

Tesis de Posgrado

Estudio de las propiedades fotofísicas y de reacciones fotosensibilizadas de compuestos purínicos

Murgida, Daniel Horacio

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Murgida, Daniel Horacio. (1997). Estudio de las propiedades fotofísicas y de reacciones fotosensibilizadas de compuestos purínicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2985_Murgida.pdf

Cita tipo Chicago:

Murgida, Daniel Horacio. "Estudio de las propiedades fotofísicas y de reacciones fotosensibilizadas de compuestos purínicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2985_Murgida.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de las Propiedades Fotofísicas y de
Reacciones Fotosensibilizadas de Compuestos
Purínicos**

Autor: Daniel Horacio Murgida

Directora de Tesis: Dra. Rosa Erra Balsells

**Lugar de Trabajo: Departamento de Química Orgánica. Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires.**

Estudio de las Propiedades Fotofísicas y de las Reacciones Fotosensibilizadas de Compuestos Purínicos.

Resumen:

Se estudiaron distintos aspectos de la fotofísica de compuestos de la familia de las purinas entre los que se encuentran la purina y varios de sus derivados con distintos sustituyentes en la posición 6 (metilo, cloro, amino, hidroxilo y metoxi), y dioxipurinas o xantinas (cafeína, teofilina y teobromina). Este estudio incluye la descripción de los espectros de absorción, el estudio de los efectos de matriz y de átomos pesados sobre la luminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) a bajas temperaturas, y el estudio de las desactivaciones no radiativas mediante espectroscopía optoacústica inducida por láser. Por otra parte, se estudiaron las reacciones fotosensibilizadas de las xantinas utilizando benzofenona y Rosa de Bengala como sensibilizadores. En ambos casos se realizaron numerosas experiencias cinéticas empleando técnicas de estado estacionario y con resolución temporal, se identificaron los productos de las reacciones y se realizaron cálculos de modelado molecular entre otras cosas. Los resultados obtenidos permiten proponer que en el primer caso las xantinas desactivan al estado triplete de la benzofenona en forma física y por un proceso de abstracción de hidrógeno (fotooxidación de tipo I). En el segundo caso se determinó que las reacciones proceden mediante un mecanismo de tipo II, siendo el oxígeno singlete el agente oxidante. En este último estudio se incluyó además una trioxipurina (ácido trimetilúrico).

Palabras clave: purinas, xantinas, optoacústica, fotooxidaciones, oxígeno singlete, abstracción de hidrógeno, benzofenona, Rosa de Bengala.



Study of the photophysical properties and of photosensitized reactions of purinic compounds.

Abstract.

Different aspects of the photophysics of purinic compounds were studied. The compounds selected are purine and several purine derivatives with different substituents at position 6 (methyl, chloro, amino, hydroxy and methoxy), and dioxapurines or xanthenes (caffeine, theophylline and theobromine). This study includes the description of absorption spectra, the study of matrix effects and heavy atoms effects on luminescence (fluorescence and phosphorescence) at low temperatures, and the study of non radiative deactivations by laser induced optoacoustic spectroscopy. Besides, photosensitized reactions of xanthenes were studied by using benzophenone and Rose Bengal as sensitizers. In both cases several kinetics experiments were run by using steady state and time resolved methods. Also, reactions products were isolated and identified and molecular modeling calculations were done. The results obtained allow us to propose that in the first case xanthenes quench benzophenone triplet state by a physical process and by hydrogen abstraction (type I photooxidation). In the second case, reactions occur through a type II mechanism, being singlet oxygen the oxidizing agent. In this latter study a trioxapurine (trimethyluric acid) was also included.

Keywords: purines, xanthenes, optoacoustics, photooxidations, singlet oxygen, hydrogen abstraction, benzophenone, Rose Bengal.

Parte del trabajo experimental y de los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a las publicaciones que se mencionan a continuación y a otros dos trabajos cuyos manuscritos se encuentran actualmente en preparación.

“Structure Reactivity Correlation in the Photolysis of Aromatic Nitrogen Organic Compounds.”

R. Erra Balsells, M. C. Biondic, S. M. Bonesi, F. Console and D. H. Murgida.
Ac. Fis. Quim. Org. (1993), 334-356.

“Photoacoustic Determination of Energy Content and Quantum Yields of Formation of Transient States.”

G. M. Bilmes, D. H. Murgida and R. Erra Balsells.
Journal de Physique (1994), 4, 417-420.

“A Photophysical Study Of Purines And Theophylline By Using Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy.”

D. H. Murgida, G. M. Bilmes and R. Erra Balsells.
Photochem. Photobiol. (1996), 64, 777-784.

“New Photocalorimetric References For Uv Excitation.”

D. H. Murgida, R. Erra Balsells and G. M. Bilmes.
Chem. Phys. Lett. (1996), 250, 198-202.

“Benzophenone Photosensitized Reactions of Xanthinic Compounds. A Mechanistic Study.”

D. H. Murgida, P. F. Aramendía and R. Erra Balsells.
Photochem. Photobiol. Trabajo enviado.

*A Velia, mi esposa.
A mis padres y hermanos.*

Agradecimientos:

A la Dra. Rosa Erra Balsells, quien siempre me alentó y apoyó incondicionalmente, deseo agradecerle en primer lugar su calidad humana y en segundo lugar el gran empeño y dedicación con que se abocó a la dirección de este trabajo de tesis.

A mis amigos Darío Certoma, Fernando Serrao y Horacio Palacios quienes siempre alentaron este proyecto.

A mis compañeros del Grupo de Fotoquímica Orgánica: Dra. Miriana Biondic, Dr. Sergio Bonesi, y a nuestro miembro honorario Dr. Juan Bautista Rodríguez, deseo agradecerles su amistad. También deseo agradecer a los miembros más jóvenes del grupo, Lic. Juan Vuolo, Lic. Olga Tarzi, Lic. Sara Luluaga, Sr. Martín Orcoyen y Srta. Laura Talarico los buenos momentos compartidos.

Al Lic. Juan Vuolo por su valiosa colaboración.

Al Dr. Juan B. Rodríguez por la realización de los primeros espectros de RMN cuando yo todavía no era operador.

A todos los miembros del Departamento de Química Orgánica que de una u otra manera contribuyeron a la realización de esta tesis.

Al Sr. Jorge Aznarez y a la Lic. Mery Riveros por su siempre buena disposición.

A Jenck S.A., especialmente a su presidente Lic. Jorge Grinstein y a la Lic. Velia Vinent por haberme facilitado desinteresadamente el espectrofotómetro Shimadzu.

Al Dr. Eduardo Gros y a la Dra. Alicia Seldes por haberme facilitado sus equipos de cromatografía gaseosa.

A la Dra. Mabel Tudino y al Dr. Osvaldo Trócoli quienes desinteresadamente me dieron libre acceso al fluorómetro y al equipo de HPLC.

Al Dr. Gabriel M. Bilmes, con quien establecimos una fructífera colaboración, por su entusiasmo y por haber puesto a mi disposición su laboratorio para la realización de las experiencias de espectroscopia optoacústica.

Al Dr. Pedro F. Aramendía, por haber puesto a mi disposición sus equipos de *láser flash fotólisis* y de detección de fosforescencia de oxígeno singulete, por las valiosas discusiones científicas y por su buena disposición.

A todos los miembros del Grupo de Fotoquímica del INQUIMAE quienes en incontables oportunidades me facilitaron revistas, filtros ópticos y otros accesorios.

Al Dr. Ernesto Calvo por permitirme realizar en su laboratorio las experiencias de voltametría cíclica.

A todos aquellos que no nombro porque la lista sería interminable y que de alguna forma contribuyeron para que este proyecto se hiciera realidad.

Índice.

