y (V). Como consecuencia, los radicales peroxil y aroxil se eliminan de la reacción en cadena, descomponiéndose luego en el proceso de oxidación. Por lo tanto, los fenoles son *antioxidantes efectivos*.

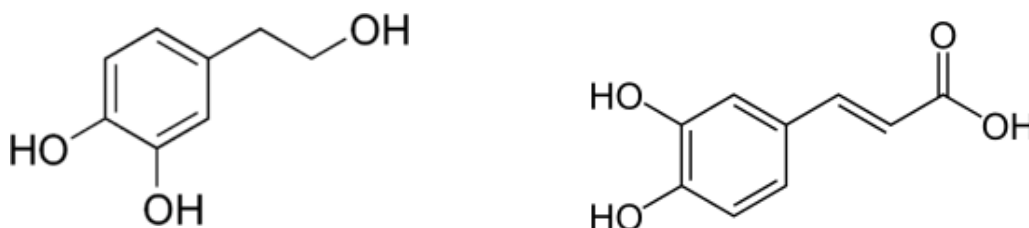


Figura 8: Estructuras químicas de hidroxitirosol y ácido cafeico.

En el caso de Tiroso, (Figura 9), la falta de impedimento estérico, favorece las reacciones (III) y (V). Bajo estas condiciones, dos cadenas transportan los radicales libres (peroxil y aroxil), lo cual explica la pobre actividad antioxidante del Tiroso⁴⁵.

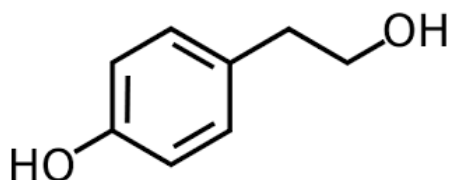


Figura 9: Estructura química de Tiroso.

El radical aroxil ArO^\bullet formado, es estabilizado por la deslocalización del electrón desapareado dentro del anillo aromático y no continúa la cadena de reacción. La acción del antioxidante está limitada, por la reacción de transferencia de cadena, la cual disminuye o anula su actividad³⁰.

Los antioxidantes fenólicos pueden ser clasificados en sintéticos o naturales. Dentro de los antioxidantes sintéticos permitidos por la FDA (Food Drugs Administration) se halla el Butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propilgalato (PG), dodecilgalato (DG), terbutil dihidroquinona (TBHQ), entre otros. Son muy efectivos en numerosos alimentos, sin embargo, algunos estudios han demostrado la aparición de efectos tóxicos sobre la salud humana por su consumo a largo plazo, por lo que se ha recurrido al uso de antioxidantes de origen natural^{46,47}.

Los antioxidantes naturales son esencialmente compuestos mono o polifenólicos encontrados como metabolitos secundarios en diferentes organelas de los tejidos animales y vegetales. Su estudio se comenzó, como una alternativa en el agregado de antioxidantes en los productos alimenticios, debido a la aparición de efectos tóxicos de los antioxidantes sintéticos sobre la salud de los consumidores. Los antioxidantes fenólicos son conocidos por reducir el riesgo de contraer enfermedades como cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes, inhibir la agregación de plaquetas plasmáticas, inducir la actividad de ciclooxygenasa (Cox), así como por propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y antialérgicas. Estos beneficios son en parte debido a la propiedad antioxidante de fenoles, por lo que es importante cuantificar, identificar y evaluar sus capacidades antioxidantes^{48,49}. Entre los antioxidantes naturales usualmente utilizados en la industria se encuentran: el ácido ascórbico, α -tocoferol, fenoles y polifenoles.

El **ácido ascórbico** o también llamado vitamina C, es un compuesto hidrosoluble que cumple funciones importantes como antioxidante en el organismo. Su presencia es necesaria para la síntesis de colágeno (componente estructural de los vasos sanguíneos, tendones, de ligamentos, y de huesos). Como tal, tiene el potencial para proteger proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (ADN y ARN) contra el daño oxidativo, causado por diversos radicales libres y especies reactivas.

La forma reducida del **ácido ascórbico** (ASC) inactiva directamente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), o actúa como sustrato de enzimas antioxidantes. Cuando el ASC se oxida, se forman sus derivados ácidos monodeshiascórbico (MDHA) y ácido deshidroascórbico (DHA) (Figura 10).

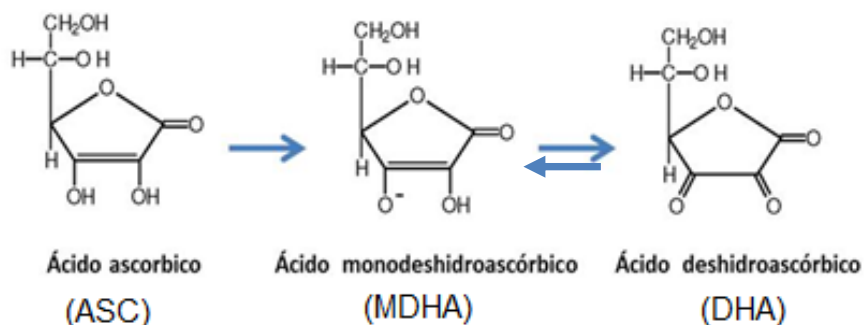


Figura 10: Estructura química del ácido ascórbico y de sus formas reducidas y oxidadas

A pH fisiológico, el ácido ascórbico se encuentra en forma de anión, pudiendo ceder dos electrones, mediante una reacción reversible, para dar el ácido deshidroascórbico a través del radical ascorbilo (Figura 10). El ácido ascórbico es un excelente neutralizador de radicales libres, como hidroxilo o peroxilo, en medios acuosos.

Por otra parte, el ascorbato puede actuar como antioxidante quelando metales, atrapando $O_2(^1\Delta_g)$ o reduciendo los hidroperóxidos en alcoholes más estables de modo de interrumpir la continuidad de las reacciones radicalarias. El ascorbato es incapaz de inhibir la oxidación lipídica cuando los radicales libres se generan en la fase lipídica. Sin embargo, puede reaccionar con los radicales tocoferoxilo, generados a partir del tocoferol, localizados cerca de la interfase lípido-agua, regenerándolos y provocando una sinergia en la actividad antioxidante de ambos compuestos³⁶.

El **trolox** (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) compuesto utilizado como análogo hidrosoluble del α -tocoferol (vitamina E), es un importante antioxidante presente en numerosos alimentos. La vitamina E es esencial para el crecimiento, sin embargo, el cuerpo humano no puede sintetizarla y la ingiere unida a los lípidos en la dieta. Su capacidad de solubilizarse en solventes de diferentes polaridades⁵⁰, permite estudiar su comportamiento en reacciones fotosensibilizadas con la especie reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$.

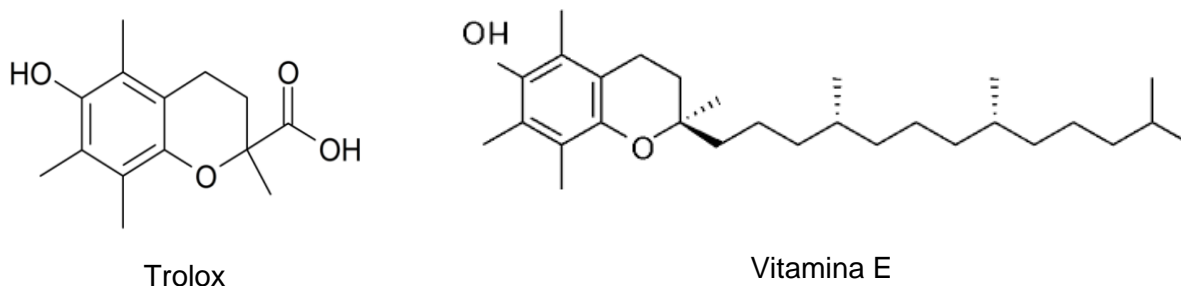


Figura 11: Estructura química de Trolox y vitamina E.

1.6.2.INTERACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Las investigaciones muestran que para cada antioxidante hay una concentración óptima donde su eficiencia es máxima. Concentraciones más bajas a la óptima, no permiten alcanzar las propiedades deseadas y concentraciones mayores producen un efecto prooxidante (no deseado) del antioxidante⁵¹. Se sabe que la cantidad de antioxidante adicionado nunca excede del 0.01% respecto a la muestra alimenticia. Si se utiliza más de un antioxidante, nunca deberá superar el 0.02%, y si se utiliza mezcla de antioxidante y compuesto sinérgico, la cifra máxima es de 0.025%, considerando las mismas limitaciones que para los aditivos simples⁵².

En una mezcla, los antioxidantes pueden interactuar entre ellos, generando un efecto aditivo, un sinergismo negativo (antagonismo) y/o un efecto sinérgico. Combinaciones de antioxidantes del mismo tipo, tienen sólo un efecto aditivo, causando la suma de los efectos ejercidos por cada uno de ellos de manera individual. De esta manera se pueden utilizar dos antioxidantes de la misma clase, cada uno en concentraciones inferiores a la que se produciría el efecto prooxidante, obteniéndose un efecto aditivo de eficacia máxima.

El efecto antagónico se define por una disminución de la eficacia del sistema de protección contra la oxidación, como consecuencia de la interacción entre los antioxidantes utilizados⁵¹. La mezcla contrarresta los efectos antioxidantes que genera cada antioxidante de manera individual.

En el efecto sinérgico, la combinación de antioxidantes puede aumentar su eficacia, ya que permite el agregado de menores dosis de dos o más antioxidantes, obteniendo mejores efectos que el producido por cada compuesto de manera individual. Distintos mecanismos están involucrados en el sinergismo entre antioxidantes, entre ellos; la combinación de dos o más compuestos antioxidantes inhibidores de radicales libres, en donde un segundo

antioxidante es regenerado a partir del primero, la oxidación de uno de ellos para proteger la del otro y la combinación de antioxidantes cuyos mecanismos son diferentes⁵³. Ciertas sustancias refuerzan la acción de los antioxidantes mediante la formación de complejos quelantes, que permiten la eliminación de trazas de ciertos metales como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Existen estudios que postulan que los antioxidantes fenólicos y el ácido ascórbico actuarían sinérgicamente, tal como se muestra en la Figura 12, cuyo mecanismo es posible, debido a la existencia de una diferencia de potencial de reducción entre ellos³⁶. El que tiene mayor potencial de reducción, en este caso tocoferol ($E^\circ = 500 \text{ mV}$), actúa como antioxidante primario, mientras que el ácido ascórbico ($E^\circ = 330 \text{ mV}$) constituye el sinergista. El tocoferol (TH) actúa como antioxidante donando un átomo de hidrógeno al radical alquilico (R^\bullet) o al radical peroxil (ROO^\bullet), convirtiéndose en un radical tocoferol (T^\bullet), el cual no presenta actividad antioxidante. El ácido ascórbico (ASC) dona un átomo de hidrógeno al radical tocoferol (T^\bullet), para regenerar el tocoferol (TH), dando como producto el radical ascorbilo (AS^\bullet), quien luego mediante una reacción reversible, se convierte en el ácido deshidroascórbico (DHAs).

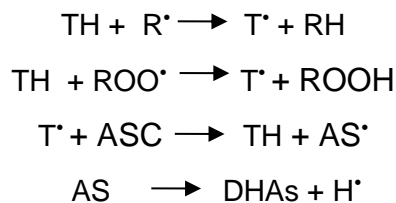


Figura 12: Reacción del sistema antioxidante tocoferol y ácido ascórbico.

La regeneración del antioxidante es rápida cuando el sinergista tiene una energía de disociación de enlace mayor comparada a la del antioxidante primario. Además, el antioxidante primario puede ser regenerado cuando la constante de velocidad de regeneración es del orden de 10^3 M/s , y solo mediante transferencia de electrones desde el sinergista hacia el antioxidante primario⁵³.

Es importante destacar que la efectividad de estos antioxidantes es dependiente de sus propiedades químicas, como las energías de enlace, la posibilidad de formación de distintas formas resonantes del radical formado y la susceptibilidad a la oxidación, que viene dada por el valor de su potencial de reducción^{36,54}.

1.7. IMPORTANCIA DE GRUPOS FUNCIONALES EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos presentan una constante ácida (K_a) que varía en un intervalo comprendido entre 10^{-15} - 10^{-18} . Son ácidos mucho más fuertes que los alcoholes alifáticos principalmente porque el ion fenóxido resultante, estabiliza la carga por deslocalización dentro del anillo aromático, siendo más estable que un alcóxido, donde la carga está localizada sólo en el átomo de oxígeno⁵⁵.

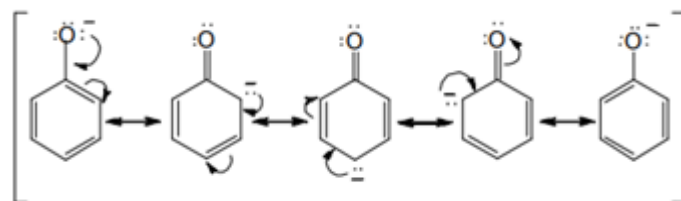


Figura 13: Deslocalización de la carga en el ión fenóxido.

Como ya se ha mencionado en secciones anteriores, los fenoles actúan como antioxidantes, atrapando radicales libres de peróxidos (ROO^{\bullet}), los cuales reaccionan con los dobles enlaces presentes en los alimentos, causando su degradación.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende principalmente del número de grupos (-OH) presentes en la molécula, y de su disponibilidad en el momento de donar los átomos de hidrógeno. Esta propiedad puede ser afectada por el impedimento estérico ejercido por grupos voluminosos presentes en su estructura química. Tal es el caso de butilhidroxitolueno, donde la presencia de sus grupos terbutilos reduce la velocidad de la reacción de propagación en la que está involucrado el radical del antioxidante^{49,56}.

En general los monofenoles son menos efectivos que los polifenoles. La introducción de más grupos oxhidrilos (-OH), mejoran la actividad antioxidante en sistemas lipídicos. La sustitución en posición *orto* con grupos dadores de electrones (grupo alquilo, metoxi), aumentan la estabilidad del radical arilo resultante, mediante la deslocalización de esa carga negativa en el anillo, y por ende el potencial antioxidante. Grupos metilo en posición *para* al grupo funcional (-OH) son fundamentales para la disponibilidad del átomo de hidrogeno de ser donado⁴⁹.

En el presente trabajo, se estudiaron los compuestos 4-hidroxifenilalcohol, vanilina y ácido cinámico (Sección 3.1.1, Figura 9).

El 4-hidroxifenil alcohol conocido como Tirosol, se trata de un derivado fenólico que se encuentra en el aceite de oliva.

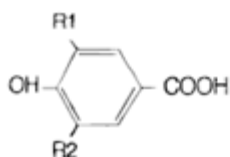
El 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, comúnmente conocido como vanilina, es un compuesto extraído de las vainas de la planta *vanilla planifolia* y es ampliamente utilizado por la industria, por su aroma natural, como agente saborizante en alimentos y bebidas, en concentraciones que varían en un intervalo de 0.3 a 33 mM. La ingesta en valores superiores puede ejercer efectos negativos sobre la salud del consumidor.

En los últimos años se han realizado múltiples ensayos para evaluar la capacidad antioxidante de la vanilina. Los resultados obtenidos no fueron consistentes, ya que algunos estudios demostraron una débil capacidad de atrapar ROS y otros radicales, por ejemplo, el anión superóxido, así como una baja actividad frente a la peroxidación lipídica. A pesar de ello, se ha demostrado que la vanilina es capaz de inhibir la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos inducida por el proceso de fotosensibilización³².

Si bien frente algunos radicales (ej. el ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+})), la vanilina ha demostrado una actividad antioxidante más fuerte respecto al ácido ascórbico y trolox, no presentó el mismo comportamiento frente a otros radicales (radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)). Esto puede ser explicado mediante la estructura molecular, la cual solo presenta un grupo oxhidrilo (-OH) oxidable en la posición del carbono 4 del anillo aromático, que permite que la reacción con los radicales mencionados se lleve a cabo a través de un mecanismo de autodimerización³².

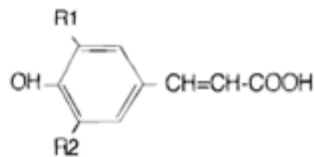
El ácido cinámico es un compuesto modelo de derivados hidroxicinámicos, que se utilizan como antioxidantes y se lo encuentra naturalmente en el aceite de canela. Las investigaciones demostraron que la actividad antioxidante de estos compuestos está completamente relacionada con su estructura química; la sustitución sobre el anillo aromático y la cantidad de uniones insaturadas en su cadena lateral. Los derivados del ácido cinámico resultaron ser antioxidantes más eficientes respecto de los del ácido benzoico. Esto se atribuye a que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, depende fuertemente de la estabilidad del radical que se forma, luego de interactuar con las especies oxidantes⁵⁷.

Derivados del ácido benzoico



| | R1 |
|-------------------|-------------------|
| p-Hidroxibenzoico | H |
| Protocatechuic | H |
| Vanílico | CH ₃ O |
| Siríngico | CH ₃ O |

Derivados del ácido cinámico



| | R2 |
|-------------|-------------------|
| | H |
| | OH |
| | H |
| | CH ₃ O |
| p- Cumárico | |
| Cafeico | |
| Ferulico | |
| Sinápico | |

Figura 14: Estructura química de derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.