Introducción.	1
Capítulo 1: Espectroscopía electrónica de absorción y de emisión de compuestos purínicos y xantínicos.	6
1.1 Introducción.	7
1.1.1 Aspectos generales.	7
1.1.2 Espectroscopía electrónica de purinas y xantinas. Antecedentes.	7
1.2 Resultados y discusión.	14
1.3 Resumen y conclusiones.	36
1.4 Sección experimental.	38
1.5 Referencias.	40
Capítulo 2: Estudio de las desactivaciones no radiativas de compuestos purínicos y xantínicos por espectroscopía optoacústica inducida por láser.	43
2.1 Introducción.	44
2.1.1 Aspectos generales .	44
2.1.2 Fundamentos teórico-prácticos de la técnica LIOAS.	46
2.2 Resultados y discusión.	54
2.2.1 Evaluación de la 2-hidroxibenzofenona como posible referencia calorimétrica.	54
2.2.2 Respuesta optoacústica de purinas y xantinas utilizando bajas fluencias de excitación.	60
2.2.3 Respuesta optoacústica de purinas y xantinas utilizando altas fluencias de excitación.	77
2.3 Resumen y conclusiones.	89
2.4 Sección experimental.	91

2.4.1 Reactivos y solventes.	91
2.4.2 Controles de estabilidad fotoquímica.	91
2.4.3 Medidas optoacústicas.	92
2.4.4 Determinaciones de fluorescencia y fosforescencia.	94
2.4.5 Fosforescencia de oxígeno singulete. Detección estacionaria.	94
2.4.6 Modelado molecular.	96
2.5 Referencias.	97

Capítulo 3: Reacciones de xantinas fotosensibilizadas con

benzofenona.	106
3.1 Introducción	107
3.2 Resultados y discusión.	111
3.2.1 Mecanismo de la reacción.	111
3.2.2 Transferencia de energía triplete-triplete.	127
3.2.3 Modelado molecular y otras evidencias mecanísticas.	128
3.2.4 Abstracción de hidrógeno vs. transferencia electrónica.	132
3.2.5 Formación de especies transientes absorbentes (LAT).	138
3.3 Resumen y conclusiones.	142
3.4 Sección experimental.	143
3.4.1 Reactivos y solventes.	143
3.4.2 Irradiaciones preparativas.	144
3.4.3 Aislamiento y caracterización de los fotoproductos.	144
3.4.4 Síntesis de compuestos.	147
3.4.5 Mediciones cinéticas en estado estacionario.	147
3.4.6 Mediciones realizadas con resolución temporal.	152

3.4.7 Potenciales de oxidación.	153
3.4.8 Determinaciones de energías de los estados triplete.	154
3.4.9 Cálculos semiempíricos.	154
3.5 Referencias.	155

Capítulo 4: Reacciones de xantinas fotosensibilizadas con Rosa de

Bengala.	161
4.1 Introducción.	162
4.1.1 Aspectos generales.	162
4.1.2 Antecedentes sobre fotooxidaciones de purinas.	163
4.2 Resultados y discusión.	185
4.2.1 Fotooxidaciones de tipo II. Evidencias mecanísticas.	185
4.2.2 Mecanismo de reacción y determinación de constantes cinéticas.	195
4.2.3 Efectos del solvente y estados de transición.	205
4.2.4 Identificación de los productos de reacción y sus posibles mecanismos de formación.	224
4.3 Resumen y conclusiones.	235
4.4 Sección experimental.	237
4.4.1 Reactivos y solventes.	237
4.4.2 Experiencias realizadas en estado estacionario.	237
4.4.3 Experiencias de láser flash fotólisis.	241
4.4.4 Fosforescencia infrarroja de $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo.	241
4.5 Referencias.	244

Resumen y conclusiones generales.	251
--	-----

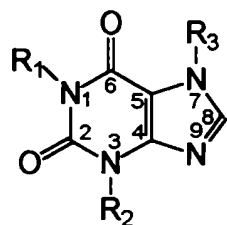
Abreviaturas y símbolos más utilizados.

LIOAS	Espectroscopía optoacústica inducida por láser.
ϕ_f	Rendimiento cuántico de fluorescencia.
α	Fracción de la energía absorbida que se libera como calor rápido.
τ_a	Tiempo de tránsito acústico.
τ_a'	Tiempo de tránsito acústico efectivo.
ϕ_{ci}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas.
CR	Referencia calorimétrica.
F	Fluencia de excitación.
A	Absorbancia.
PZT	Detector piezoeléctrico de Pb-Zr-Ti.
PVF ₂	Detector de film de difluoruro de polivinilideno.
AS	Solución saturada con aire.
NS	Solución saturada con nitrógeno.
H	Amplitud de la señal optoacústica.
E _T	Energía del estado triplete.
BZ	Benzofenona.
XH	Xantina u oxopurina.
CF	Cafeína.
TB	Teobromina.
TF	Teofilina.
RB	Rosa de Bengala.
ccd	Cromatografía en capa delgada.
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución.
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón.
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C.
CG	Cromatografía gaseosa.
CG-EM	Cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas.
EM(IE)	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
EM(FAB)	Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos.
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singulete.
Φ_{ox}	Rendimiento cuántico de fotooxidación.
K _Q	Constante global de desactivación del estado triplete de la BZ.
K _q	Constante global de desactivación del oxígeno singulete.
K _r	Constante de reacción.

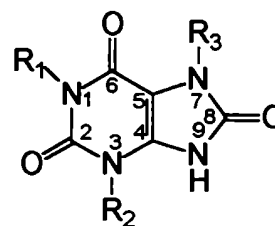
Introducción

Introducción.

En el presente trabajo de tesis se han estudiado diferentes aspectos de la fotofísica y la fotoquímica de diversos componentes de la familia de las purinas entre los que se incluyen la purina misma y varios de sus derivados con distintos sustituyentes en la posición 6, dioxopurinas o xantinas tales como la cafeína la teofilina y la teobromina y una trioxopurina como es el ácido trimetilúrico (ver esquema).



$R_1=R_2=R_3$; Cafeína
 $R_1=R_2=CH_3$, $R_3=H$; Teofilina
 $R_1=H$, $R_2=R_3=CH_3$, Teobromina



Acido trimetilúrico



$R=H$, Purina
 $R=CH_3$, 6-Metilpurina
 $R=Cl$, 6-Cloropurina

$R=NH_2$, 6-Aminopurina (Adenina)
 $R=CH_3O$, 6-Metoxipurina
 $R=OH$, 6-Hidroxipurina (Hipoxantina)

Esta familia de compuestos, por tratarse de análogos estructurales de las bases purínicas presentes en los ácidos nucleicos, constituyen modelos simples para el estudio de las reacciones fotoquímicas de los mismos. Si bien la reactividad fotoquímica de las sustancias estudiadas en esta tesis no es estrictamente extrapolable a los procesos que puedan experimentar los ácidos nucleicos *in vivo*, su adecuado conocimiento es un punto de partida necesario antes de pasar al estudio de sistemas más complejos.

Por otra parte, algunos de los sustratos estudiados en esta tesis, como la cafeína, la teofilina y la teobromina, se encuentran presentes en numerosos tejidos vegetales naturalmente expuestos a la radiación ultravioleta-visible, y son ampliamente utilizados en la formulación de medicamentos y alimentos.

Es sabido desde hace algunos años que la irradiación de los ácidos nucleicos con longitudes de onda cortas ($\lambda < 300$ nm) afecta fundamentalmente a las bases pirimidínicas capaces de experimentar reacciones de fotodimerización, mientras que las bases purínicas resultan particularmente estables. Por otra parte, existen en la literatura numerosos trabajos donde se estudian las propiedades luminiscentes de las purinas, y si bien los resultados informados en algunos casos son algo confusos y contradictorios, es un hecho aceptado que las purinas y las xantinas presentan rendimientos cuánticos de emisión fluorescente extremadamente bajos. Sin embargo, pese a la notoria falta de reactividad fotoquímica y a la escasa emisión fluorescente de estos compuestos, no existían en la literatura estudios exhaustivos sobre las vías de desactivación no radiativas de los estados electrónicamente excitados de los mismos.