El ácido cinámico se trata de un ácido α - β insaturado, donde la presencia del grupo etilénico adyacente al grupo carboxílico [$-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$] mejora la habilidad donante de átomos de hidrógeno y subsecuentemente una estabilidad mayor del radical, mediante resonancia en el anillo. Este hecho se contrarresta con la propiedad del grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) de atraer el electrón desapareado en los ácidos fenólicos, ejerciendo una influencia negativa sobre esta habilidad, disminuyendo la capacidad antioxidante^{48,49}.

1.7.1. IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS ALIMENTOS.

La importancia de la presencia de compuestos fenólicos en los productos alimenticios, radica en la relación que presentan con la calidad sensorial de los alimentos, tanto en los de origen animal como en los procesados, y su contribución al mantenimiento de la salud humana por su capacidad antioxidante, actividad que se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Algunos compuestos fenólicos a mencionar; como los flavonoides, son los responsables del color natural de los alimentos, las antocianinas de los colores rosa, rojo, azul y violeta de los vegetales, jugos de frutas y vinos. Las flavononas son las responsables del sabor amargo de los cítricos. Otros sustratos fenólicos entre los que se destaca el ácido clorogénico han sido asociados al sabor amargo de la cerveza, el vino y la sidra, mientras

que los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados son los responsables del sabor amargo de los arándanos. El pardeamiento de las frutas y vegetales también se relaciona al contenido de los compuestos fenólicos. La formación de pigmentos amarillos y marrones durante la manipulación y procesado de los alimentos vegetales, está controlada por los niveles de polifenoles, la presencia de oxígeno y la actividad de enzimas⁵⁸.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

➤ Establecer relaciones estructura-reactividad en lo referido a la actividad antioxidante de derivados fenólicos, aportando conocimiento para el diseño de futuras moléculas liposolubles con este tipo de propiedades optimizadas, a los fines de proponerlas como potenciales aditivos en alimentos de consumo humano.

2.2. Objetivos específicos

a) Estudiar la resistencia de vanilina, 4-hidroxifenilalcohol y ácido cinámico a la oxidación fotopromovida por la especie reactiva de oxígeno, $O_2(^1\Delta_g)$.

b) Comparar las propiedades antioxidantes de los compuestos en estudio con aditivos de uso difundido en la industria de los alimentos.

c) Investigar el tipo de efecto antioxidante en mezclas de los compuestos en estudio con aditivos conservantes de uso común en alimentos.

d) Evaluar la potencial capacidad prooxidante de los compuestos bajo irradiación con luz directa a 266 nm.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos:

Los sustratos en estudio vanilina (VAN), 4-hidroxifenilalcohol (4-OH) y ácido cinámico (CIN) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados sin purificación previa, ya que los mismos cuentan con una pureza $\geq 98\%$.

El 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, conocido popularmente como vanilina, se trata de un compuesto fenólico cuyos grupos funcionales presentes son aldehído, éter y oxhidrilo. Es un polvo de color blanco o ligeramente amarillo, con sabor y olor muy agradable a vainilla, de fórmula molecular $C_8H_8O_3$ y peso molecular 152.15 g / mol. Posee un punto de fusión de 81-83°C, punto de ebullición 285°C, densidad 1.056 g / cm³.

Es ligeramente soluble en agua 1 g / 100 ml (25°C), muy soluble en etanol, dietiléter, acetona, benceno y cloroformo⁵⁹.

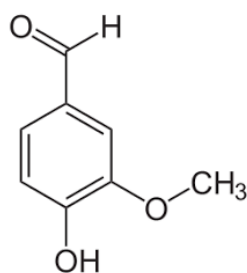
Es lentamente oxidable cuando es expuesto al aire y es afectado por la luz.

El 4-hidroxifenilalcohol conocido comercialmente como Tirosol, se trata de un antioxidante fenólico natural presente en el vino y en el aceite de oliva. Su fórmula molecular es $C_8H_{10}O_2$ con un peso molecular de 138.16 g / mol. Se trata de un sólido de color blanco con un punto de fusión de 90°C⁵⁹.

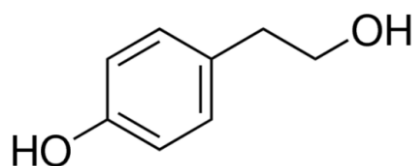
El ácido cinámico es un compuesto de fórmula molecular $C_9H_8O_2$ y peso molecular 148.16 g / mol. Comercialmente se lo encuentra en forma de un polvo blanco cristalino con olor parecido a la miel. Posee un punto de fusión de 132-133°C, punto de ebullición 300°C, densidad 1.2475 g / cm³.

Es ligeramente soluble en agua 0.155 mg / ml (25°C), soluble en benceno, éter etílico, acetona, ácido acético e insoluble en hexano⁵⁹.

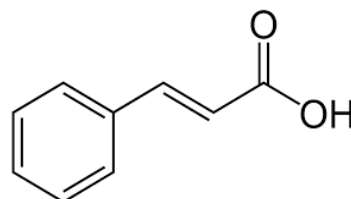
En la Figura 15, se presentan las estructuras químicas de los compuestos, objetos de estudio.



Vanilina (**VAN**)



4-hidroxifenilalcohol (**4-OH**)



Ácido cinámico (**CIN**)

Figura 15: Estructura química de vanilina (VAN), 4-hidroxifenilalcohol (4-OH) y ácido cinámico (CIN).

El sensibilizador utilizado Perinaftenona (PN) fue adquirido de Sigma-Aldrich. Se trata de un compuesto orgánico de color amarillo, soluble en agua destilada y en alcoholes como el metanol. Su fórmula molecular es C₁₃H₈O, con un peso molecular 180.206 g /mol. Presenta dos máximos de absorción a 295 y 365 nm en solventes polares.

No es fluorescente y el entrecruzamiento de sistemas S₁→ T₂ (nπ*) ocurre con un rendimiento cuántico Φ_{CIS} = 1, en un tiempo menor a 10⁻⁹ s. El rendimiento cuántico de generación de O₂ (¹Δ_g) mediante fotosensibilización, es independiente de la concentración de PN por encima de 2,7 x 10⁻³ M y de la longitud de onda de excitación en un intervalo de 337- 436 nm. La variación del valor de Φ_Δ con el solvente es muy leve, siendo este 1,00 ± 0,04, valor obtenido como promedio en un amplio número de solventes y mezclas que cubren casi la totalidad de la escala de polaridad y con propiedades químicas muy variadas.

PN es fotoquímicamente estable. Es afectada por el calor, y especialmente, por la exposición a la luz ¹⁵.

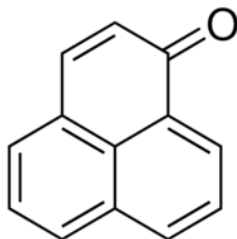


Figura 16: Estructura química de Perinaftenona (PN)

El compuesto de referencia, alcohol furfúrico (FFA), azida de sodio (NaN_3), y trolox (TRO) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, mientras que el ácido ascórbico (ASC) fue obtenido de Anhedra.

3.1.2. Solventes:

Con el fin de fijar las condiciones de pH a las que se realizaron las experiencias, se prepararon las siguientes soluciones reguladoras:

pH 8: 50 ml de borax 0.025 M + 20.5 ml de HCl 0.1 M

pH 9: 50 ml de borax 0.025 M + 4.6 ml de HCl 0.1 M

pH 10: 50 ml de HCO_3Na 0.05 M + 10.7 ml de NaOH 0.1 M

pH 11: 50ml de HCO_3Na 0.05 M + 22.7 ml de NaOH 0.1 M

Las sales mencionadas y el ácido clorhídrico fueron obtenidas de Ciccarelli mientras que el hidróxido de sodio de Sigma-Aldrich.

3.2. INSTRUMENTACIÓN

3.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Visible

Los espectros de absorción UV-Vis se tomaron en un espectrofotómetro, de doble haz, Shimadzu con arreglo de diodos, cuya radiación se dispersa en una red cóncava, que enfoca el haz sobre un espejo en sectores rotatorio. La fuente de excitación consiste en una lámpara de Deuterio y Wolframio. Su intervalo de detección está comprendido entre 190 y 820 nm. La ventaja de dicho equipo está en su exactitud fotométrica del 0.5 % de T y reproducibilidad del 0.2 % de absorbancia. La radiación parasita es menor del 0.1% a 240 y 340 nm (Figura 17).

Se utilizaron celdas de cuarzo de paso óptico de 1 cm.

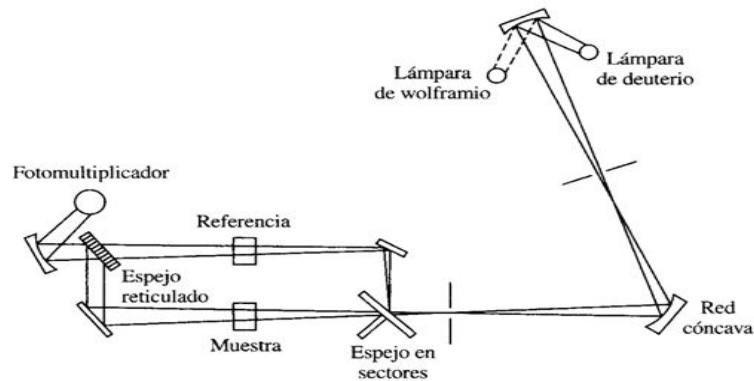


Figura 17: Diagrama de un espectrofotómetro UV-Visible de doble haz.

3.2.2. Fotólisis estacionaria

La fotólisis estacionaria consiste en irradiar continuamente una muestra con luz de una lámpara de intensidad constante. El tiempo de irradiación es variable y puede durar desde unos pocos segundos a horas.

En la Figura 18, se muestra un esquema del dispositivo experimental utilizado en los experimentos. La irradiación continua de luz se realizó empleando una lámpara de cuarzo-halógeno de 150 W de potencia, la cual es focalizada hacia una celda de absorción o fluorescencia (en el caso de realizar experimentos de consumo de sustrato) o hacia una celda de reacción de 50 ml, (en caso de llevar a cabo medidas de consumo de oxígeno) conteniendo un electrodo específico para oxígeno (Orion 97-08) que se encuentra acoplado a un pHmetro Orion 720.

El electrodo de oxígeno utilizado posee un sistema de detección que consiste en dos electrodos de plata polarizados y un electrolito, separados de la solución de medida por una membrana permeable a gases. El oxígeno disuelto en la solución difunde hacia la membrana donde es reducido a iones hidroxilos. La corriente producida en esta reducción causa una diferencia de potencial que puede ser traducida, en el pH metro acoplado, en “partes por millón” (ppm) de oxígeno.

La calibración del electrodo de oxígeno se realiza en agua saturada de aire a presión atmosférica antes de cada medida. Dado el material de la membrana, sólo se pueden utilizar soluciones con porcentajes mayores a 95% de agua. El pH en el que se puede trabajar

abarca un intervalo entre pH 3 y 12, y los límites de concentraciones de oxígeno llegan hasta las 14 ppm.

Para asegurarse que sólo el sensibilizador (PN) absorba la radiación, se utilizó un filtro de corte de 420 nm. Las muestras fueron continuamente agitadas por medio de un dispositivo magnético para mantener su homogeneidad, evitando la acumulación de foto productos en la cara más cercana a la fuente de irradiación. El dispositivo se mantuvo con idéntica geometría en todos los experimentos con fines comparativos.

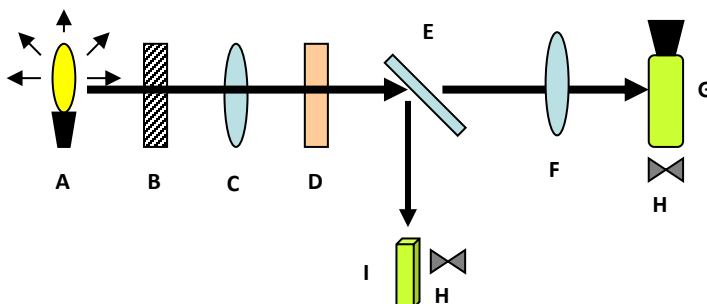


Figura 18: Diagrama del equipo de fotólisis estacionaria. A: Lámpara de cuarzo-halógeno. B: Filtro térmico. C y F: Lentes. D: Filtro de corte. E: Espejo. G: Celda para electrodo de oxígeno. I: Celda para consumo de sustrato. H: Agitador magnético.

3.2.3. Medidas resueltas en el tiempo

Las experiencias de generación y determinación del tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ se realizaron empleando la técnica de detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo (TRPD), a 1270 nm.

Como fuente de excitación se utilizó un láser de Nd:YAG (Spectron, SL 400) con emisión a 1066 nm, 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 tercera armónica (355 nm) se empleó para excitar el sensibilizador utilizado (PN). La radiación emitida fue detectada en ángulo recto, usando un detector de germanio amplificado (Judson J16/8sp), el cual está provisto de un sistema interno de filtros apropiados. La señal eléctrica proveniente del detector se digitalizó con un osciloscopio Hewlett Packard 54504A y se transfirió, a través de una interfase IEEE, a una computadora personal para llevar a cabo el procesamiento de las señales. En general se aplicaron 8-10

disparos para promediar y conseguir una buena relación señal/ruido, a partir de la cual se obtuvo el tiempo de decaimiento por un ajuste mono exponencial.

La Figura 19 muestra un diagrama de bloques del equipo utilizado.

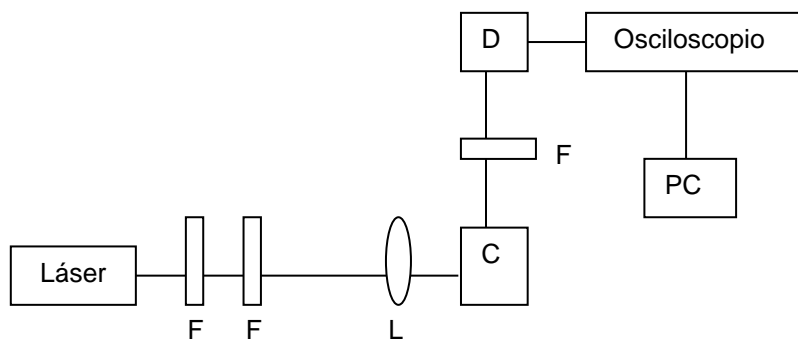


Figura 19: Diagrama de bloques del equipo para la detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo.

F: filtros; L: lente; C: porta celda para la muestra; D: detector de Germanio; PC: computadora personal.

En la Figura 20 se muestra una señal típica de decaimiento de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$. 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 , tal que:

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

donde I es directamente proporcional a la concentración de $O_2(^1\Delta_g)$ a cualquier tiempo t y τ es el tiempo de vida de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$.

Generalmente, los puntos iniciales de la señal de decaimiento están perturbados por señales espúreas provenientes de la fuente de excitación o por fluorescencia residual del sensibilizador. En consecuencia, el análisis de las trazas de decaimiento se realizó a partir de 8-10 μs , utilizando un programa de ajuste por cuadrados mínimos no lineales (MicroCal Origin 6.0 de MicroCal Software, Inc.).

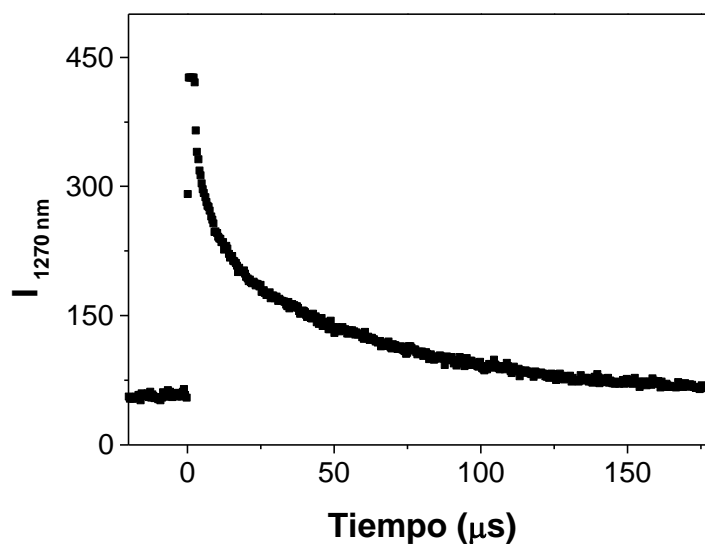


Figura 20: Señal típica de decaimiento de fosforescencia de $O_2(1\Delta_g)$ a 1270 nm.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Ensayos de solubilidad

Con el fin de seleccionar el solvente a utilizar en las experiencias, en primera instancia se procedió a realizar ensayos de solubilidad de los compuestos a estudiar. Los tres sustratos, vanilina, 4-hidroxifenilalcohol y ácido cinámico resultaron ser muy solubles en agua, por lo que fue seleccionada como solvente para todos los experimentos realizados.

3.3.2. Estimación de pKa de los sustratos

Se obtuvieron los espectros de absorción UV-Visible de VAN, 4-OH y CIN en diferentes soluciones reguladoras (especificadas en la sección 3.1.2). Dado que los sustratos en estudio presentan grupos ionizables en su estructura, se estimó el valor de pKa para cada uno de ellos, mediante la visualización del cambio en el espectro de absorción UV-Visible, en el intervalo de pH 6-11.

Dicha experiencia se realizó con el fin de seleccionar los valores de pH a los cuales se llevaron a cabo todos los experimentos.

3.3.3. Determinación de coeficientes de absorptividad molar

Los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de los compuestos estudiados fueron determinados en agua y solución reguladora de pH 11. Para ello se hizo uso de la ley de Lambert y Beer, cuya expresión matemática es:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C \quad (2)$$

donde:

A_{λ} : es el valor de absorbancia a una dada longitud de onda.

ϵ_{λ} : el coeficiente de absorptividad molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda dada.

λ : longitud de onda de trabajo elegida.

b: paso óptico de la celda utilizada (cm).

C: concentración molar del sustrato.

Dicha ecuación muestra la relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de una cierta sustancia cuando el término b es constante.

Para cada sustrato se prepararon soluciones de diferentes concentraciones en un intervalo de absorbancia 0.4-0.9. Estos valores de absorbancia se representaron en un gráfico en función de diferentes concentraciones de los sustratos. Considerando un valor de $b = 1.0 \text{ cm}$, a partir del valor de la pendiente de las rectas obtenidas, fue posible obtener el valor de ϵ , a una dada longitud de onda, para cada sustrato.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu con arreglo de diodos, descrito en la sección 3.2.1.

Todas las medidas experimentales se realizaron a temperatura ambiente.

Los espectros fueron registrados vs. el solvente correspondiente.

3.3.4. Preparación de soluciones

Para los ensayos de fotooxidación de los sustratos, el sensibilizador PN fue preparado en agua y en una solución reguladora de pH 11 (50ml de NaHCO_3 0.05 M + 22.7 ml de NaOH 0.1 M), y su concentración ajustada a un valor de absorbancia cercano a 0.5, a la longitud de onda de máxima absorción en el visible en agua ($\lambda = 365 \text{ nm}$), para los experimentos de fotólisis estacionaria.

Para las experiencias resueltas en el tiempo, la absorbancia de PN se ajustó a un valor de 0.2-0.3 a la longitud de excitación del láser (355 nm).

Los sustratos se disolvieron individualmente en estas soluciones.

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

3.3.5. Experimentos de consumo de sustrato, sensibilizados por PN

El consumo de los distintos sustratos, sensibilizado por PN, en función del tiempo de irradiación, fue monitoreado por espectroscopía de absorción UV-Visible. Los espectros fueron determinados vs. la solución conteniendo el sensibilizador PN, con el fin de obtener sólo la absorción del sustrato, en el espectrofotómetro de doble haz descrito en la sección 3.2.1.

Se utilizaron celdas de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico.

Los experimentos se realizaron en agua y en solución reguladora de pH 11, con el fin de comparar los resultados bajo diferentes condiciones de ionización de los sustratos.

3.3.6. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación reactiva (k_r) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos.

La determinación de los valores de las constantes de velocidad de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$, (k_r), con los sustratos se llevó a cabo a través de una variante del método introducido por Foote y Ching⁶⁰, siguiendo el consumo de oxígeno en lugar del consumo de sustrato Q. Este método supone que dicha reacción es la única fuente de consumo de oxígeno con una estequiometría 1:1 (moles de sustrato fotooxidable Q consumidos / moles de $O_2(^1\Delta_g)$ consumidos). La relación de pendientes de los gráficos de primer orden para el consumo de oxígeno vs. tiempo de irradiación por los sustratos en estudio y por un compuesto de referencia cuyo valor de k_r sea conocido (k_{rRef}), ambos en idéntica concentración, es igual a la relación k_r/k_{rRef} . La referencia utilizada fue alcohol furfurílico, cuyo valor de k_{rRef} es $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en agua (valor determinado en nuestro laboratorio).

$$\frac{\text{Pendiente de Q}}{\text{Pendiente de Ref.}} = \frac{k_r}{k_{rRef}} \quad (3)$$

Para estos ensayos, se utilizó el equipo de fotólisis estacionaria descrito en la sección 3.2.2. La solución de PN fue ajustada a una absorbancia de 0.5 a $\lambda=365$ nm. Se utilizó un filtro de corte de 420 nm, de modo que la luz sólo sea absorbida por el sensibilizador.

La concentración de los sustratos en estudio al igual que la de alcohol furfúrico (FFA) fue de 5×10^{-4} M. Se trabajó en idénticas condiciones experimentales (pH, concentración, solvente, temperatura, arreglo experimental) para los sustratos y el compuesto de referencia.

3.3.7. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos.

La determinación de los valores de k_t ($= k_r + k_q$, procesos (3) y (4), Esquema 3, sección 1.4) se realizó mediante la técnica de detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo (técnica TRPD). Se evaluaron los tiempos de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia (τ_0) y en presencia (τ) de los sustratos fotooxidables (Q). Luego, mediante un simple tratamiento de Stern-Volmer, representando el cociente τ_0/τ en función de la concentración molar de sustrato Q (ecuación 4) es posible, a partir de la pendiente y el valor de τ_0 , determinar k_t .

$$\tau_0/\tau = 1 + k_t \tau_0 [Q] \quad (4)$$

donde: τ_0 : tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia de sustrato Q.

τ : tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de una dada concentración del sustrato Q.

k_t : constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ por el sustrato Q.

[Q]: concentración molar del sustrato fotooxidable.

Dividiendo la ecuación (4) por τ_0 , se obtiene una ecuación totalmente equivalente pero que resulta independiente del valor de τ_0 al momento de evaluar k_t ¹³.

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k_t [Q] \quad (5)$$

La representación gráfica de $1/\tau$ vs. [Q] permite la determinación directa de k_t a partir de la pendiente, sin la necesidad de medir τ_0 . Los tiempos de vida se obtuvieron a partir del

ajuste mono exponencial de las trazas de decaimiento de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm, utilizando el programa MicroCal Origin 5.0, según se los describió en la sección 3.2.3.

El tiempo de respuesta del detector utilizado es de 4 μ s. Dado que en H_2O , el $O_2(^1\Delta_g)$ tiene $\tau = 4 \mu$ s, la determinación de k_t fue realizada en D_2O , con el fin incrementar el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ ($\tau = 60 \mu$ s)⁶¹.

3.3.8. Determinación de la capacidad antioxidante de los sustratos frente a aditivos comerciales

Se prepararon soluciones en agua y en solución reguladora de pH 11, disolviendo PN ajustándolo a una absorbancia de 0.5 a $\lambda=365$ nm. En ella se colocaron individualmente los sustratos y los antioxidantes más usados en la industria alimenticia en las mismas concentraciones 6×10^{-4} M. Se comparó la velocidad de consumo de oxígeno de los sustratos frente a la de aditivos comerciales, (trolox (TRO) y ácido ascórbico (ASC)), bajo idénticas condiciones experimentales.

3.3.9. Determinación del efecto antioxidante de mezclas de los sustratos con antioxidantes comerciales

Se investigó el tipo de efecto antioxidante (aditivo, sinérgico o antagónico) de mezclas de los sustratos en estudio con los antioxidantes de uso comercial ácido ascórbico y trolox. Para ello, se comparó la velocidad de consumo de oxígeno, sensibilizada por PN, por los sustratos con la velocidad de consumo de oxígeno por los sustratos junto a los antioxidantes comerciales, bajo idénticas condiciones experimentales.

Los experimentos se realizaron en agua y en solución reguladora de pH 11. En el caso del ácido ascórbico se trabajó solo en agua, ya que en medio básico no es estable^{62, 63}.

3.3.10. Evaluación de la participación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de los sustratos sensibilizada por PN

Para confirmar la participación de $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de los sustratos en estudio, sensibilizada por PN, se utilizó azida sódica (NaN_3), un conocido desactivador físico de dicha especie excitada de oxígeno⁶⁴. Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno, sensibilizados por PN, de cada uno de los sustratos en ausencia y presencia de NaN_3 .

Las concentraciones de los compuestos en estudio fueron 6×10^{-4} M y para NaN_3 1×10^{-3} M, tanto en agua como a pH 11.

Las velocidades de consumo de oxígeno por los sustratos en ausencia y presencia de NaN_3 fueron obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación.

3.3.11. Determinación de la capacidad prooxidante de los sustratos.

Para evaluar la potencial capacidad de los sustratos para generar $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, (capacidad prooxidante), bajo irradiación directa de luz, se realizó la determinación del rendimiento cuántico de generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ), mediante un método actinométrico. Para tal fin se utilizó como referencia (actinómetro) un compuesto cuyo valor de Φ_Δ fuese conocido en las condiciones de trabajo. Los experimentos se realizaron con el equipo descrito en la sección 3.2.3, usando como longitud de onda de excitación 266 nm (la cuarta armónica del láser de Nd:Yag).

Experimentalmente se detecta la intensidad de la emisión de fosforescencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm como una señal eléctrica. Esta señal es proporcional a la concentración de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en la solución.

La relación de los valores de intensidad de fosforescencia de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a tiempo cero (I_{0E}) para el sustrato y la referencia, permite obtener el valor de Φ_Δ para el sustrato, siempre que sean determinados en igualdad de condiciones (solvente, geometría del láser, longitud de onda, energía del láser e idéntica absorbancia del sustrato y la referencia a la longitud de excitación). Experimentalmente es conveniente medir la I_{0E} en función de la energía del láser y determinar el Φ_Δ para un dado sustrato Q según:

$$\Phi_{\Delta Q} = \Phi_{\Delta\text{Ref}} \frac{I_{0E-Q}}{I_{0E-\text{Ref}}} \quad (6)$$

Donde $\Phi_{\Delta\text{Ref}}$ es el rendimiento cuántico de generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por la referencia, I_{0E-Q} es la pendiente de un gráfico de I_{0E} en función de la energía del láser para el sustrato Q y $I_{0E-\text{Ref}}$ es la pendiente de un gráfico de I_{0E} en función de la energía del láser para la referencia.

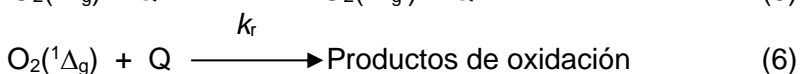
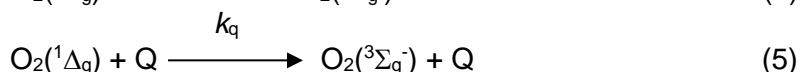
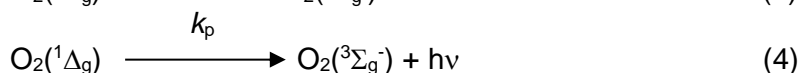
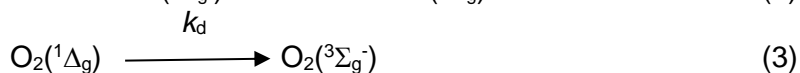
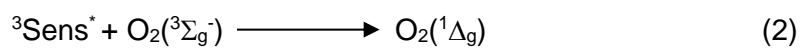
El rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos se determinó en D_2O , utilizando PN como referencia (actinómetro).

Se determinaron las intensidades iniciales de emisión de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ variando la energía del haz incidente. Este procedimiento se realizó tanto para los sustratos como para la referencia excitando las muestras a 266 nm y registrando la emisión de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm. Las soluciones se prepararon con igual absorbancia a la longitud de onda de excitación del láser (266 nm) y la energía del mismo se varió utilizando soluciones de dicromato de potasio de distinta transmitancia, que cumplieron la función de filtrar el haz de excitación.

Los valores de I_0 se obtuvieron por extrapolación del decaimiento de la señal eléctrica a tiempo cero, haciendo uso del programa Micro cal Origin. El valor utilizado de Φ_Δ para PN en agua deuterada fue de 0,99. Se utilizó D_2O en lugar de H_2O debido a que el tiempo de respuesta del detector de germanio utilizado (ver sección 3.2.3) es del orden del tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ en H_2O ($\tau = 4 \mu s$)⁶¹.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis y la discusión de los resultados del presente trabajo, se realizaron teniendo en cuenta el Esquema 5, en el cual se describen los posibles procesos que pueden ocurrir bajo la irradiación de un sistema sensibilizador (Sens) / sustrato fotooxidable (Q) / oxígeno (aire).



Esquema 5: Mecanismo de fotosensibilización tipo II. S = sensibilizador. Q = sustrato fotooxidable.

El sensibilizador (Sens) es una sustancia coloreada, que puede estar presente en un producto graso como impureza (colorantes naturales residuales y/o pigmentos), capaz de absorber la luz ambiente o solar ($h\nu$) y generar estados excitados ${}^1\text{Sens}^*$ y/o ${}^3\text{Sens}^*$ (proceso 1). El estado ${}^3\text{Sens}^*$ puede ser desactivado por transferencia de energía al $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$ para generar $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ (proceso 2). El $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ puede decaer por simple interacción no radiativa con las moléculas del solvente o radiativa (proceso 3 y 4, respectivamente), interactuar de manera física con el sustrato Q (proceso 5) y/o interactuar de manera reactiva con Q (proceso 6).

4.1. Caracterización espectroscópica de los sustratos

Con el objeto de caracterizar las propiedades espectroscópicas de los compuestos en estudio, se realizaron los espectros de absorción de VAN, 4-OH y CIN, en agua. Los mismos se muestran en la Figura 21. Como puede observarse VAN presenta un máximo de absorción a 278 nm y otro en 308 nm, el 4-OH presenta un máximo de absorción a 275 nm y CIN a 272 nm, en agua.

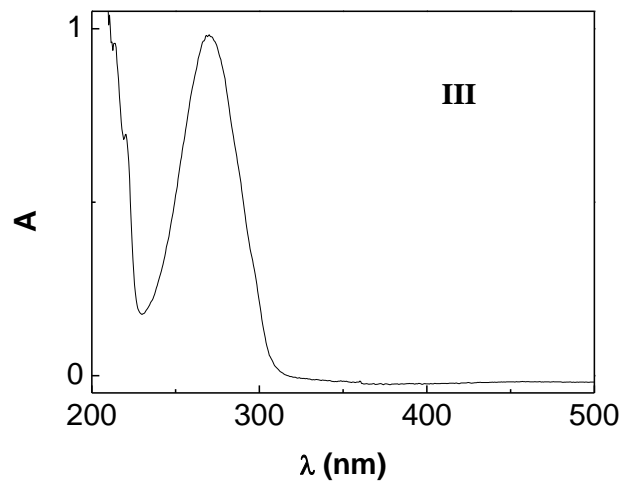
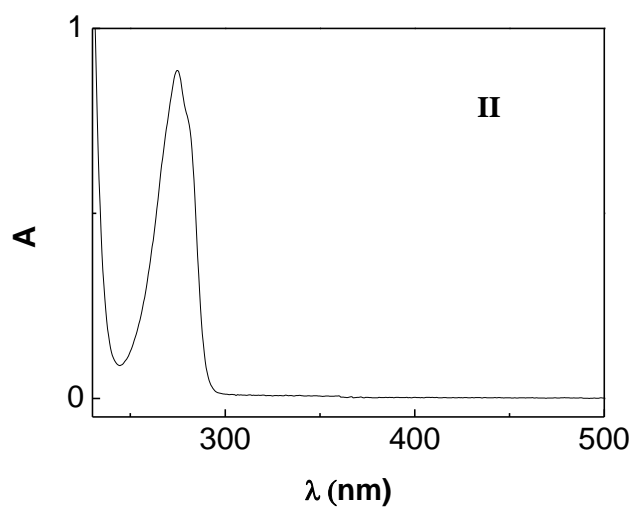
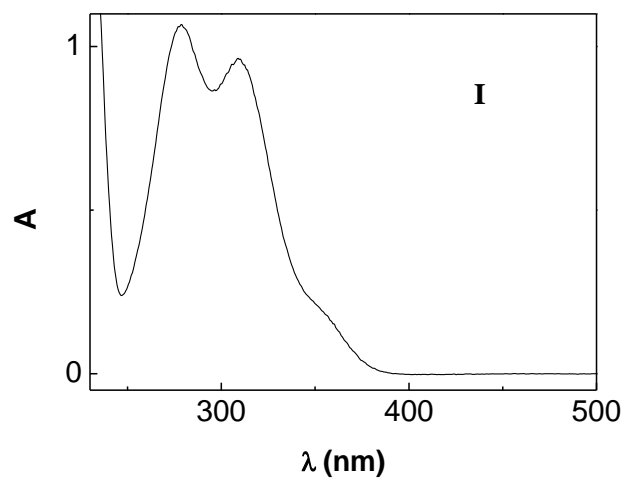
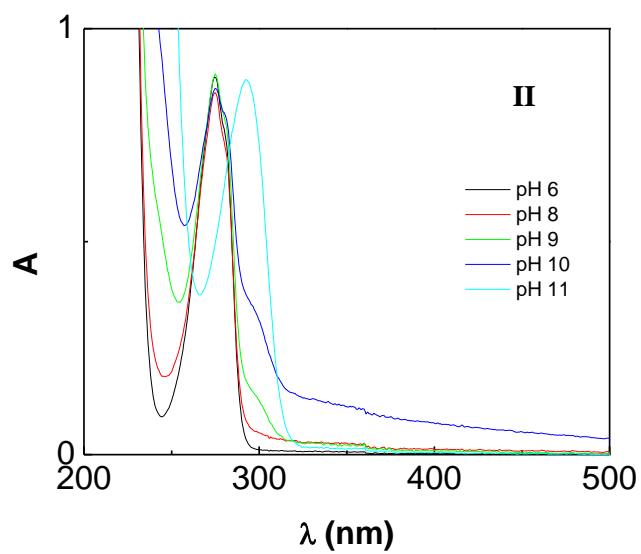
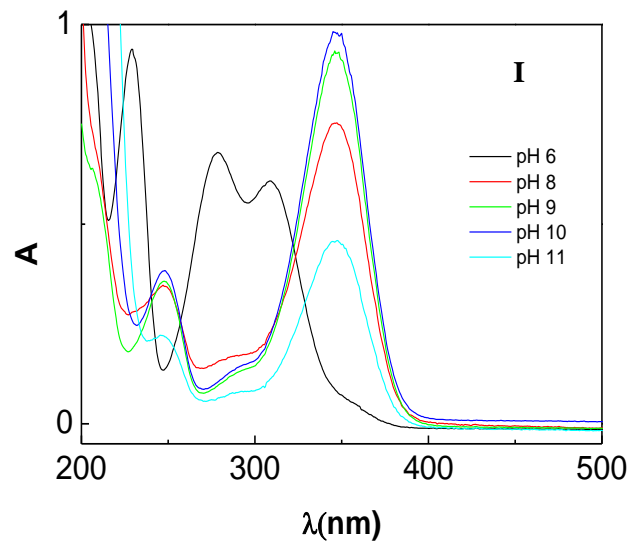


Figura 21: Espectros de absorción UV-Visible de **I:** VAN, **II:** 4-OH, **III** CIN.
Solvente: agua

Por otra parte, se tomaron los espectros de absorción de los sustratos individuales en soluciones reguladoras en el intervalo de pH 6-11.