Por otra parte, si bien esta familia de compuestos presenta una alta estabilidad fotoquímica frente a la irradiación directa, pueden participar en procesos químicos fotoinducidos por sensibilizadores, los que en medios biológicos pueden ser tanto endógenos como exógenos. Este tipo de reacciones fotosensibilizadas pueden ocurrir básicamente por dos tipos de mecanismos: (a) mecanismos de tipo I, que involucran como proceso primario a la interacción directa entre el sensibilizador en su estado electrónicamente excitado y el sustrato para dar origen a un proceso de transferencia electrónica o de abstracción de hidrógeno, y (b) mecanismos de tipo II que implican la interacción inicial del sensibilizador electrónicamente excitado con el oxígeno molecular generando el anión radical superóxido u oxígeno electrónicamente excitado singulete, especies que luego pueden reaccionar con el sustrato.

Si bien para algunas bases purínicas este tipo de procesos fotosensibilizados han sido estudiados recientemente por varios grupos de investigación, los antecedentes bibliográficos sobre este tema para las xantinas son muy escasos y no incluyen ningún estudio mecanístico riguroso.

En virtud de estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo de tesis consistieron en estudiar distintos aspectos del comportamiento fotofísico de las purinas y xantinas tales como los procesos de desactivación radiativos y no radiativos, así como las reacciones fotosensibilizadas de tipo I y II de las xantinas, empleando respectivamente a la benzofenona y al Rosa de Bengala como sensibilizadores.

Los resultados obtenidos han sido agrupados para su presentación en cuatro capítulos independientes, cada uno de los cuales cuenta con una sección introductoria donde se detallan y comentan los antecedentes bibliográficos relacionados con cada tema, una sección de resultados y discusión, una sección experimental y la bibliografía pertinente. Así, en el capítulo 1 se presentan distintos aspectos de la espectroscopía electrónica de absorción y emisión (fluorescencia y fosforescencia) de las purinas y xantinas. En el capítulo 2 se discuten las vías de desactivación no radiativas de estos mismos sustratos estudiadas por espectroscopía optoacústica inducida por láser. Finalmente, en los capítulos 3 y 4 se presentan respectivamente las reacciones de fotooxidación de tipos I y II de las xantinas.

Capítulo 1

Espectroscopía electrónica de absorción y de emisión de compuestos purínicos y xantínicos



1.1 Introducción.

1.1.1 Aspectos generales.

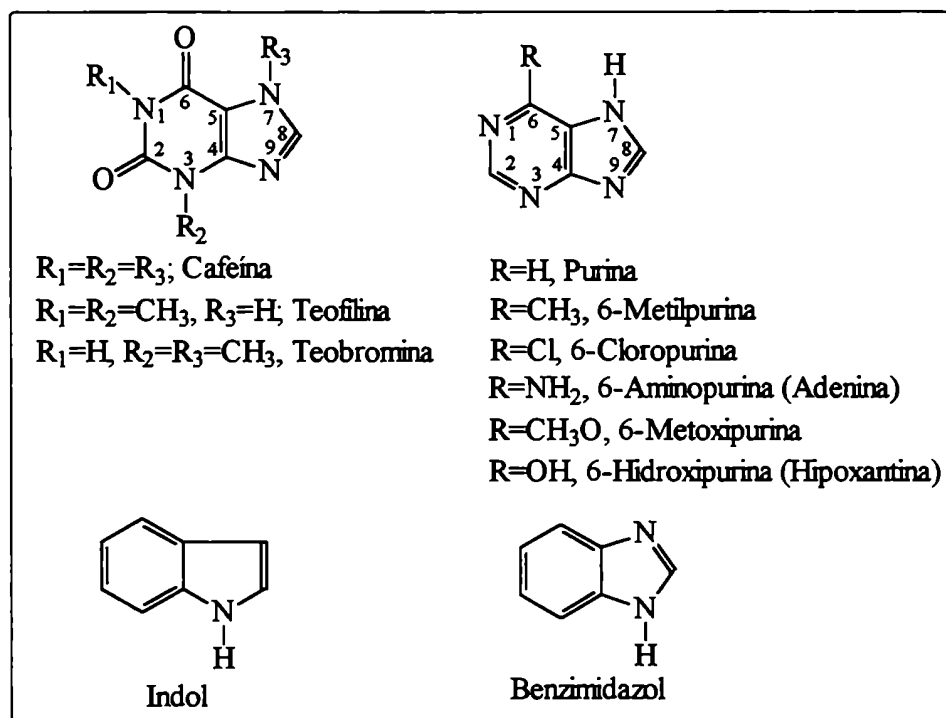
La realización de un estudio fotoquímico requiere, en su primera etapa, el conocimiento de los aspectos fotofísicos de los sustratos de interés. Esto incluye el estudio de los espectros electrónicos de absorción y de las formas de desactivación de los estados electrónicos excitados tanto radiativas (fluorescencia y fosforescencia) como no radiativas (conversión interna, cruce intersistemas, etc).

En este primer capítulo se describirán algunos aspectos de la espectroscopía electrónica de absorción y emisión de derivados xantínicos (teofilina, cafeína y teobromina), purínicos (purina, 6-metilpurina, 6-cloropurina, 6-metoxipurina, 6-hidroxipurina o hipoxantina y 6-aminopurina o adenina) y de otros compuestos estructuralmente relacionados (indol y benzimidazol) que fueron seleccionados por tratarse de eficientes emisores fluorescentes a temperatura ambiente (ver esquema 1).

1.1.2 Espectroscopía electrónica de purinas y xantinas. Antecedentes.

En 1966 Drobnik y Augenstein¹ estudiaron los espectros de absorción y emisión fluorescente de la purina a temperatura ambiente. Estos autores prácticamente no observaron variaciones en los espectros de absorción realizados en diferentes solventes próticos (metanol, agua, glicerol), y sólo observaron diferencias importantes cuando utilizaron metilciclohexano como solvente. En este

medio se distingue una nueva banda cuyo máximo se encuentra a 242 nm, la que no se observa en el resto de los solventes.



Esquema 1

Cabe señalar que la fluorescencia resultó ser muy débil en todos los solventes estudiados ($\phi_f \cong 10^{-3}$). En este mismo trabajo los autores describen los espectros de fosforescencia de la purina en solución a 77 K y también como sólido (polvos) a temperatura ambiente. La conclusión más importante de este trabajo es que el triplete emisor sería de tipo $\pi-\pi^*$. Cuando el estado electrónicamente excitado singlete de más baja energía es de tipo $n-\pi^*$, dado que éste tiene un tiempo de vida largo, el cruce intersistemas al estado triplete $\pi-\pi^*$ de más baja energía resulta eficiente. Cuando el singlete de menor energía es un estado de

naturaleza π - π^* de menor tiempo de vida que el anterior, el cruce intersistemas resulta menos eficiente. Por lo tanto, de acuerdo con sus datos experimentales, los autores proponen que el estado excitado singulete de menor energía para la purina es de naturaleza n - π^* en metilciclohexano y π - π^* en solventes polares como metanol, agua, etc.

En un par de publicaciones posteriores^{2,3} estos mismos autores estudiaron los espectros de absorción y emisión de purinas sustituidas, llegando a la conclusión de que el comportamiento espectroscópico de la purina está gobernado por el estado singulete n - π^* de más baja energía. La sustitución en C-6 con un grupo amino dador de electrones disminuiría la energía de los estados singulete π - π^* y aumentaría la de los correspondientes n - π^* . Sin embargo, de acuerdo a los estudios de fosforescencia, el estado triplete de menor energía seguiría teniendo configuración π - π^* independientemente del tipo de sustitución. Por lo tanto el cruce intersistemas resulta menos eficiente ya que este proceso es poco probable entre estados de idéntica configuración. De acuerdo a estos resultado los autores postulan que las purinas sustituidas con grupos dadores de electrones, como por ejemplo la adenina, tienen un estado singulete de más baja energía de configuración π - π^* aún en solventes tan poco polares como el metilciclohexano.

También en 1966, Lonworth y col.⁴ describieron el efecto del pH sobre los espectros de fluorescencia y de fosforescencia a 77 K de la adenina, la adenosina, la guanina y la guanosina (ver fórmulas respectivas en el esquema 2, cap. 3, pág. 109).

En 1971 Daniels y Hauswirth⁵ describieron la fluorescencia de la adenina y de la guanina en soluciones acuosas a temperatura ambiente, informando rendimientos cuánticos de fluorescencia de $2,6 \times 10^{-4}$ y $3,0 \times 10^{-4}$ respectivamente.

En 1973 Aaron y Winefordner⁶ determinaron las constantes de equilibrio para la protonación y deprotonación de la purina y algunos de sus derivados en sus estados excitados triplete. Estas determinaciones se realizaron haciendo uso del ciclo de Förster y de los espectros de fosforescencia obtenidos a 77 K.

En 1976 Smith⁷ estudió el estado singulete de más baja energía de la purina en matrices gaseosas inertes. Este autor logró observar la banda correspondiente a la transición $n-\pi^*$ entre 290 y 300 nm con buena resolución vibracional. Es importante destacar que en solución esta banda no se detecta debido al total solapamiento que presenta la misma con la banda $\pi-\pi^*$ centrada a 260 nm, la que es mucho más intensa y ancha y además de menor energía que la primera en solventes polares.

En 1977 Moller y Nishimura⁸ confirmaron la naturaleza $\pi-\pi^*$ del estado triplete de menor energía de las purinas.

En 1979 Gibson y Turnbull⁹ describieron los espectros de absorción y de fluorescencia a temperatura ambiente y de fosforescencia a bajas temperaturas de la adenina, la adenosina y sus fosfatos en etanol. Según los autores la emisión fluorescente a temperatura ambiente en todos los casos estaría asociada a una transición $\pi-\pi^*$ con valores de rendimientos cuánticos de emisión de aproximadamente 10^{-4} . Si bien estos autores observaron un corrimiento de Stokes

muy importante, no dieron ninguna explicación satisfactoria a esta observación y tampoco informaron acerca de los espectros de excitación correspondientes.

En 1980 Wilson y Callis¹⁰ estudiaron el tautomerismo $7 \leftrightarrow 9$ de la adenina y de la guanina por fluorescencia a bajas temperaturas (140-165 K), en vidrios de glicol-agua. De esta manera, determinaron que en ambos casos las constantes de equilibrio son muy bajas, siendo los tautómeros con los átomos de hidrógeno en las posiciones 9 las formas mayoritarias. Sin embargo la emisión fluorescente de ambas moléculas provendría en realidad de los tautómeros N₇-H menos abundantes.

También en 1980, Tohara y Hirakawa¹¹ demostraron mediante estudios de absorción y excitación a 77 K en etanol, que la banda de absorción de la adenina centrada a 260 nm se debe en realidad a dos transiciones π - π^* solapadas, una transición fuerte I y una transición media II, perpendicularmente polarizada una respecto de la otra. Además confirmaron la existencia de una tercera transición π - π^* muy débil, a aproximadamente 220 nm, con polarización aproximadamente paralela a la transición I.

En 1982 Knighton y col.¹² realizaron un estudio de la anisotropía de fluorescencia de la adenina y de varios de sus derivados a temperatura ambiente y a pH ácido. La conclusión más importante de este trabajo es que confirmó la propuesta realizada por los mismos autores en 1980, es decir, que la fluorescencia proviene del tautómero N₇-H. Esta propuesta en realidad ya había sido realizada por Börrensén¹³ en 1963, aunque no había podido ser demostrada en forma rigurosa.

En 1984 Parkanyi y col.¹⁴ estudiaron el efecto del pH sobre los espectros de absorción y emisión fluorescente a temperatura ambiente y de fosforescencia a 77 K de varias purinas y xantinas. En base a estos estudios determinaron las constantes de ionización de los estados excitados singulete y triplete. La tendencia general observada, aunque hay algunas excepciones, es que tanto la basicidad como la acidez de estos compuestos es mayor en los estados excitados singulete y triplete que en el estado fundamental.

En 1987 Andino y col.¹⁵ describieron el efecto de pH sobre los espectros de absorción y de emisión fluorescente de la cafeína y de la teofilina en metanol a temperatura ambiente y asignaron la banda de absorción centrada a 270 nm a una transición $\pi-\pi^*$. Si bien en este trabajo se describen los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente, no se informan los correspondientes rendimientos cuánticos de emisión. Por otra parte es importante destacar que los autores obtienen espectros de excitación fluorescente llamativamente diferentes a los de absorción y que además no encuentran ninguna correlación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de la xantina. Este tipo de resultados no discutidos adecuadamente toman algo dudosas las conclusiones de los autores. En este mismo trabajo se estudian los espectros de fosforescencia en metanol a 85 K y se sugiere que el triplete emisor es de naturaleza $\pi-\pi^*$. Sin embargo, como según estos autores el singulete de menor energía es también de tipo $\pi-\pi^*$, postulan la existencia de un estado triplete de mayor energía de tipo $n-\pi^*$ que sería el responsable del cruce intersistemas y que luego relajaría al estado triplete emisor $\pi-$

π^* de menor energía. Los autores hacen esta propuesta para justificar los que ellos denominan una “fuerte” emisión de fosforescencia, aunque no informan el valor del rendimiento cuántico de emisión. En este mismo trabajo se estudia el efecto del agregado de KI sobre la intensidad de fosforescencia. En estas experiencias observan un incremento en la intensidad de las señales que lo atribuyen a un efecto de átomo pesado, aunque en ningún momento analizan el efecto de la presencia de esta sal en el medio sobre la fluorescencia.

En 1988 Gaye y Aaron¹⁶ estudiaron el efecto del agregado de sales de átomos pesados (Γ , T^{1+} , Pb^{2+} y Sm^{3+}) sobre la fosforescencia de xantinas y purinas a bajas temperaturas y a temperatura ambiente, fijadas sobre papel. En todos los casos observaron incrementos de las señales a medida que se aumentaba la concentración de las sales. Estos incrementos resultaron ser mayores a temperatura ambiente que a 77 K.

Un año después estos mismos autores estudiaron el efecto del pH sobre la fosforescencia, a temperatura ambiente, de purinas, xantinas y pirimidinas fijadas también sobre papel.¹⁷ Si bien no observaron cambios en las posiciones de los máximos de los espectros, pudieron detectar ciertas variaciones no muy marcadas y de difícil racionalización en las intensidades de las señales.

En 1990 Gaye y col.¹⁸ completaron este estudio analizando la influencia combinada de la matriz o soporte (papel, sílica y alúmina) y de átomos pesados (Γ , T^{1+} , Pb^{2+} y Sm^{3+}) sobre la fosforescencia a temperatura ambiente de diferentes purinas y xantinas.

1.2 Resultados y discusión.

En las figuras 1 y 2 se muestran a modo de ejemplo los espectros de absorción de algunos de los sustratos estudiados, utilizando etanol como solvente. En ningún caso se observan modificaciones importantes de los espectros al utilizar otros solventes polares como metanol, agua o acetonitrilo, así como tampoco se observaron modificaciones importantes en las formas y posiciones de los máximos de los mismos al variar las concentraciones de los distintos sustratos.