En la Figura 22 se muestran los espectros de absorción de VAN, 4-OH y CIN.



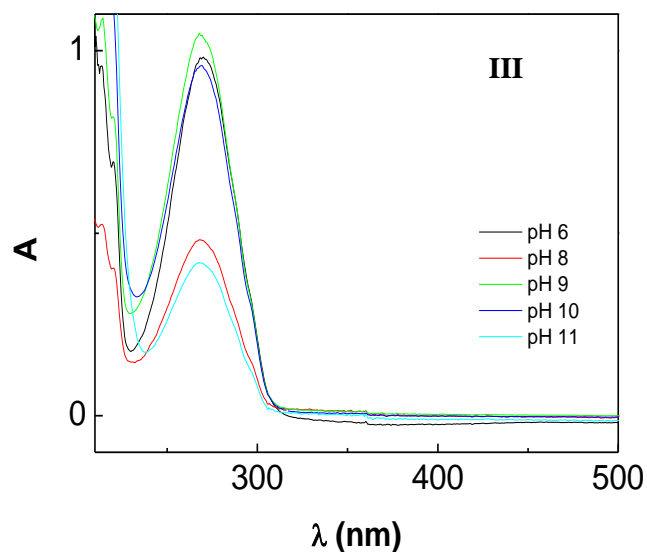


Figura 22: Espectros de absorción UV-Visible en función del pH:
I: VAN, **II:** 4-OH, **III:** CIN. Solvente: soluciones reguladoras de pH 6-11.

A partir de los espectros de absorción UV-Visible mostrados en la Figura 22, se puede apreciar que a pH 6, el 4-OH y VAN se encuentran con su grupo fenólico protonado; en tanto que a pH 11 ambos sustratos poseen dicho grupo en forma ionizada, es decir como fenolato. Se sabe que, en los fenoles, al desprotonarse, se producen cambios en el espectro de absorción y la banda se corre al rojo⁶⁵. Para el CIN, dentro del error experimental, no se observa corrimiento en el espectro de absorción en el intervalo de pH 6-11, por lo que se puede inferir que, en este intervalo de pH, CIN ya se encuentra desprotonado.

En las figuras 23, 24 y 25, se muestran las estructuras químicas de VAN, 4-OH y CIN con sus grupos fenólicos protonado y desprotonado como resultado de la variación del pH del medio.

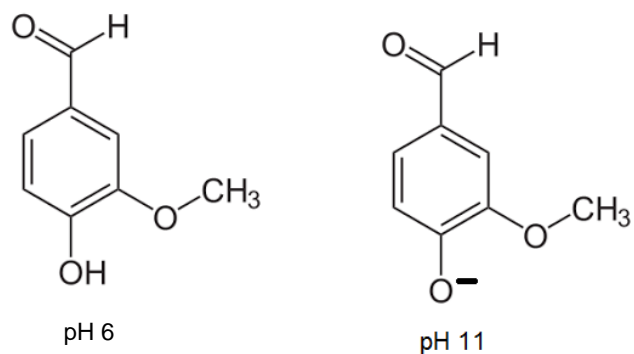


Figura 23: VAN con su grupo fenólico protonado (izquierda) y desprotonado (derecha)

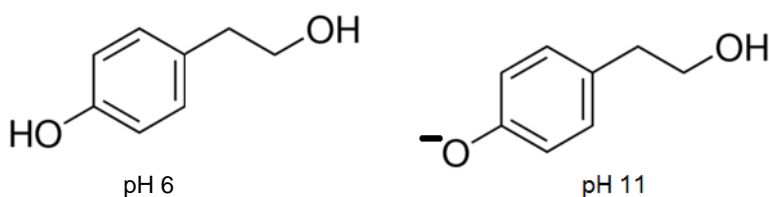


Figura 24: 4-OH con su grupo fenólico protonado (izquierda) y desprotonado (derecha)

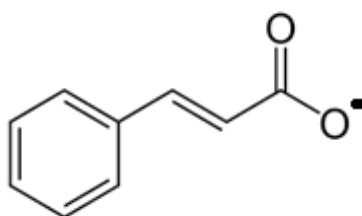


Figura 25: CIN a pH 6 y pH 11

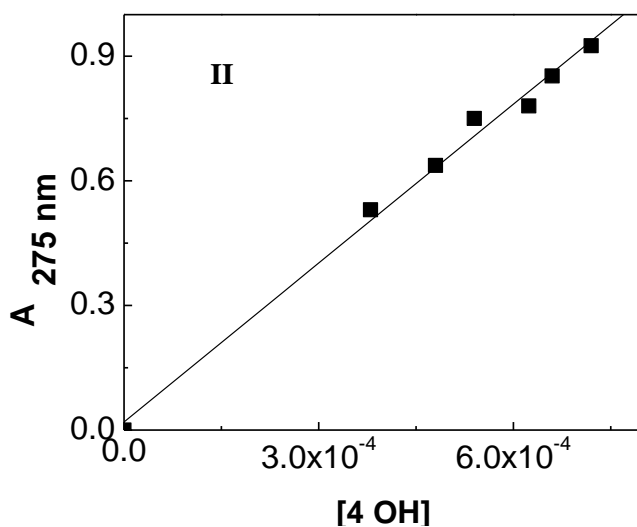
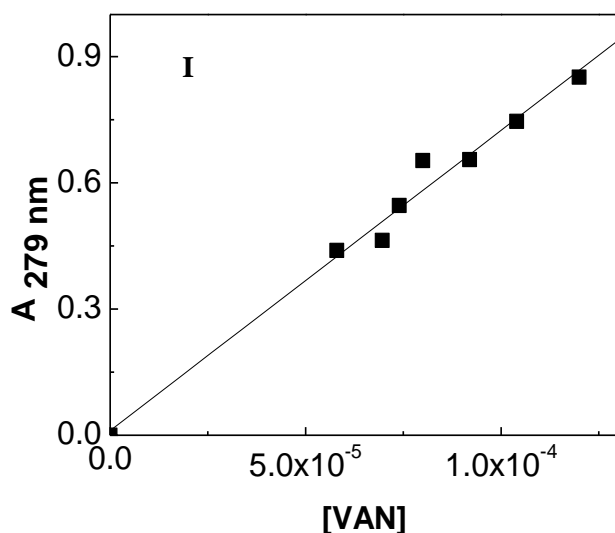
Se realizó además una estimación del valor de pK_a para cada sustrato. En función de los pK_a estimados (Tabla 1) se seleccionaron dos valores de pH para realizar todos los estudios: pH 6 (agua) y pH 11 (solución reguladora).

Tabla 1: Valores de pK_a para VAN, 4-OH y CIN

| pKa | VAN | 4-OH | CIN |
|-----|------|--------|-----|
| | 7- 8 | 10 -11 | < 6 |

4.2. Determinación del coeficiente de absortividad molar de los compuestos en estudio

Mediante la aplicación de la ley de Lambert-Beer (Sección 3.3.3) se determinaron los coeficientes de absortividad molar de VAN, 4-OH y CIN en agua y en solución reguladora de pH 11, a las longitudes de onda de los máximos de absorción correspondientes. Para ello se realizó una curva de calibración (absorbancia vs. concentración de sustrato), para cada uno de los compuestos estudiados en agua (Figura 26) y solución reguladora de pH 11 (Figura 27).



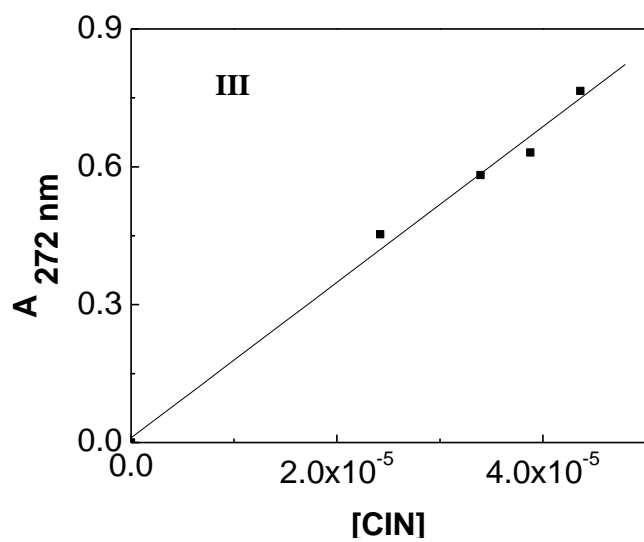
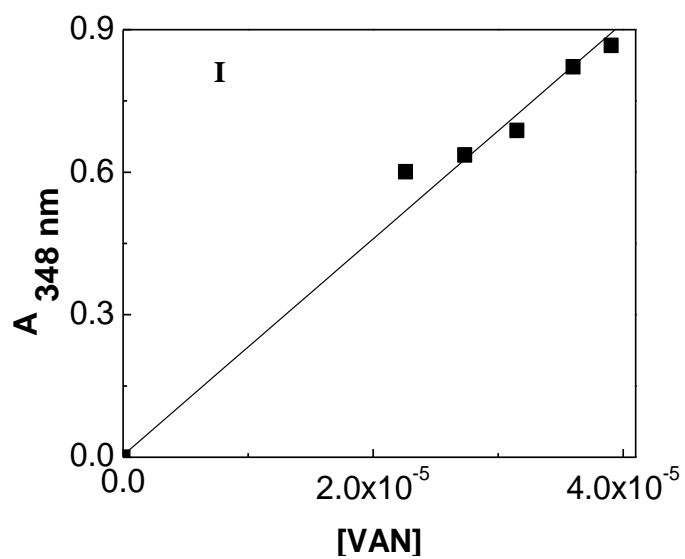


Figura 26: Ley de Lambert-Beer, en agua : I: VAN II: 4-OH y III: CIN.



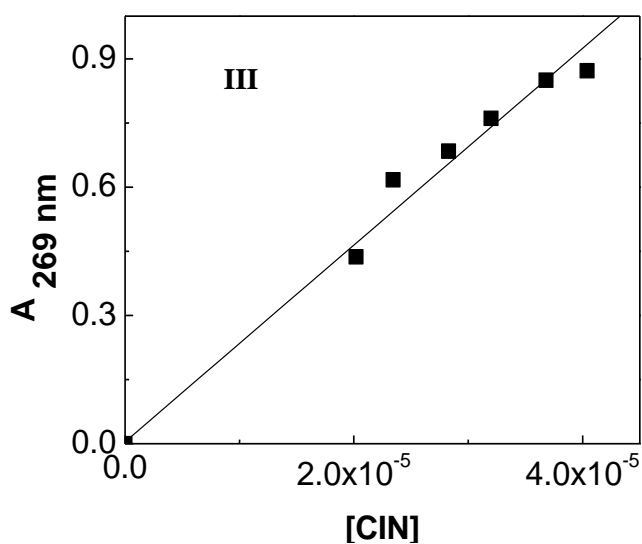
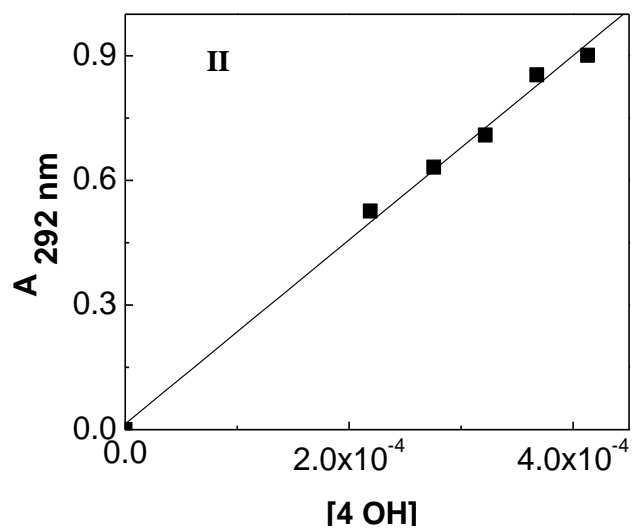


Figura 27: Ley de Lambert-Beer, en solución reguladora de pH 11: **I:** VAN, **II:** 4-OH y **III:** CIN

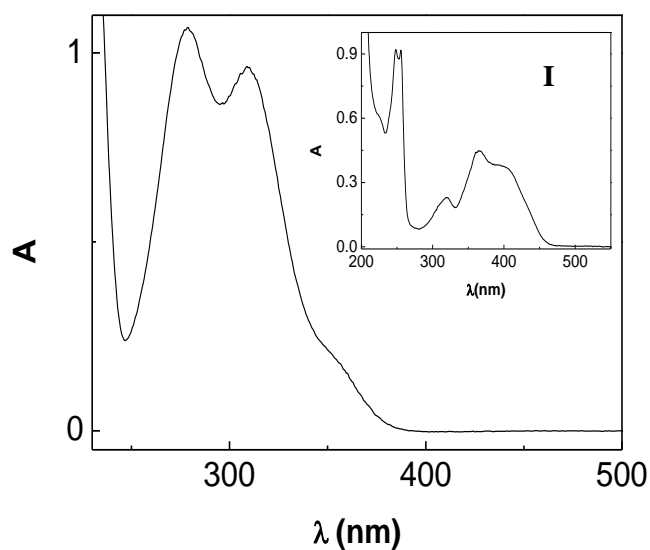
En la Tabla 2, se muestran los coeficientes de absorvividad molar en agua y en solución reguladora de pH 11 para los compuestos estudiados.

Tabla 2: Coeficientes de absorptividad molar de los sustratos VAN, 4-OH y CIN, en agua y en solución reguladora de pH 11.

| Coef.absortividad molar | VAN | 4-OH | CIN |
|--|----------------|---------------|----------------|
| ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) (λ) agua | 7138 (279 nm) | 1274 (275 nm) | 16930 (272 nm) |
| ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) (λ) pH 11 | 22758 (348 nm) | 2216 (292 nm) | 23002 (269 nm) |

4.3. Asociación oscura sensibilizador-sustratos

Dado que algunos sensibilizadores son capaces de interactuar, en el estado fundamental, con sustratos fotooxidables, previo a los experimentos de fotooxidación se investigó la potencial asociación oscura entre PN y los compuestos en estudio. Se tomaron los espectros de absorción UV-Visible de los sistemas sensibilizador (PN) /sustrato/ oxígeno (aire) vs. PN en agua (Figura 28) y en solución reguladora de pH 11 (Figura 29).