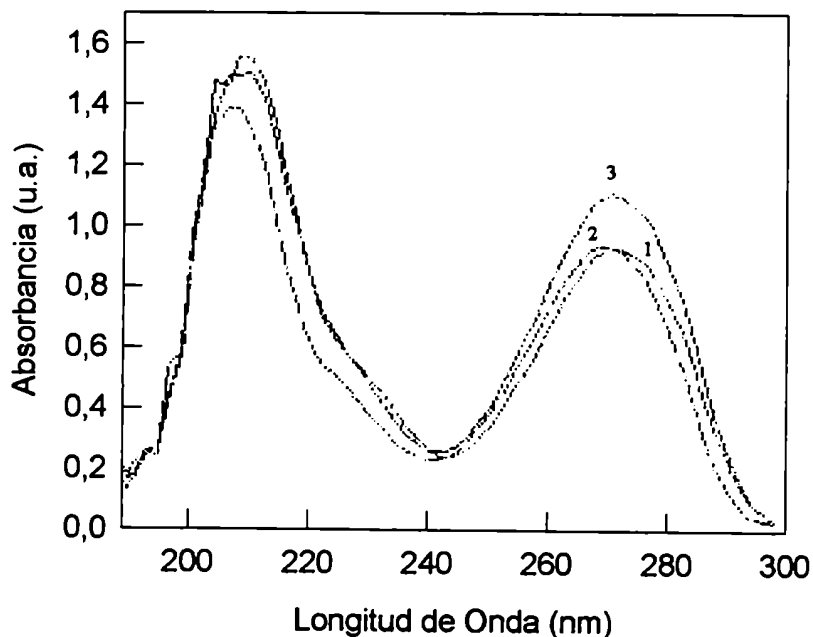


Figura 1. Espectros de absorción de soluciones etanólicas de concentraciones aproximadamente 10^{-4} mol dm^{-3} de: (1) teofilina, (2) cafeína, (3) teobromina. Referencia: etanol.

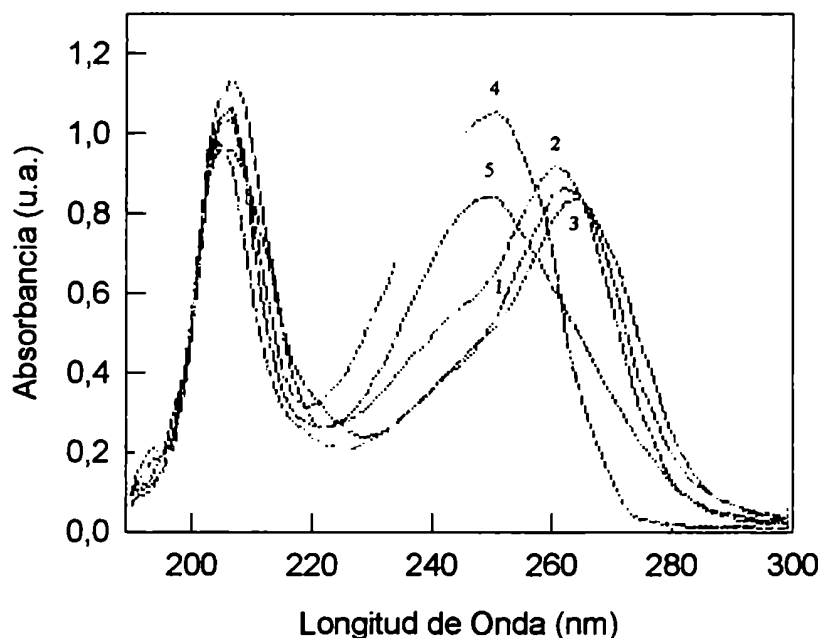


Figura 2. Espectros de absorción de soluciones etanólicas de concentraciones aproximadamente 10^{-4} mol dm^{-3} de: (1) purina, (2) 6-metilpurina, (3) 6-cloropurina, (4) 6-metoxipurina, (5) 6-hidroxipurina. Referencia : etanol.

En la tabla 1 se detallan los máximos de absorción correspondientes a la llamada banda X_1 , debida a transiciones $\pi-\pi^*$, y sus correspondientes absorptividades molares. Los datos de esta tabla fueron obtenidos en etanol, aunque como se menciona anteriormente estos valores no se modifican significativamente al cambiar el solvente.

Los derivados purínicos y xantínicos estudiados no mostraron señales definidas de fluorescencia a temperatura ambiente ni en etanol, ni en agua ni en acetonitrilo. Utilizando naftaleno como referencia de fluorescencia se estableció que para estos sustratos los rendimientos cuánticos de emisión fluorescente (ϕ_f) resultan menores que 10^{-3} .

Tabla 1. Máximos de absorción y logaritmos de las absorptividades molares de purinas y xantinas en etanol.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	log ϵ
Cafeína	272	3,98
Teofilina	270	3,94
Teobromina	272	3,92
Purina	263	3,88
6-Aminopurina (Adenina)	260	3,95
6-Metilpurina	261	3,93
6-Cloropurina	266	3,93
6-Metoxipurina	266	3,91
6-Hidroxipurina	250	3,94

Frente a estos resultados se decidió realizar un estudio de las propiedades luminiscentes de estos compuestos a bajas temperaturas (77 K).

Debido a que durante las mediciones a 77 K se produce el congelamiento del solvente, es necesario tener en cuenta la estructura de la matriz que se forma, ya que esto puede influir sobre las intensidades de las señales de emisión. Por lo tanto este estudio se inició intentando optimizar la composición de las mezclas de solventes a utilizar.

Cuando se registraron los espectros de fluorescencia y fosforescencia a 77 K de derivados xantínicos en dos solventes de polaridad marcadamente diferente como etanol y EPA (éter etílico : isopentano : etanol, 5 : 5 : 2), se obtuvieron espectros similares en cuanto a la posición de los máximos de emisión y la dispersión de las medidas, aunque utilizando EPA se obtiene una mayor resolución vibracional en los espectros de fluorescencia (ver figura 3).

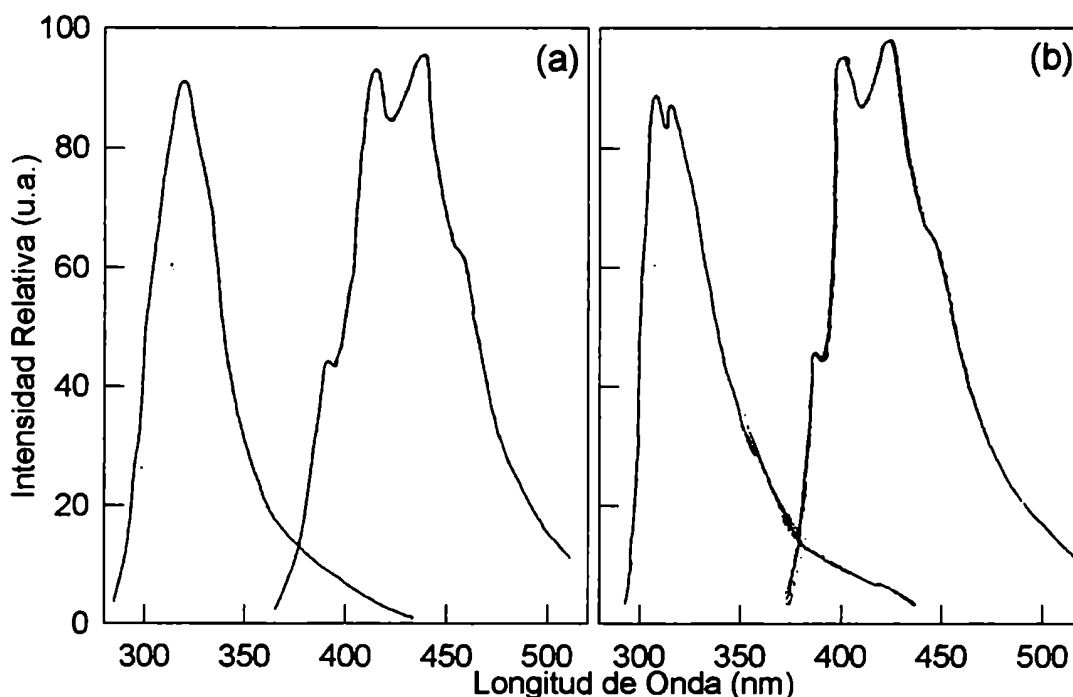


Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia y fosforescencia de soluciones de teofilina 10^{-5} mol dm^{-3} a 77 K en (a) etanol y (b) EPA (éter etílico: isopentano : etanol, 5 : 5 : 2). $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms.