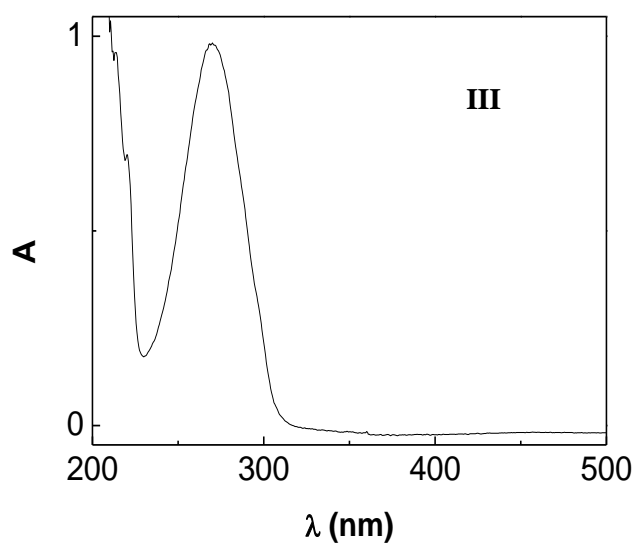
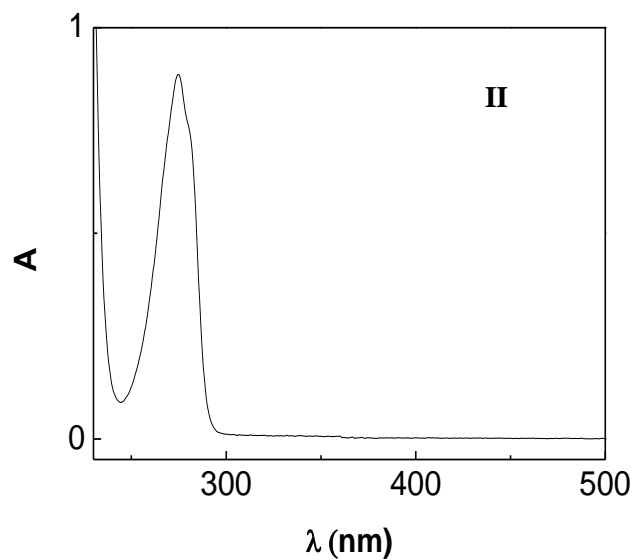
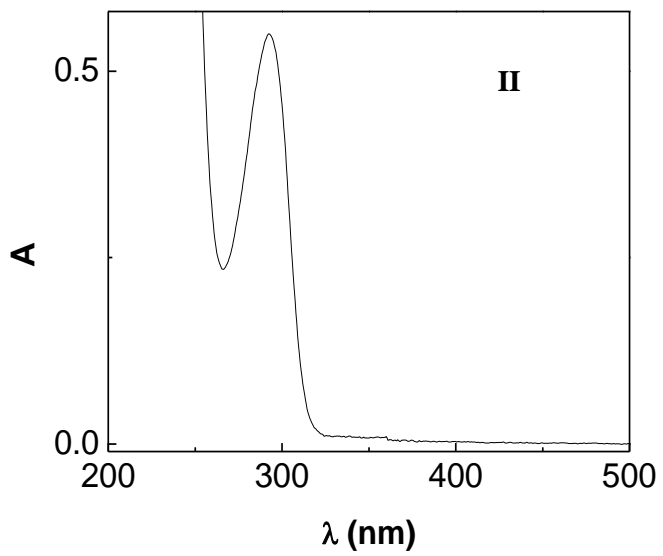
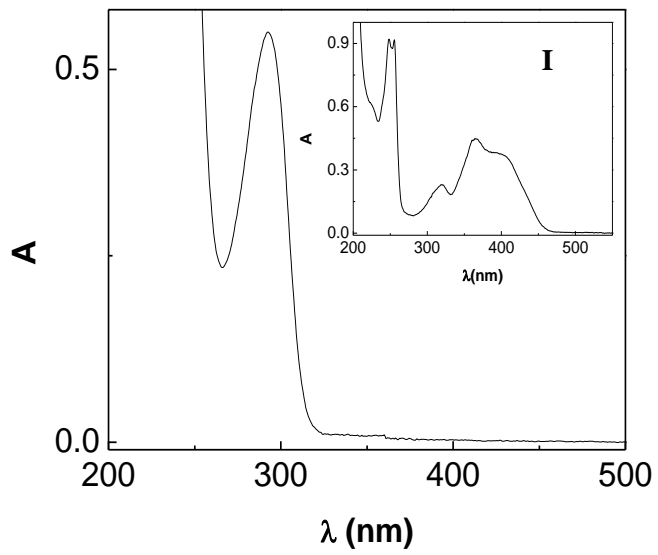


Figura 28: Espectros de absorción UV-Visible de: **I:** VAN + PN vs. PN, **II:** 4-OH + PN vs. PN y **III:** CIN + PN vs. PN.

Inserto de la Figura 28; I: Espectro UV-Visible de PN. Solvente: agua



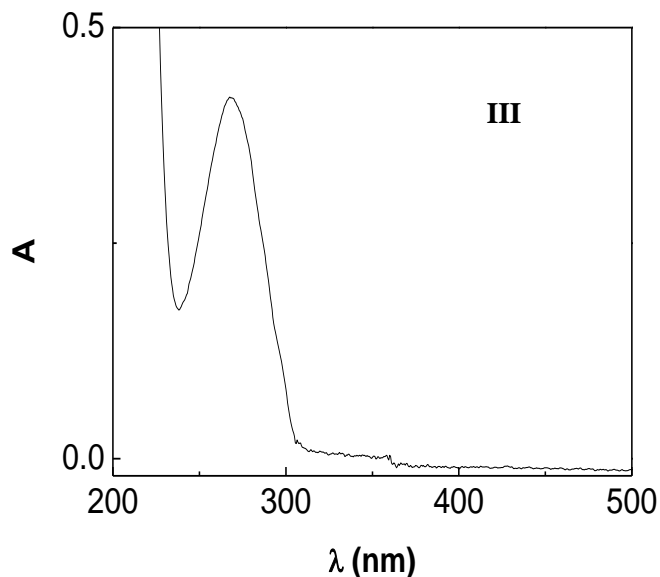


Figura 29: Espectros de absorción UV-Visible de: **I:** VAN + PN vs. PN,
II: 4-OH + PN vs. PN y **III:** CIN + PN vs. PN.

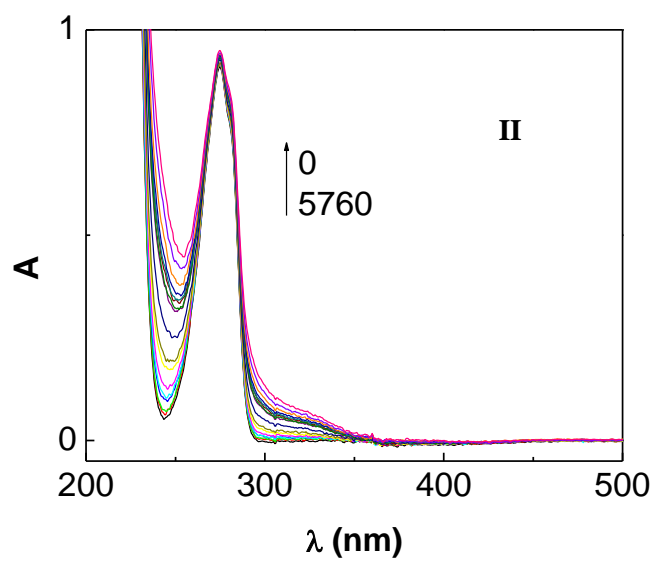
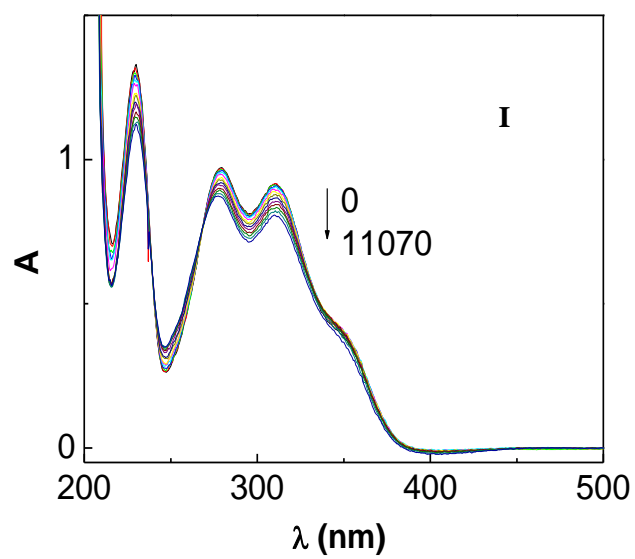
Inserto de la Figura 29, I: Espectro UV-Visible de PN.

Solvente: Solución reguladora de pH 11.

A partir de las Figuras 28 y 29, se puede observar que los espectros de absorción UV-Visible de las mezclas individuales VAN, 4-OH y CIN + sensibilizador PN ($A_{365\text{nm}} = 0.5$) vs. PN ($A_{365\text{nm}} = 0.5$), no muestran modificaciones en la zona visible del espectro de absorción de PN (ver gráfico inserto), bajo las condiciones experimentales de trabajo. Este resultado permitiría descartar una asociación oscura apreciable entre el sensibilizador y los tres sustratos estudiados, tanto en agua como en solución reguladora de pH 11.

4.4. Experimentos de consumo de sustrato, sensibilizado por PN

Con el objeto de evaluar una potencial interacción reactiva entre los sustratos VAN, 4-OH y CIN con la especie reactiva de oxígeno fotogenerada $O_2(^1\Delta_g)$, se llevaron a cabo experiencias de consumo de sustrato a través de espectroscopia de absorción UV-Visible. En las Figuras 30 y 31 se muestra la evolución espectral de los sistemas sustrato + PN vs. PN, en agua y en solución reguladora de pH 11, respectivamente.



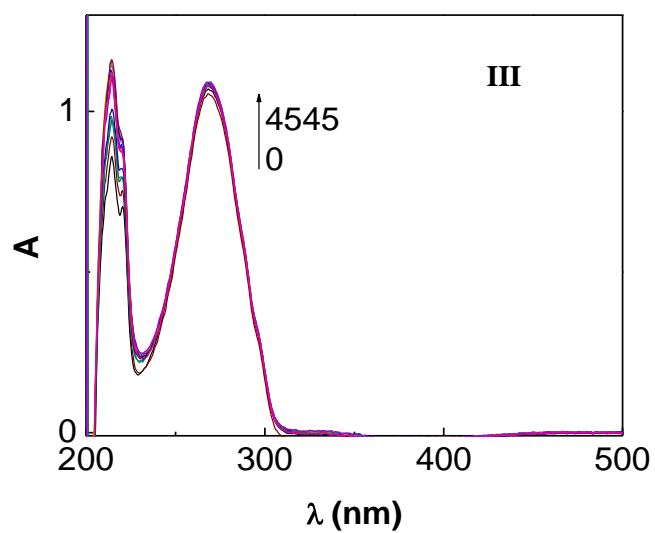
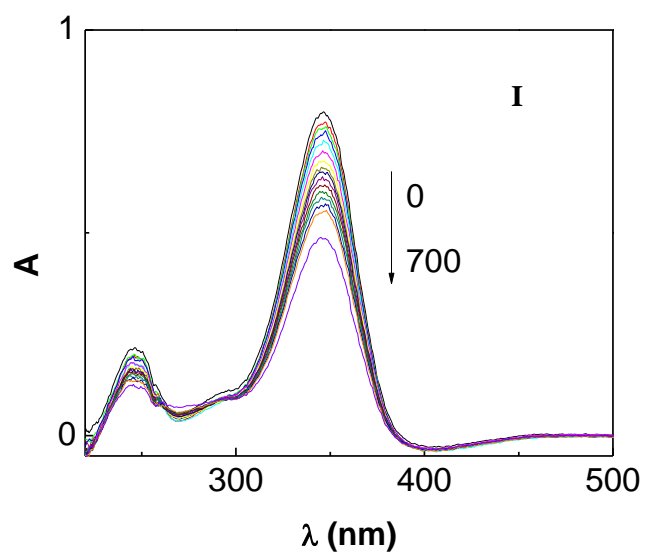


Figura 30: Evolución espectral de I: VAN, II: 4-OH y III: CIN bajo irradiación sensibilizada por PN, en agua. Los números en los espectros representan los tiempos de irradiación expresados en segundos.



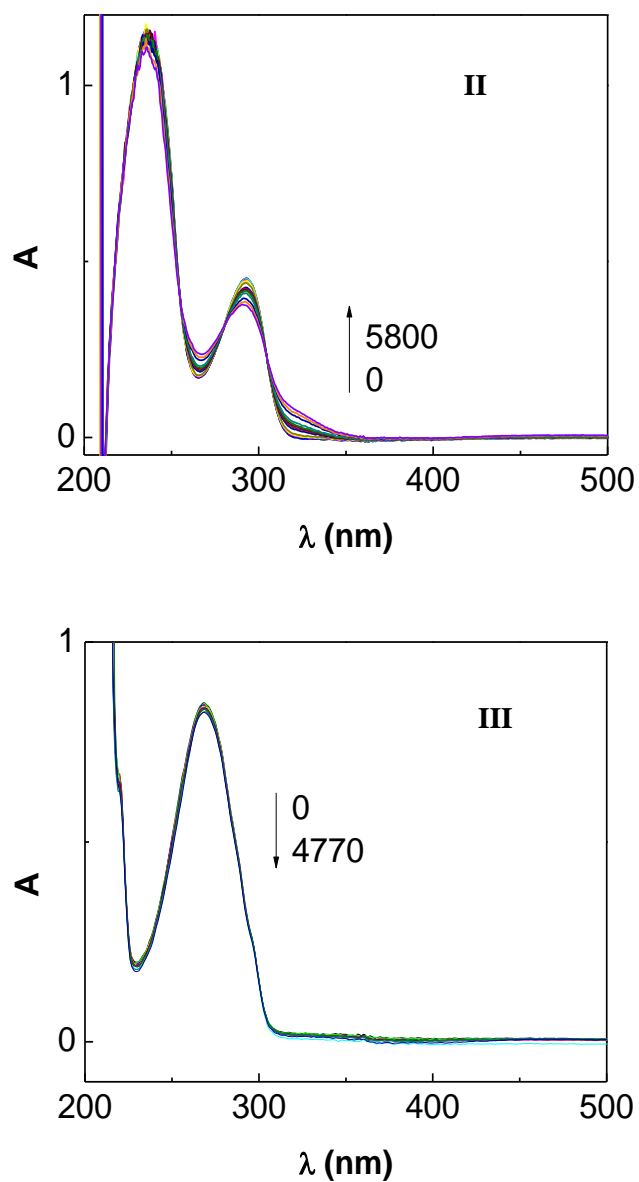


Figura 31: Evolución espectral de **I**: VAN, **II**: 4-OH y **III**: CIN bajo irradiación sensibilizada por PN, en solución reguladora de pH 11. Los números en los espectros representan los tiempos de irradiación expresados en segundos.

Como se puede observar en las Figuras 30 y 31, la irradiación con luz visible del sistema sensibilizador (PN) / sustrato / oxígeno (aire) vs. sensibilizador (PN) produce cambios en el espectro UV- Visible de los sustratos en agua y en solución reguladora de pH 11. Estos resultados sugieren una interacción reactiva entre los sustratos y la especie $O_2(^1\Delta_g)$.

Se puede observar además que a pH 11, tanto VAN como 4-OH son más reactivos frente a $O_2(^1\Delta_g)$. Esto se atribuye a que en medio alcalino los fenoles se encuentran en sus formas ionizadas. Este hecho ya ha sido reportado en numerosos trabajos en los que se ha estudiado el mecanismo y el comportamiento cinético de la degradación fotosensibilizada de diversos compuestos fenólicos⁶⁶.

4.5. Determinación de la constante de velocidad de desactivación reactiva (k_r) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos

Para evaluar cuantitativamente la interacción reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$ con los sustratos en estudio se utilizó una variante del método de Foote y Ching⁶⁰ (Sección 3.3.6).

Se realizaron experiencias de consumo de oxígeno por los sustratos y por un compuesto de referencia (FFA) mediante la técnica de fotólisis estacionaria.

En las Figuras 32-36 se muestran los gráficos de primer orden para el consumo de oxígeno por VAN, 4-OH y FFA con PN como sensibilizador.

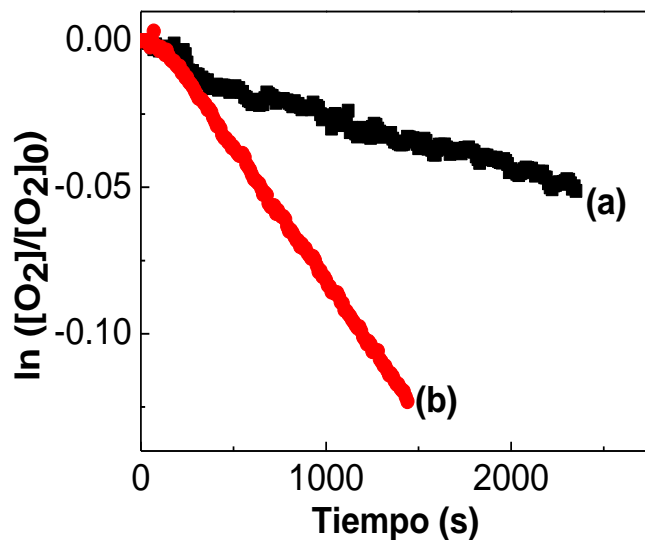


Figura 32: Gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por (a) VAN y (b) FFA, en agua. $[VAN] = [FFA] = 5 \times 10^{-4} M$.

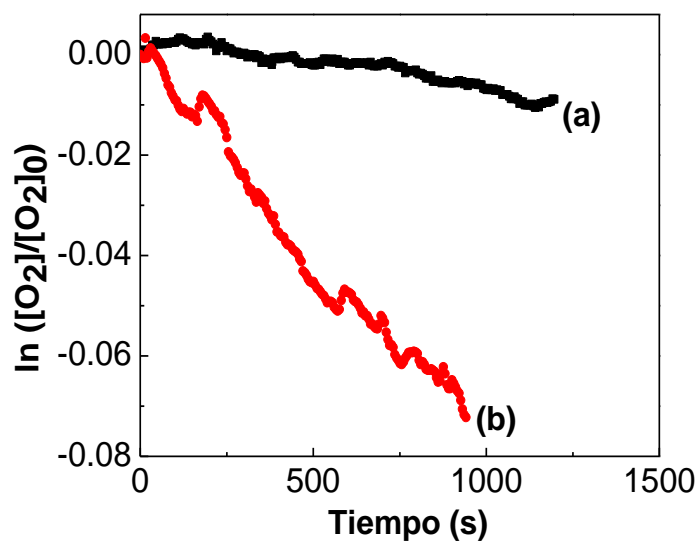


Figura 33: Gráficos de primer orden para el consumo de O₂ por (a) 4-OH y (b) FFA, en agua. [4-OH] = [FFA] = 5 x 10⁻⁴ M.

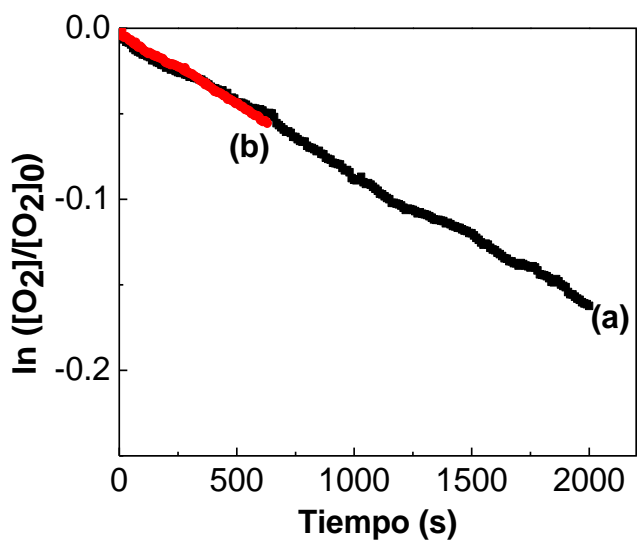


Figura 34: Gráficos de primer orden para el consumo de O₂ por (a) VAN y (b) FFA, en solución reguladora de pH 11. [VAN] = [FFA] = 5 x 10⁻⁴ M.