Sin embargo, debido a la baja solubilidad de las xantinas y purinas en EPA no fue posible utilizar esta matriz en forma general.

En la tabla 2 se presentan los máximos de los espectros de emisión de fluorescencia y fosforescencia para los distintos compuestos estudiados registrados en matrices de etanol, a 77 K. Para las xantinas (cafeína teofilina y teobromina) y para la adenina se pudieron registrar ambos espectros. Para el resto de las purinas (purina, 6-metilpurina, 6-cloropurina y 6-hidroxipurina) la emisión fluorescente resulta demasiado débil aún a 77 K obteniéndose relaciones señal-ruido muy bajas, por lo que en la tabla 2 sólo se informan los máximos de fosforescencia.

Tabla 2. Máximos de emisión fluorescente y fosforescente de xantinas y purinas en etanol a 77.

Compuesto	Fluorescencia ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)	Fosforescencia ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)
Cafeína	318	399; 422; 445; 468 (h)
Teofilina	306	389; 409; 430; 445
Teobromina	308	391; 412; 435; 455 (h)
Purina	---	365; 380; 401; 415; 423
6-Aminopurina (Adenina)	296; 308	390 (h); 410 (h); 435
6-Metilpurina	---	367; 385; 400; 421; 440 (h)
6-Cloropurina	---	383 (h); 414; 428; 450 (h)
6-Metoxipurina	---	360(h); 420
6-Hidroxipurina	---	415

Cuando se utilizan mezclas etanol - agua, las intensidades relativas de fluorescencia y fosforescencia presentan una marcada dependencia con la composición del solvente. Como puede verse en la figura 4 para la teofilina (el resto de las xantinas presentan el mismo comportamiento) la intensidad de fluorescencia aumenta considerablemente cuando a la solución acuosa se le agregan cantidades variables de etanol hasta aproximadamente 35 % (v/v). Cuando el contenido de etanol es de 35 a 70 % (v/v) la intensidad de fluorescencia se mantiene aproximadamente constante y para valores superiores a 70% se observa un descenso en la intensidad de las señales.

Este resultado podría explicarse en base a la propuesta que Lukasiewicz y col.¹⁹ hicieron al observar este tipo de comportamiento con otra familia de sustratos, utilizando matrices de metanol-agua de composición variable. Según estos autores, la matriz sólida de agua pura se muestra severamente resquebrajada y casi transparente. La adición de pequeñas cantidades de alcohol produce una matriz opaca. En la zona del *plateau* la matriz es totalmente nevada o policristalina, y luego al seguir agregando alcohol a la mezcla, se vuelve a obtener una matriz transparente resquebrajada. La reflexión difusa del haz de excitación incidente dentro de la matriz policristalina produciría un *scattering* múltiple en los bordes de las partículas individuales y aumentaría la probabilidad de absorción incrementando por lo tanto la intensidad de emisión.

Sin embargo, este argumento que explicaría adecuadamente la variación observada para la emisión fluorescente sólo podría considerarse válido si la intensidad de fosforescencia siguiera el mismo tipo de comportamiento.

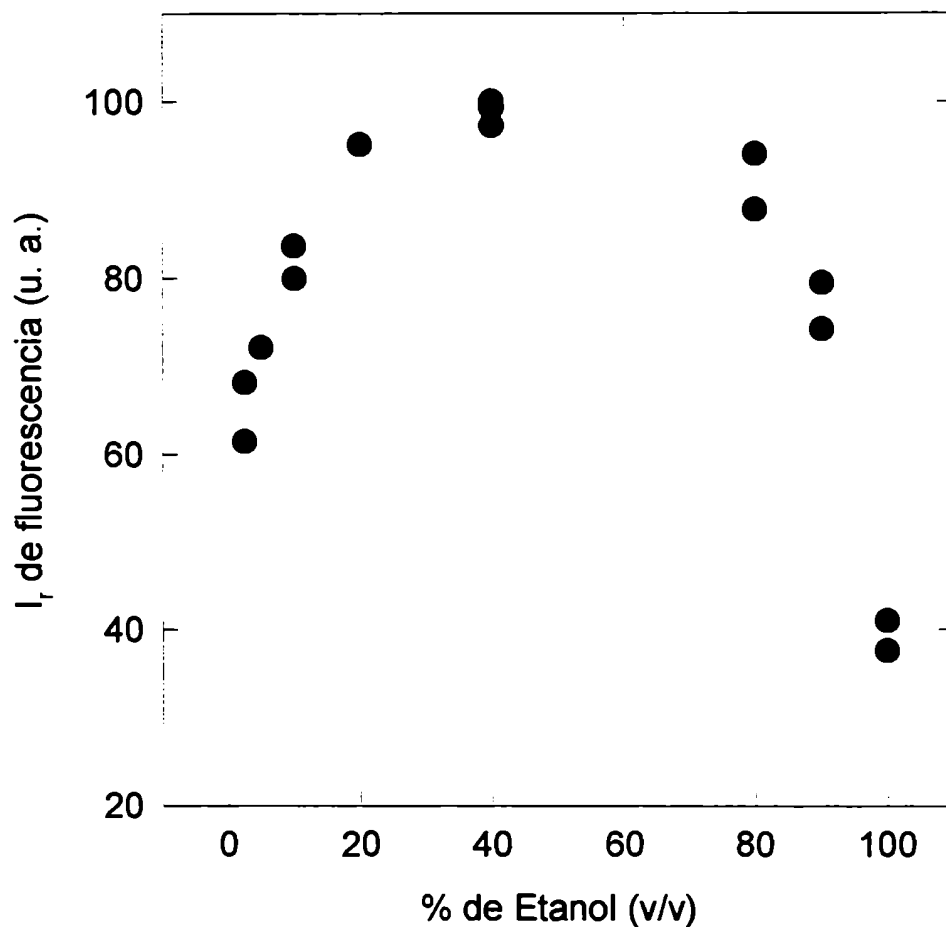


Figura 4. Intensidad relativa de fluorescencia a 310 nm para soluciones de teofilina 10^{-5} mol dm^{-3} en mezclas de etanol - agua, en función del contenido de alcohol. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Velocidad de barrido = 20 nm / min. $T = 77$ K.

Como puede verse en la figura 5, la fosforescencia tiene un comportamiento totalmente diferente. La presencia del etanol en este caso produce una abrupta disminución de la intensidad de emisión cuando se agrega en pequeñas cantidades

(< 10%, v/v). Si se sigue agregando alcohol al sistema la intensidad de fosforescencia continúa disminuyendo, pero con una pendiente mucho menor.