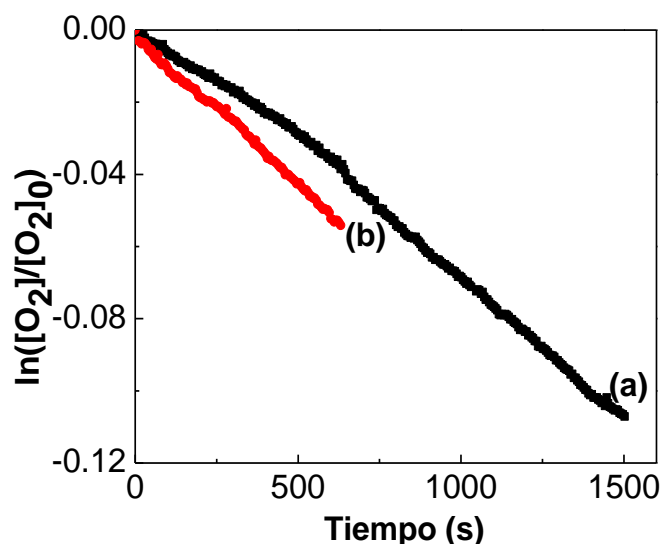


Figura 35: Gráficos de primer orden para el consumo de O_2 por (a) 4-OH y (b) FFA en solución reguladora de pH 11. $[4-OH] = [FFA] = 5 \times 10^{-4} M$.

En el caso de CIN si bien se observó un pequeño cambio en los espectros de absorción en función del tiempo de fotólisis (Figura 31, III), no fue posible detectar consumo de oxígeno en los tiempos de fotólisis ensayados, para una concentración de CIN de $5 \times 10^{-4} M$. Esto podría deberse a que la k_r de CIN sea demasiado pequeña respecto a los valores típicos de las constantes de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$ por una amplia gama de sustratos ($<10^6 M^{-1}s^{-1}$), y, por lo tanto, no es posible determinarla a partir de medidas de consumo de oxígeno, debido al límite de detección del electrodo específico utilizado.

En la Tabla 3 se muestran los valores de k_r para VAN, 4-OH y CIN en agua y en solución reguladora de pH 11.

Tabla 3: Constantes de velocidad de desactivación reactiva (k_r) y total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por VAN, 4-OH y CIN y relación (k_r/k_t). Solvente: agua y solución reguladora de pH 11.

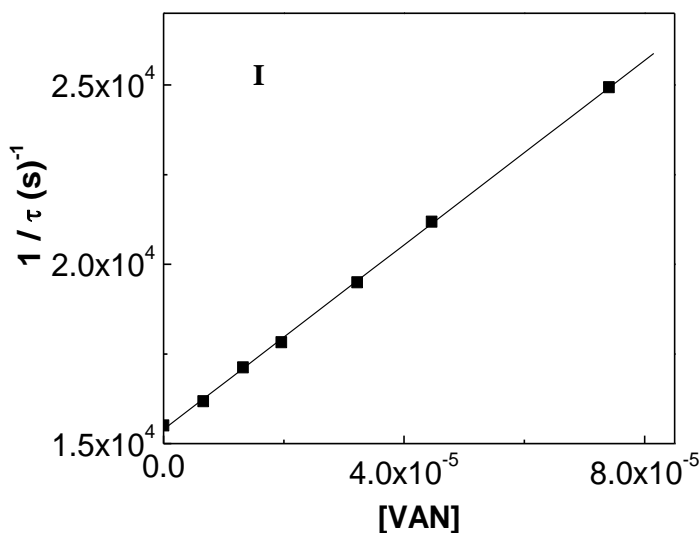
| Sustrato | $k_r \times 10^{-7}$ ($M^{-1} s^{-1}$) agua | $k_r \times 10^{-7}$ ($M^{-1} s^{-1}$) pH 11 | k_r / k_t agua | $k_t \times 10^{-7}$ ($M^{-1} s^{-1}$) D ₂ O | $k_t \times 10^{-7}$ ($M^{-1} s^{-1}$) pD 11 | k_r / k_t pH 11 |
|-------------|---|--|---------------------|---|--|----------------------|
| VAN | $2,3 \pm 0,2$ | 10 ± 1 | 0.18 | 13 ± 1 | 16 ± 1 | 0.66 |
| 4-OH | $1,4 \pm 0,1$ | $4,9 \pm 0,5$ | 0,083 | 17 ± 2 | 29 ± 1 | 0,17 |
| CIN | $< 0,1$ | $< 0,1$ | $< 0,1$ | $1,0 \pm 0,1$ | $1,4 \pm 0,1$ | $< 0,07$ |

De acuerdo a los valores de las constantes de velocidad de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$ mostrados en la Tabla 3, tanto VAN como 4-OH, presentan un aumento en la constante de velocidad a pH 11, respecto a agua. Esto se debe a que la reacción entre $O_2(^1\Delta_g)$ y fenoles, ocurre a través de la formación de un complejo de encuentro, con carácter parcial de transferencia de carga como ya se comentó en la Sección 1.4.1, Figura 4. A pH 11, los grupos OH están totalmente ionizados, lo cual los convierte en excelentes donantes de electrones⁶⁷⁻⁶⁹.

4.6. Determinación de las constantes de velocidad de desactivación total (k_t) de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos

Las constantes de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$, $k_t (=k_r + k_q)$, (procesos 3 y 4, Esquema 3), por los sustratos en estudio fueron determinadas por la técnica TRPD de acuerdo a lo descrito en la Sección 3.3.7. Experimentalmente, se midieron los τ de $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de los sustratos.

En las Figuras 36 y 37, se muestran los gráficos de Stern-Volmer para VAN, 4-OH y CIN en agua deuterada y en solución reguladora de pD11, respectivamente, a partir de los cuales fue posible obtener los valores de k_t para cada sustrato (Tabla 3).



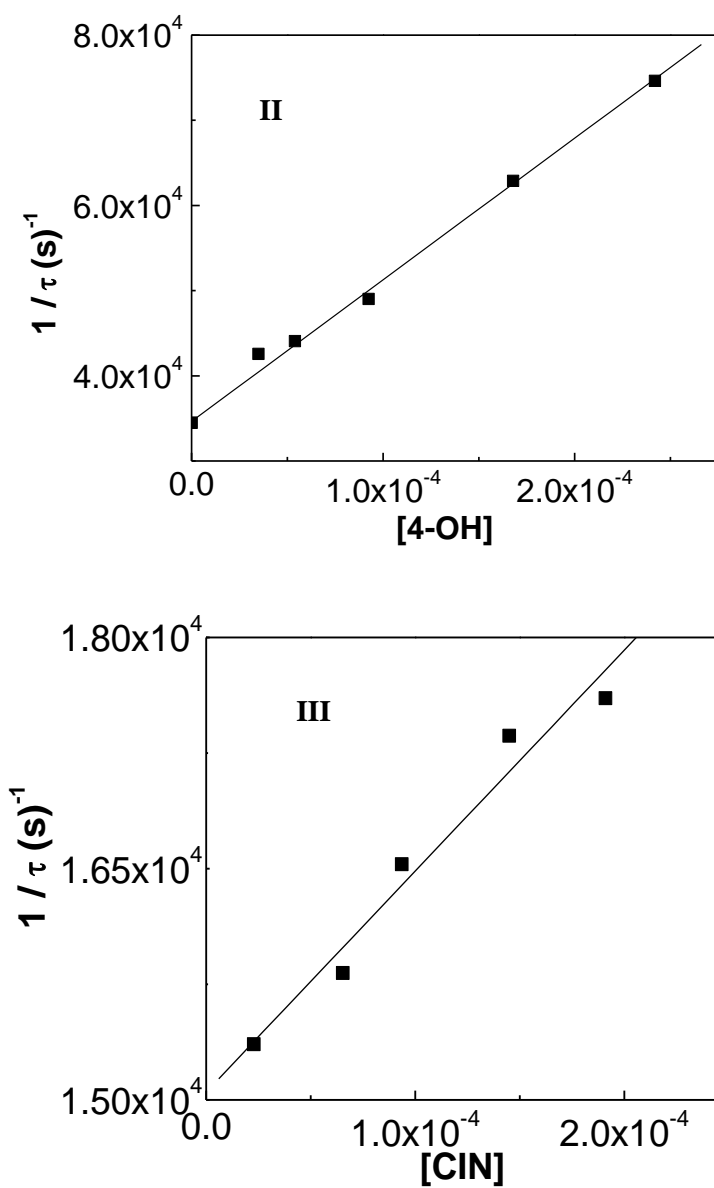
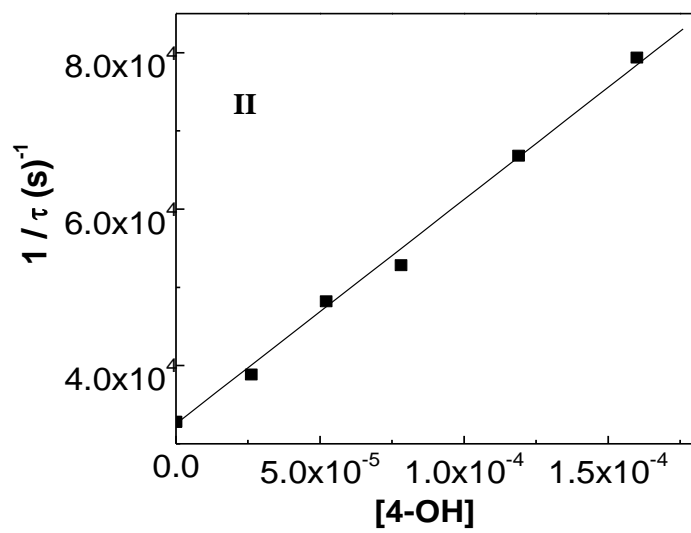
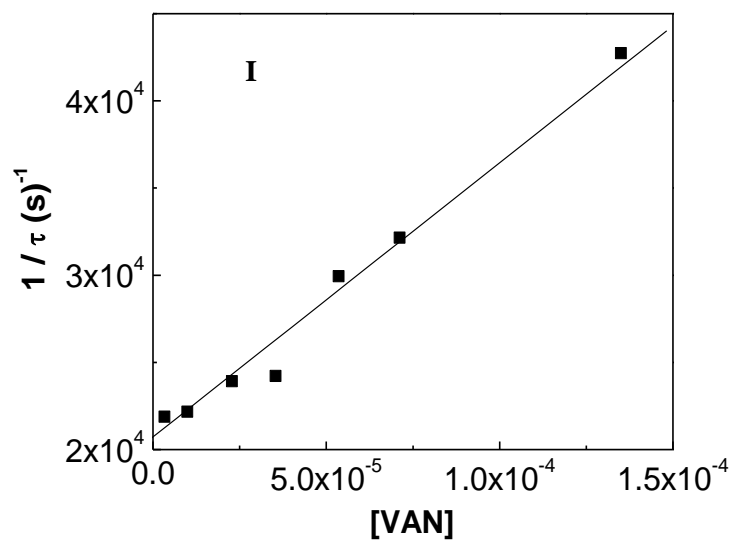


Figura 36: Gráficos de Stern-Volmer para la determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$, (k_t) por I: VAN; II: 4-OH y III: CIN, en agua deuterada.



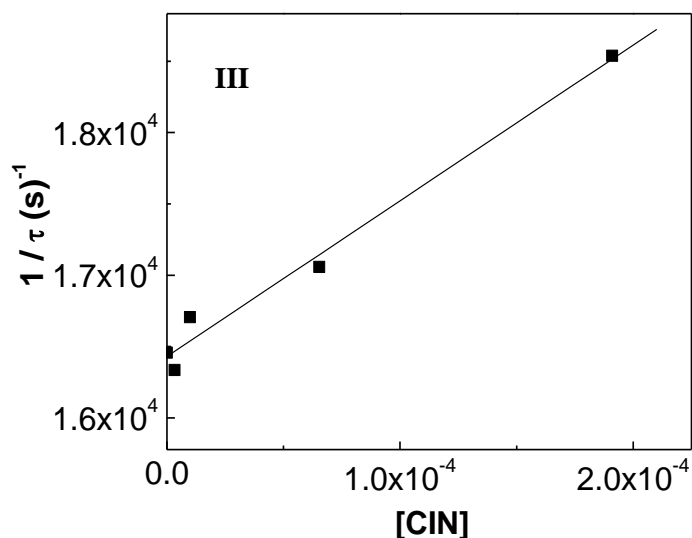


Figura 37: Gráficos de Stern-Volmer para la determinación de la constante de velocidad de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$, (k_t) por **I:** VAN; **II:** 4-OH y **III:** CIN, en solución reguladora de pD 11.

En la Tabla 3, se muestran los valores de k_t obtenidos de las pendientes de los gráficos de Stern-Volmer. Como se puede observar, los valores de k_t , al igual que los valores de k_r , también están influenciados por el pH/pD del medio. Para VAN y 4-OH en condiciones alcalinas, dichas constantes son mayores que a pH/pD neutro debido a la presencia del grupo fenolato. Este resultado concuerda con datos previos publicados⁷⁰.

Mártire y col.⁷¹ reportaron que para familias de compuestos hidroxiaromáticos los valores de k_t y k_r de las especies ionizadas (ionización de los grupos -OH) son superiores a las de las formas no ionizadas en al menos un orden de magnitud. Criado y col.⁷² informaron que la ionización de los grupos -OH en hidroxiflavonas, tiene una gran influencia sobre la cinética de reacción.

De acuerdo al mecanismo de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ planteado en la Figura 4, cuando se trabaja a diferentes pH, la estabilización del complejo de encuentro dependerá de cómo se deslocalice la carga dentro del mismo. A pH alcalino, la carga se encontrará más localizada debido a la presencia del grupo fenolato, por lo que el complejo de encuentro se estabilizará, lo que lo hace más reactivo frente a la especie electrofílica $O_2(^1\Delta_g)$ que a pH neutro donde el fenol no se encuentra ionizado.

Además, en la Tabla 3 se muestra la relación k_r/k_t , la cual puede ser interpretada como una medida de cómo un dado proceso fotooxidativo puede ocurrir respecto al otro, bajo determinadas condiciones experimentales. En numerosos trabajos se ha discutido el hecho de que la comparación directa de las constantes de velocidad k_r y k_t en las fotooxidaciones mediadas por $O_2(^1\Delta_g)$, no provee una información muy relevante acerca de la efectividad de la fotodegradación⁷³. Por tal motivo, para evaluar la importancia real del proceso de fotooxidación, se suele utilizar la relación k_r/k_t , la cual puede interpretarse como una medida relativa de la fracción total de colisiones sustrato- $O_2(^1\Delta_g)$ que efectivamente conducen a la reacción química.

A partir de los valores de k_r/k_t mostrados en la Tabla 3 se observa que, tanto el sustrato CIN, en agua y pH 11, como el sustrato 4-OH, en agua, presentan una mayor contribución física al proceso de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ con respecto a VAN. Es decir, que CIN y 4-OH, tendrían mayor capacidad para desactivar a $O_2(^1\Delta_g)$ a través de un proceso físico (proceso 4, Esquema 3). Esto les permitiría a los sustratos, seguir cumpliendo con su función de antioxidante en un nuevo ciclo de protección. Esta escasa reactividad química constituye una propiedad muy conveniente para un potencial agente antioxidante ya que al ser la mayor parte de la interacción antioxidante- $O_2(^1\Delta_g)$ de naturaleza física, se logra desactivar al $O_2(^1\Delta_g)$ y se mantiene intacto (sin deterioro químico) al antioxidante para seguir actuando en la preservación de la calidad y el valor nutricional de los alimentos.

4.7. Capacidad antioxidante de los sustratos frente a aditivos de uso comercial.

Se compararon las velocidades de consumo de oxígeno, en presencia de PN como sensibilizador, de VAN, 4-OH y CIN con las de los antioxidantes comerciales ácido ascórbico (ASC) y trolox (TRO), en agua (Figura 38) y en solución reguladora de pH 11 (Figura 39).

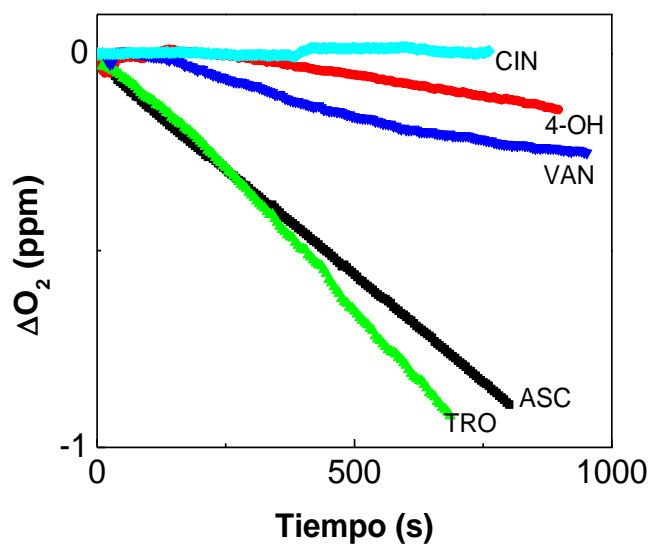


Figura 38: Velocidades relativas de consumo de oxígeno por CIN, 4-OH, VAN, ASC y TRO, en agua. Sensibilizador: PN.

Como se puede observar en la Figura 38, la velocidad de consumo de oxígeno en agua por VAN es mayor que la de CIN y 4-OH. Esto permite concluir que VAN tiene una mayor capacidad antioxidante frente a $O_2(^1\Delta_g)$ respecto a CIN y 4-OH. Sin embargo, la capacidad antioxidante de los tres sustratos en estudio resulta menor que la de los antioxidantes de uso comercial, TRO y ASC.

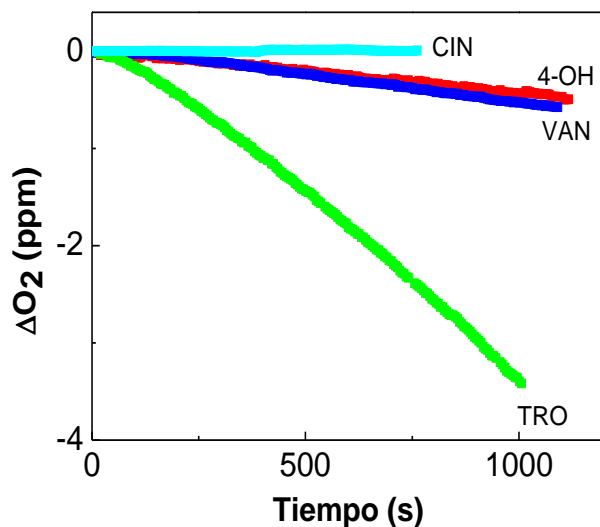


Figura 39: Velocidades relativas de consumo de oxígeno por 4-OH, VAN y TRO, en solución reguladora de pH 11. Sensibilizador: PN.

La Figura 39 muestra que tanto la VAN como 4-OH muestran una mayor capacidad antioxidante frente a $O_2(^1\Delta_g)$ a pH 11, comparada a la Figura 38, donde se muestran las velocidades de consumo de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos en agua. Sin embargo, el antioxidante de uso comercial, TRO, sigue mostrando mayor reactividad frente a $O_2(^1\Delta_g)$ que los sustratos en estudio.

A pH 11, no se realizó el consumo de oxígeno de ASC, ya que no es estable en condiciones alcalinas⁶².

4.8. Interacción antioxidante de los sustratos con antioxidantes comerciales

Un método muy utilizado por las industrias alimenticias para la preservación de sus productos frente a la oxidación lipídica, es la aplicación de mezclas de antioxidantes en los alimentos, de modo de potenciar la actividad individual de cada compuesto antioxidante por efecto sinérgico entre ellos⁷⁴.

Se determinaron las velocidades de consumo de oxígeno por los sustratos solos y por mezclas de los sustratos con antioxidantes de uso comercial (ASC y TRO), en presencia de PN (Figuras 40 y 41), con el fin de evaluar el tipo de efecto antioxidante (sinérgico, aditivo o antagónico) frente a la especie $O_2(^1\Delta_g)$.

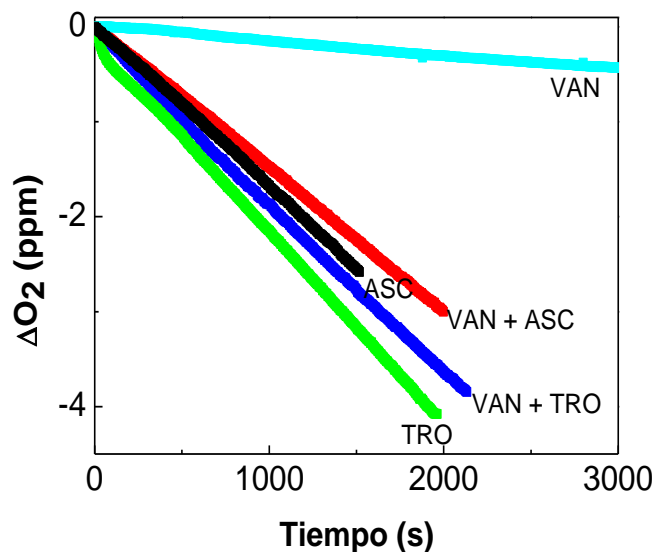


Figura 40: Velocidades de consumo de oxígeno por VAN, ASC, TRO y mezclas VAN + ASC, VAN + TRO, en agua. $[VAN] = [ASC] = [TRO] = 6 \times 10^{-4}$ M. Sensibilizador: PN.

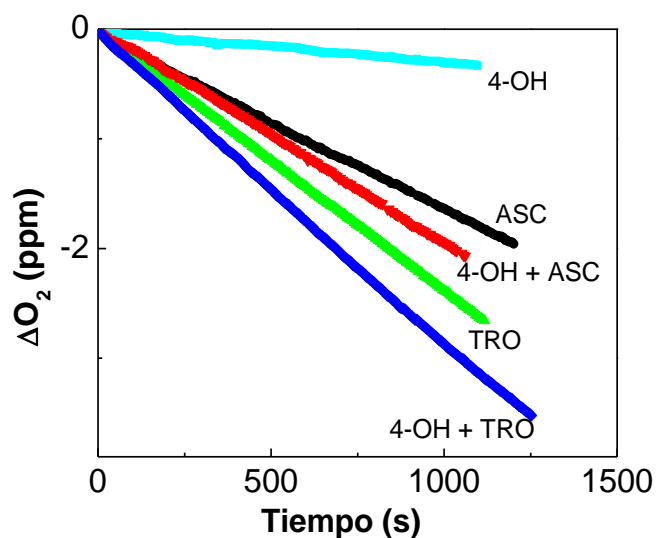


Figura 41: Velocidades de consumo de oxígeno por 4-OH, ASC, TRO y mezclas 4-OH + ASC, 4-OH + TRO, en agua. $[4\text{-OH}] = [\text{ASC}] = [\text{TRO}] = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Sensibilizador: PN.

Los resultados de la Figura 40, muestran que, en agua, si bien la mezcla con ASC y TRO, aumentan la capacidad antioxidante de VAN, esta no muestra ser más efectiva que los antioxidantes comerciales utilizados de manera individual a la misma concentración.

Para el caso de 4-OH, (Figura 41) la presencia de ASC y TRO aumentan su capacidad antioxidante, es decir que se observa un efecto antioxidante sinérgico. Es decir, que una mezcla de 4-OH y ASC presenta una mayor capacidad antioxidante frente a la especie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ que la que ejercen los sustratos individualmente a las mismas concentraciones.

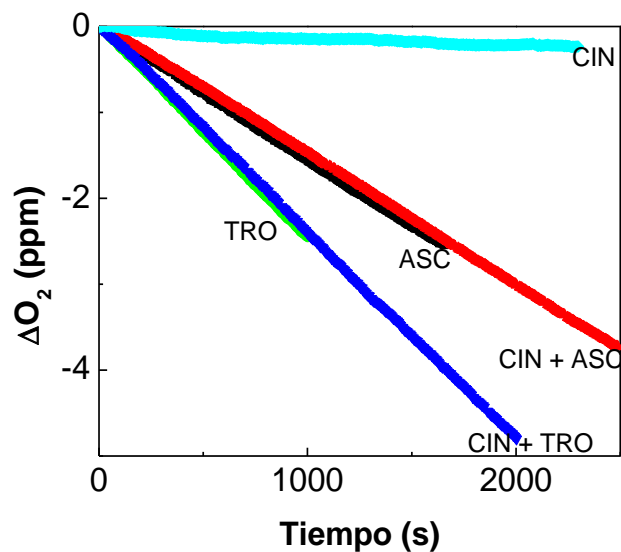


Figura 42: Velocidades relativas de consumo de oxígeno por CIN, ASC, TRO y mezclas CIN + ASC, CIN + TRO en agua. $[CIN] = [ASC] = [TRO] = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$.
Sensibilizador: PN.

En el caso de CIN (Figura 42), no muestra capacidad antioxidante de manera individual, en tanto que las mezclas con TRO y ASC muestran capacidad antioxidante idéntica al de los antioxidantes comerciales por separado, por lo tanto, se puede concluir que la presencia de CIN no ejerce ningún efecto sobre la actividad antioxidante de los aditivos comerciales.

4.9. Evaluación de la participación de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de los sustratos, sensibilizada por PN.

Para evaluar la participación de la especie reactiva $O_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de VAN y 4-OH, sensibilizada por PN, en agua y en solución reguladora de pH 11, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno en presencia y ausencia de azida sódica (NaN_3), un inhibidor físico específico de $O_2(^1\Delta_g)$ ⁶¹. En tal caso, se espera que en presencia de NaN_3 , el consumo de oxígeno se vea inhibido. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 43- 46.

Cabe aclarar que estos experimentos no fueron realizados con CIN, debido a su baja velocidad de consumo de $O_2(^1\Delta_g)$, en las condiciones experimentales ensayadas.

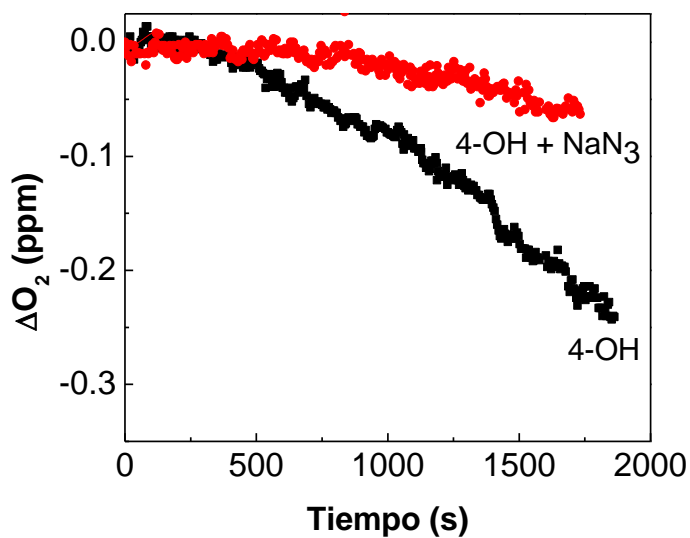


Figura 43: Consumo de oxígeno de 4-OH en ausencia y presencia de NaN₃ en agua.
 [4-OH] = 6×10^{-4} M; [NaN₃] = 1×10^{-3} M. Sensibilizador. PN.

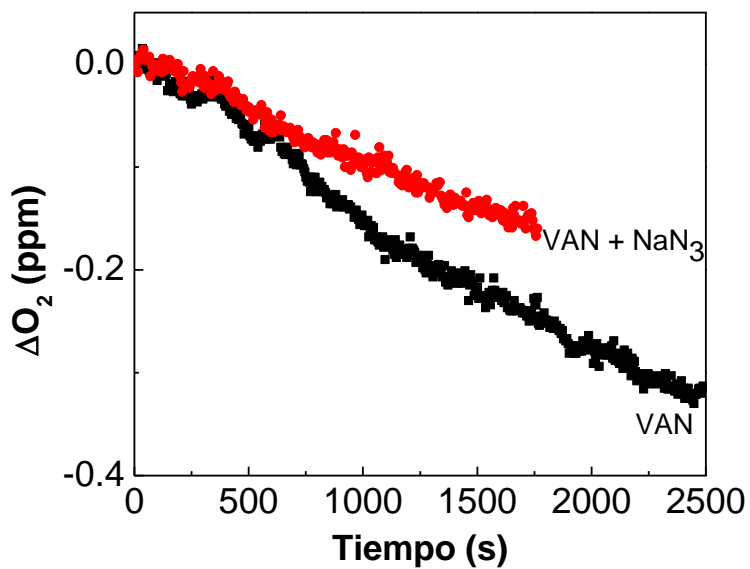


Figura 44: Consumo de oxígeno de VAN en ausencia y presencia de NaN₃ en agua.
 [VAN] = 6×10^{-4} M; [NaN₃] = 1×10^{-3} M. Sensibilizador. PN.

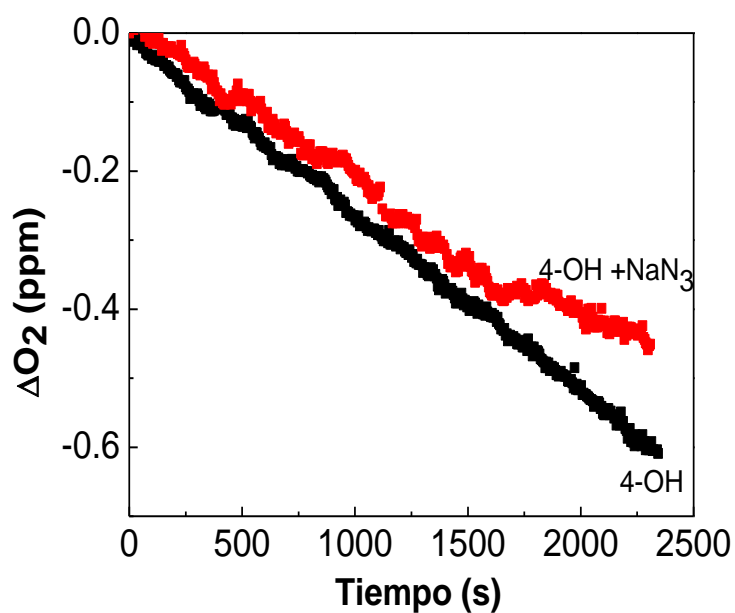


Figura 45: Consumo de oxígeno de 4-OH en ausencia y presencia de NaN₃ en solución reguladora de pH 11. [4-OH] = 6×10^{-4} M; [NaN₃] = 1×10^{-3} M. Sensibilizador. PN.

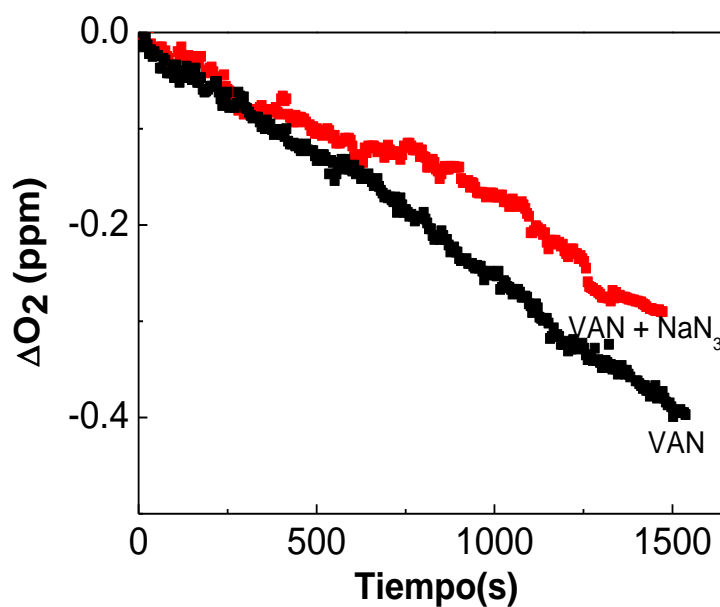
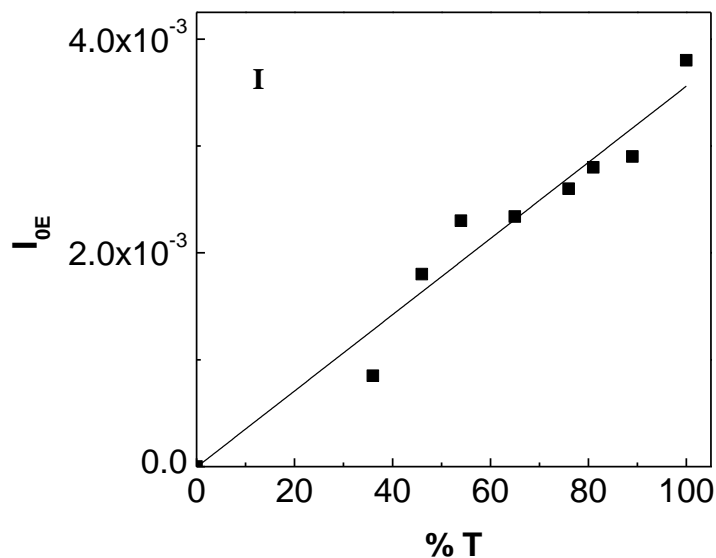


Figura 46: Consumo de oxígeno de VAN en ausencia y presencia de NaN₃ en solución reguladora de pH 11. [VAN] = 6×10^{-4} M; [NaN₃] = 1×10^{-3} M. Sensibilizador. PN.

Como puede observarse cualitativamente de las pendientes de los gráficos, la velocidad de consumo de oxígeno de los sustratos, VAN y 4-OH, disminuye claramente en presencia de NaN_3 , confirmando la participación de la especie $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en la fotooxidación de los sustratos sensibilizada por PN, tanto en agua como en solución reguladora de pH 11.

4.10. Capacidad prooxidante de los sustratos

La potencial capacidad prooxidante de los sustratos se evaluó a través de la determinación de los rendimientos cuánticos de generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, tal como se describió en la Sección 3.3.11, utilizando como actinómetro PN. En la Figura 47, se muestran los gráficos de I_{0E} en función de la energía del láser representada como el porcentaje de transmitancia de las soluciones utilizadas para filtrar la luz de excitación.