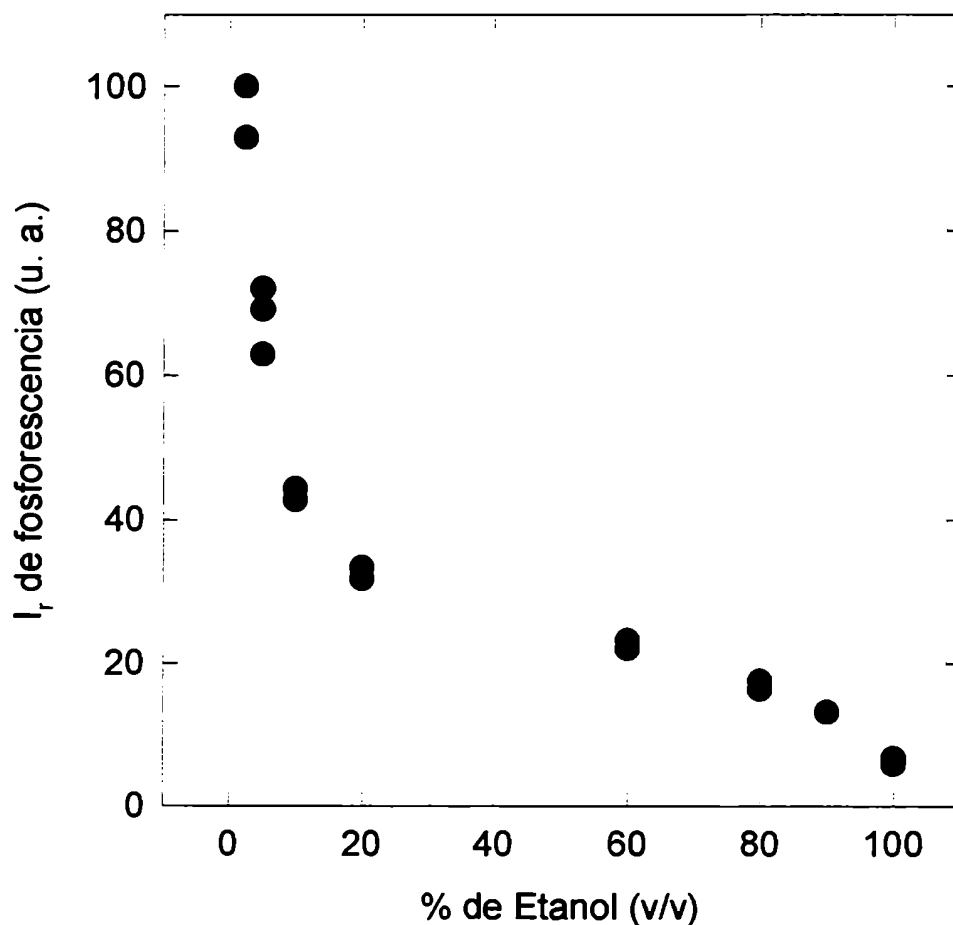


Figura 5. Intensidad relativa de fosforescencia a 430 nm para soluciones de teofilina 10^{-5} mol dm^{-3} en mezclas de etanol - agua en función del contenido de alcohol. $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

Como se explicó en la sección 1.1.2 (introducción), la banda del espectro de absorción de este tipo de sustancias cuyo máximo se encuentra aproximadamente a 270 nm, denominada banda X_1 , es debida a transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$. Sin embargo, en solventes de muy baja polaridad se ha observado una banda de muy débil intensidad situada a la derecha de la banda X_1 , la que correspondería a una transición $n-\pi^*$. Esto significa que los estados electrónicamente excitados singulete de mas baja energía de tipo $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ se encuentran muy próximos en energía, y por lo tanto cuanto mayor sea la polaridad del solvente mayor será el carácter $\pi-\pi^*$ del estado singulete de menor energía. Teniendo en cuenta que, como se explicó en la sección 1.1, el estado triplete de menor energía siempre es de tipo $\pi-\pi^*$ independientemente del solvente, el descenso de la polaridad del medio por agregado de etanol favorecería el cruce intersistemas, debiéndose observar en ese caso un incremento de las intensidades relativas de fosforescencia y un descenso en las intensidades relativas de fluorescencia. Si embargo, tanto los espectros de absorción como de emisión resultan insensibles, en cuanto a la forma y posición de los máximos, al cambio de polaridad tan sutil que representa pasar de etanol a agua. Por lo tanto, la naturaleza del estado singulete de menor energía seguiría siendo eminentemente de tipo $\pi-\pi^*$ en ambos solventes.

Como es sabido, el cruce intersistemas entre estados de idéntica configuración es un proceso muy poco probable, de manera que dicho cruce, como propusieron Andino y col.¹⁵ debe ocurrir entre el estado singulete excitado de menor energía $\pi-\pi^*$ y un estado triplete T_n de mayor energía que el T_1 y de

naturaleza $n-\pi^*$. Si esto fuera así, y este triplete T_n fuera suficientemente sensible a la polaridad del solvente como para disminuir su energía al aumentar la concentración de etanol, debería observarse un incremento de la intensidad de la fosforescencia a expensas de una disminución de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de etanol.

Estos argumentos muestran que el comportamiento observado no puede ser atribuido simplemente a cambios en la naturaleza de los estados emisores.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que la solubilidad del oxígeno en etanol es aproximadamente un orden de concentración superior a su valor en agua. Como es sabido, y como se discute en el capítulo 2 del presente trabajo, el oxígeno es un muy eficiente desactivante de estados triplete. Podría ocurrir entonces que el aumento de la intensidad de fluorescencia observado fuera consecuencia de los efectos de matriz explicados anteriormente, y que para el caso de la fosforescencia estos efectos se vieran superados por la desactivación de los tripletes emisores por parte del oxígeno disuelto.

Con el objeto de estudiar el efecto de átomos pesados sobre la luminiscencia de estos compuestos, se registraron los espectros de fluorescencia y fosforescencia de soluciones etanólicas de xantinas y purinas, en presencia de cantidades variables de sales inorgánicas a 77 K.

De las distintas sales estudiadas, la familia KX ($X = Cl, Br, I$) mostró un comportamiento interesante. Si bien con los tres haluros de potasio se observó un aumento de las intensidades relativas de fluorescencia y fosforescencia de la teofilina, cafeína y teobromina al incrementar la concentración de la sal, los

incrementos no fueron siempre de la misma magnitud. Así, para el KCl, el efecto sobre la fluorescencia es el mismo que sobre la fosforescencia. Para el KBr en cambio, el incremento observado en la intensidad de fosforescencia al aumentar la concentración de la sal es mayor que el observado para la fluorescencia (figura 6).