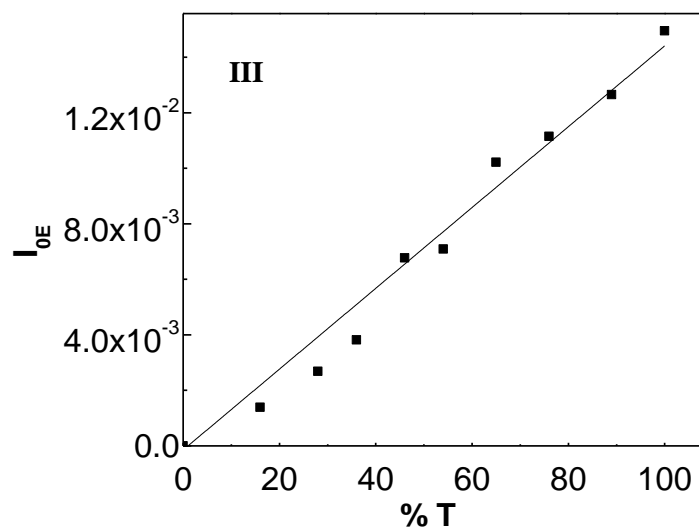
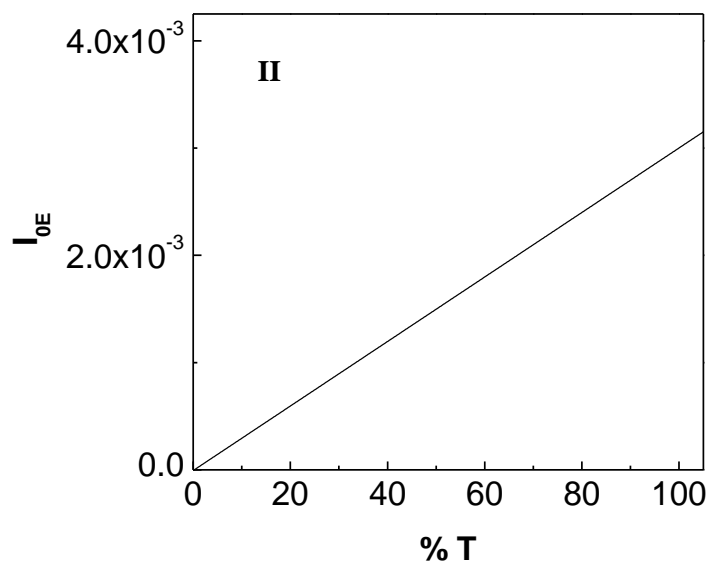


Figura 47: Intensidad de emisión de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a tiempo cero (I_{0E}) en función del porcentaje de transmitancia de las soluciones utilizadas como filtro.

Solvente: agua deuterada. I: VAN; II: 4-OH; III: PN (actinómetro)

En el caso de CIN no se observó una generación de $O_2(^1\Delta_g)$, en las condiciones ensayadas, por lo tanto, podríamos decir que CIN no posee capacidad prooxidante.

En la Tabla 4 se muestran los valores de Φ_{Δ} para VAN y 4-OH, obtenidos a partir de los gráficos presentados en la Figura 47.

Tabla 4: Rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos VAN y 4-OH en agua deuterada, bajo irradiación directa a 266 nm.

| Sustrato | Φ_{Δ} |
|----------|-----------------|
| VAN | 0.25 ± 0.02 |
| 4-OH | 0.20 ± 0.02 |
| CIN | NG |

NG: No se observó generación de $O_2(^1\Delta_g)$

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 4, se puede observar que los valores de rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por los sustratos, no son despreciables con respecto a sensibilizadores conocidos tales como compuestos de coordinación basados en complejos de rutenio (II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelantes ($\Phi_{\Delta}=1$). Si bien VAN y 4-OH actúan como antioxidantes inhibiendo la especie reactiva $O_2(^1\Delta_g)$ fotosensibilizada, se puede observar que también la pueden generar mediante la irradiación directa a 266 nm.

El hecho de que VAN y 4-OH poseen actividad prooxidante además de propiedades antioxidantes, podría convertirlos en aditivos no recomendables al momento de tener que seleccionar un sustrato que permita controlar los procesos de autooxidación en una dada matriz alimenticia.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se pudo caracterizar el comportamiento fisicoquímico de los compuestos en estudio frente a la especie reactiva $O_2(^1\Delta_g)$, fotogenerada mediante la excitación del sensibilizador Perinaftenona (PN).

- Los sustratos 4-hidroxifenilalcohol, vanilina y ácido cinámico desactivan física y químicamente a la especie $O_2(^1\Delta_g)$, es decir que poseen capacidad antioxidante frente a dicha especie reactiva de oxígeno.
- Los sustratos 4-hidroxifenilalcohol y vanilina poseen mayor capacidad para desactivar al $O_2(^1\Delta_g)$ cuando se encuentran en un entorno de pH alcalino, debido a la formación de un complejo de encuentro con carácter parcial de transferencia de carga, actuando el $O_2(^1\Delta_g)$ como aceptor de electrones.
- 4-hidroxifenilalcohol y ácido cinámico desactivan al $O_2(^1\Delta_g)$, principalmente por la vía física, tanto en agua como en medio alcalino, lo cual es una propiedad muy deseable al momento de seleccionar un aditivo con propiedades antioxidantes.
- Las mezclas de 4-hidroxifenilalcohol con los aditivos comerciales, ácido ascórbico y trolox, presentan mayor capacidad antioxidante que cada uno de los sustratos individuales, en consecuencia, se puede concluir que, en este caso, existe un efecto antioxidante del tipo sinérgico.
- Vanilina y 4-hidroxifenilalcohol son capaces de generar $O_2(^1\Delta_g)$ bajo iluminación UV. Esta propiedad podría convertirlos en aditivos no recomendables al momento de seleccionar un sustrato que permita controlar los procesos de autooxidación en un alimento.

6. REFERENCIAS

- ¹ Murray, R. K., Bender, D. A., & Botham, K. M. (2010). *Harper: bioquímica ilustrada*. McGraw-Hill.
- ² Rawls, H. R., & Van Santen, P. J. (1970). A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 47(4), 121-125.
- ³ Clements, A. H., Van Den Engh, R. H., Frost, D. H., Hoogenhout, K., Nooi, J. R. (1973). Participation of singlet oxygen in photosensitized oxidation of 1,4-dienoic systems and photooxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50, 325–329.
- ⁴ Rosenthal, J. (1985). *Photooxidation of Foods: Cap 3: Single Oxygen*. Press CRC Boca Raton.
- ⁵ Spikes, J. D. (1989). Photosensitization. In *The science of photobiology* (pp. 79-110). Springer, Boston, MA.
- ⁶ Neumann, M. M., Fusero, S. N., & García, N. A. (1991). A comparative study on the susceptibilities of soybean, sunflower and peanut oils to singlet molecular oxygen photooxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(9), 662-665.
- ⁷ Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- ⁸ Zhang, C. X., Wu, H., & Weng, X. C. (2004). Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. *Food chemistry*, 84(2), 219-222.
- ⁹ Fresnadillo, D. G. (2010). Generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. *TECNIA*, 20(1).
- ¹⁰ Thomas, A. H., Lorente, C., Capparelli, A. L., Martínez, C. G., Braun, A. M., & Oliveros, E. (2003). Singlet oxygen ($^1\Delta_g$) production by pterin derivatives in aqueous solutions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(3), 245-250.
- ¹¹ Sandoval Altamirano, C. P. (2012). Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singlete y flavonoides: efecto del medio.
- ¹² DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 351-371.
- ¹³ Turro, N. J. (1991). *Modern molecular photochemistry*. University science books.
- ¹⁴ Fresnadillo, D. G. (2005). Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis, propiedades y limitaciones. *Capítulo*, 8, 253-269.

-
- ¹⁵ Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (1Δg) sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 79(1-2), 11-17.
- ¹⁶ Hernández, D. M., Rodríguez-Serrano, Á., Doerr, M., & Daza, M. C. (2018). Efecto de la estructura molecular sobre el espectro electrónico vertical de la oxoglucina. *Revista Colombiana de Química*, 47(1), 64-76.
- ¹⁷ Rabold, G. P., Bar-Eli, K. H., Reid, E., & Weiss, K. (1965). Photochemically generated free radicals. I. The perinaphthenone system. *The Journal of Chemical Physics*, 42(7), 2438-2447.
- ¹⁸ Gorman, A. A., Hamblett, I., Lambert, C., Spencer, B., & Standen, M. C. (1988). Identification of both preequilibrium and diffusion limits for reaction of singlet oxygen, O₂ (1. DELTA. g), with both physical and chemical quenchers: variable-temperature, time-resolved infrared luminescence studies. *Journal of the American Chemical Society*, 110(24), 8053-8059
- ¹⁹ Palumbo, M. C., Garcia, N. A., & Argüello, G. A. (1990). The interaction of singlet molecular oxygen O₂ (1Δg) with indolic derivatives. Distinction between physical and reactive quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 7(1), 33-42.
- ²⁰ Young, R. H., Martin, R. L., Feriozi, D., Brewer, D., & Kayser, R. (1973). on the mechanism of quenching of singlet oxygen by amines-iii. evidence for a charge-transfer-like complex. *Photochemistry and Photobiology*, 17(4), 233-244.
- ²¹ Gsponer, H. E., Previtali, C. M., & García, N. A. (1987). Evidence for physical quenching of singlet oxygen (O₂ (1Δg)) by dinitrophenols. *Journal of photochemistry*, 36(3), 247-253.
- ²² Garcia, N. A. (1994). New trends in photobiology: singlet-molecular-oxygen-mediated photodegradation of aquatic phenolic pollutants. A kinetic and mechanistic overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 22(3), 185-196.
- ²³ Gorman, A. A., Gould, I. R., Hamblett, I., & Standen, M. C. (1984). Reversible exciplex formation between singlet oxygen, 1. DELTA. g, and vitamin E. Solvent and temperature effects. *Journal of the American Chemical Society*, 106(23), 6956-6959.
- ²⁴ Gorman, A. A., Gould, I. R., & Hamblett, I. (1982). Time-resolved study of the solvent and temperature dependence of singlet oxygen (1Δg) reactivity toward enol ethers: reactivity parameters typical of rapid reversible exciplex formation. *Journal of the American Chemical Society*, 104(25), 7098-7104.

-
- ²⁵ Valenzuela, J.E.M. (2008). Estudio del efecto protector de flavonoides como atrapadores de O₂ (¹Δ_g) en modelos de membrana fosfolipídica. Dependencia del medio, de la estructura y reactividad. Universidad de Chile, Santiago.
- ²⁶ Marcus, Y. (1993). The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chemical Society Reviews*, 22(6), 409-416.
- ²⁷ Young, R.H., Brewer, D.R.(1978). The mechanism of quenching of singlet oxygen in. Singlet oxygen reactions with organic compounds and polymers. Ranby.B and Rabek.J.F.,(eds), Chichester, John Wiley & Sons.36-47.
- ²⁸ Gorman, A. A., Lovering, G., & Rodgers, M. A. J. (1979). The entropy-controlled reactivity of singlet oxygen (¹Δ_g) toward furans and indoles in toluene. A variable-temperature study by pulse radiolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 101(11), 3050-3055.
- ²⁹ Tanielian, C., & Wolff, C. (1988). Mechanism of physical quenching of singlet molecular oxygen by chlorophylls and related compounds of biological interest. *Photochemistry and photobiology*, 48(3), 277-280.
- ³⁰ Rojano, B. A. (1997). Oxidación de lípidos y antioxidantes.
- ³¹ del Cura, R. M. (2012). *Mecanismos implicados en la acción antioxidantes de polifenoles naturales en productos de la pesca y acuicultura* (Doctoral dissertation, Universidad de Santiago de Compostela)
- ³² Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., & Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(2), 170-177.
- ³³ Tomasik, P. (Ed.). (2003). *Chemical and functional properties of food saccharides*. CRC Press.
- ³⁴ Zamora, R., Hidalgo, F. J., & Alaiz, M. (1991). Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. I. Formación de los hidroperóxidos lipídicos. *Grasas y aceites*.
- ³⁵ Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- ³⁶ Teran Hilares, R. (2014). Diseño de mezclas de compuestos fenólicos en función a su eficiencia antioxidante en el aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*).
- ³⁷ Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656-662.

-
- ³⁸ Pazos, M., Alonso, A., Fernández-Bolaños, J., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2), 366-373.
- ³⁹ Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4), 221-247.
- ⁴⁰ Ahmad, S., & Pardini, R. S. (1990). Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and photodynamic furanocoumarin, xanthotoxin. *Photochemistry and Photobiology*, 51(3), 305-311.
- ⁴¹ Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 23-30.
- ⁴² González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1).
- ⁴³ Justo, C., Gutiérrez, R. V. (2002). "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes". Instituto Superior de Medicina Militar Dr. Luis Díaz Soto. *Rev Cubana Med Militar*; 31(2), 126-33.
- ⁴⁴ Shishikura Y., Khokhar, S., & Murray, B. (2006). Effects of Tea Polyphenols on Emulsification of Olive Oil in a small intestine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5), 1906-1913.
- ⁴⁵ Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., & Rahmani, M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(5), 307-312.
- ⁴⁶ Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(7), 2969-2976.
- ⁴⁷ Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., & Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 1027-1038.
- ⁴⁸ Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

-
- ⁴⁹ Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- ⁵⁰ Sayago Gómez, A., Morales Millán, M. T., Marín Beltrán, M., & Aparicio López, R. (2007). Vitamina ey aceites vegetales. *Grasas y aceites*, 58 (1), 74-86.
- ⁵¹ Ceausescu, E. (1984). *La polimerización estereoespecífica del isopreno*. UNAM.
- ⁵² Campos, J., Ruiz, R., & Díaz, E. (2002). efecto sinérgico del butil-hidroxi-tolueno (bht) y ácido ascórbico en un producto cereal lacteado. *Alimentaria*, 2(1), 89-95.
- ⁵³ Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345-358.
- ⁵⁴ Aurand, L. W. (Ed.). (2013). *Food composition and analysis*. Springer Science & Business Media.
- ⁵⁵ Wade (2009). "Química organica-5^{ta} edición". Editorial: Pearson
- ⁵⁶ Medina, I., Gallardo, J. M., González, M. J., Lois, S., & Hedges, N. (2007). Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3889-3895.
- ⁵⁷ Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure- activity relation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(4), 1453-1459.
- ⁵⁸ Porrás-Loaiza, A. P., y López-Malo, A. (2009) "Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos". *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 3(1), 121-134.
- ⁵⁹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ⁶⁰ Criado, S., Mártire, D., Allegretti, P., Furlong, J., Bertolotti, S. G., La Falce, E., & García, N. A. (2002). Singlet molecular oxygen generation and quenching by the antiglaucoma ophthalmic drugs, Timolol and Pindolol. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(10), 788-792.
- ⁶¹ Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1995). Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2), 663-677.
- ⁶² Santos, H. L., & Daghanli, K. R. (2001). Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29(3), 110-114.

-
- ⁶³ Harris, D.C. (2001) Análisis químico cuantitativo. Editorial Reverté,
- ⁶⁴ Díaz, C. E., León, F., Daza, M. C., & Martínez, F. (2009). Oxidation of methyl linoleate with chemically generated singlet oxygen by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (48), 38-44.
- ⁶⁵ Garcia, N. A. (1994). New trends in photobiology: singlet-molecular-oxygen-mediated photodegradation of aquatic phenolic pollutants. A kinetic and mechanistic overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 22(3), 185-196.
- ⁶⁶ Escalada, J. P., Pajares, A., Gianotti, J., Biasutti, A., Criado, S., Molina, P., ... & García, N. A. (2011). Photosensitized degradation in water of the phenolic pesticides bromoxynil and dichlorophen in the presence of riboflavin, as a model of their natural photodecomposition in the environment. *Journal of hazardous materials*, 186(1), 466-472.
- ⁶⁷ Criado, S., Soltermann, A. T., Marioli, J. M., & Garcia, N. A. (1998). Sensitized photooxidation of di-and tripeptides of tyrosine. *Photochemistry and photobiology*, 68(4), 453-458.
- ⁶⁸ Pazos, M., Andersen, M. L., Medina, I., & Skibsted, L. H. (2007). Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3661-3666.
- ⁶⁹ Ávila, V., Bertolotti, S. G., Criado, S., Pappano, N., Debattista, N., & García, N. A. (2001). Antioxidant properties of natural flavonoids: quenching and generation of singlet molecular oxygen. *International journal of food science & technology*, 36(1), 25-33.
- ⁷⁰ Garcia, N. A. (1994). New trends in photobiology: singlet-molecular-oxygen-mediated photodegradation of aquatic phenolic pollutants. A kinetic and mechanistic overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 22(3), 185-196.
- ⁷¹ Mártire, D. O., Braslavsky, S. E., & García, N. A. (1991). Sensitized photo-oxidation of dihydroxybenzenes and chlorinated derivatives. A kinetic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 61(1), 113-124.
- ⁷² Criado, S., García, N. A., Gutiérrez, M. I., Avila, V., Bertolotti, S. G., & Cuarto, R. (1996). Medium and substitution pattern effects on the action of hydroxyflavones as photoprotectors against singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of fats. *Lipid/Fett*, 98(5), 172-175.
- ⁷³ Cacciari, D., Reynoso, E., Spesia, M. B., Criado, S., & Biasutti, M. A. (2017). Vancomycin-sensitized photooxidation in the presence of the natural pigment vitamin B2: Interaction with excited states and photogenerated ROS. *Redox Report*, 22(4), 166-175.

⁷⁴ Loliger, J., & Saucy, F. (1994). *U.S. Patent No. 5,364,886*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.