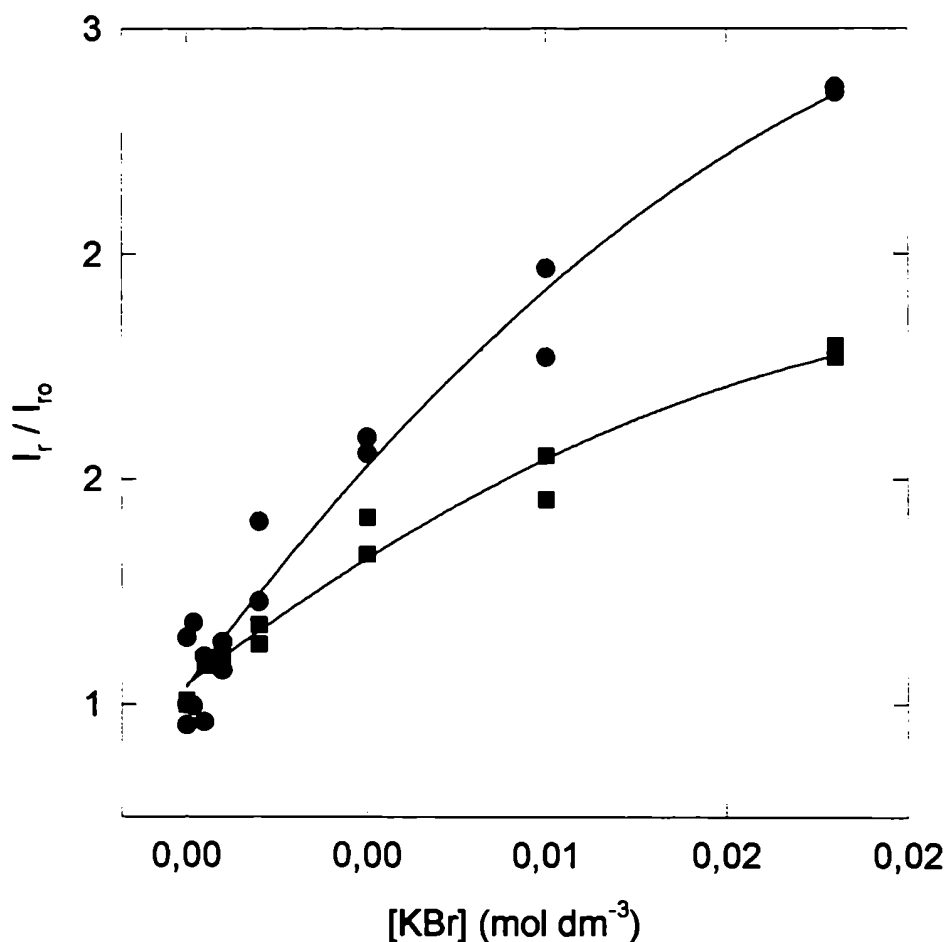


Figura 6. Intensidades relativas de emisión normalizadas de soluciones etanólicas de teofilina 10^{-5} mol dm⁻³ en función de la concentración del KBr. (■) Intensidad relativa de fluorescencia a 310 nm. (●) Intensidad relativa de fosforescencia a 430 nm. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

En el caso del KI se obtienen resultados similares que para el KBr (ver figura 7), es decir, se observa un incremento de las intensidades de emisión tanto de fluorescencia como de fosforescencia a medida que aumenta la concentración de la sal. También en este caso el incremento de la intensidad de fosforescencia a medida que se aumenta la concentración de la sal resulta mayor que el incremento observado para la intensidad de fluorescencia. Es importante destacar que la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de la sal resultó similar para los tres haluros de potasio. En el caso particular del KCl se observó además que los incrementos de la fluorescencia y de la fosforescencia resultaban similares. Sin embargo, en el caso de la intensidad de fosforescencia la magnitud de dichos incrementos resultó mayor para el KI que para el KBr, siendo el KCl la sal que produce el menor efecto.

Winefordner y col.¹⁹ observaron que el agregado de sales a soluciones acuosas de diferentes sustancias emisoras, produce un efecto similar al agregado de metanol sobre la emisión a bajas temperaturas. Es decir, que en nuestro caso las soluciones etanólicas salinas generarían matrices nevadas compuestas por partículas finamente divididas (policristalinas) que, como se explicó anteriormente, producirían un aumento del *scattering* que resultaría en una mayor efectividad de la absorción de luz para un paso óptico dado respecto de las matrices de etanol puro que son vidrios resquebrajados transparentes. Este argumento explicaría el aumento simultáneo de las intensidades relativas de fluorescencia y fosforescencia que se observa con agregados de KCl.

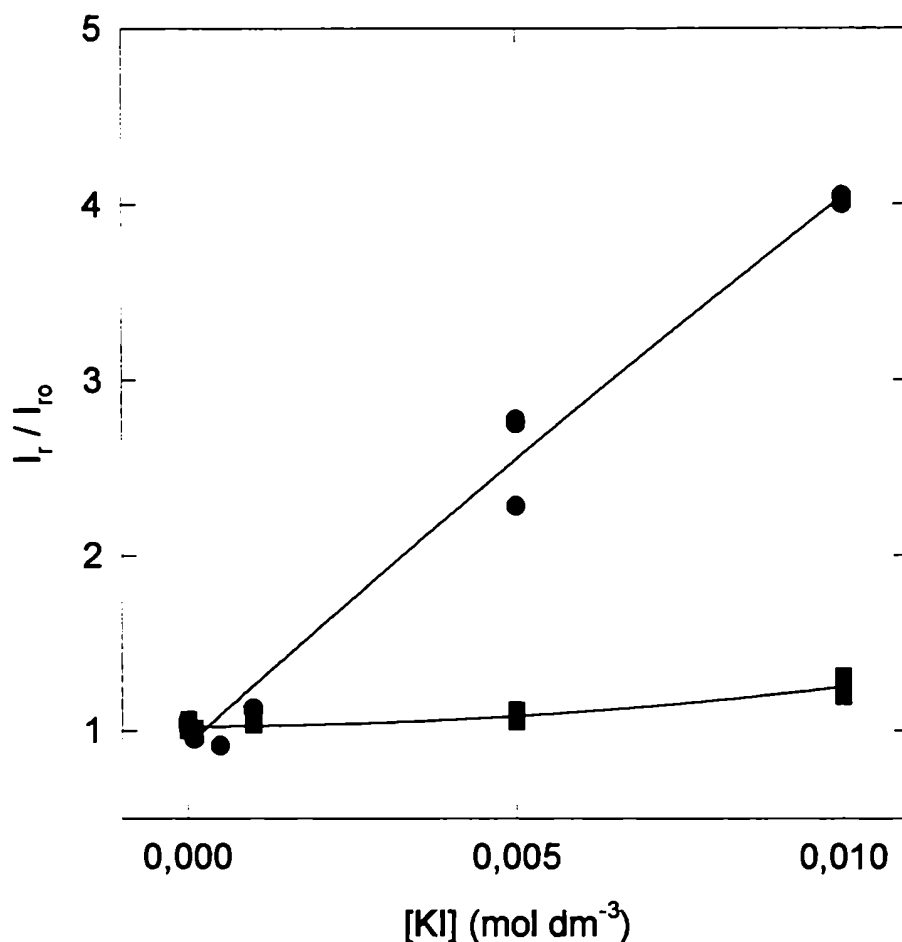


Figura 7. Intensidades relativas de emisión normalizadas de soluciones etanólicas de teofilina 10^{-5} mol dm⁻³ en función de la concentración del KI. (■) Intensidad relativa de fluorescencia a 310 nm. (●) Intensidad relativa de fosforescencia a 430 nm. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

En los casos del KBr y del KI el incremento de la intensidad de fluorescencia es similar al observado con agregados de KCl. Esto indica que las tres

sales tienen el mismo tipo de efecto sobre la estructura de la matriz. Sin embargo, como puede verse en las figuras 6 y 7, el incremento de la intensidad de fosforescencia sigue el orden $KI > KBr > KCl$. Por otra parte, si bien para la intensidad de fluorescencia los cambios son aproximadamente similares para las tres sales, puede verse cierta diferencia en la magnitud de los efectos que sigue la tendencia opuesta a la observada para la fosforescencia, es decir $KI < KBr < KCl$.

Las diferencias observadas para los agregados de KCl, KBr y KI se deberían a un efecto adicional de átomo pesado, es decir, un acoplamiento spin - órbita del fluoróforo inducido por un átomo o molécula o ión de alta masa, produciendo como resultado de esa interacción un incremento en las constantes cinéticas de cruzamiento intersistemas. Este efecto naturalmente resulta mayor para el I^- que para el Br^- y es prácticamente nulo en el caso del Cl^- . Naturalmente, la observación experimental tanto de la fluorescencia como de la fosforescencia está influenciada por los dos efectos encontrados, es decir el efecto de matriz y el efecto de átomo pesado, que en el caso de la emisión fluorescente son efectos opuestos mientras que para la fosforescencia resultan cooperativos.

Este mismo tipo de resultado se obtiene cuando se repite la experiencia utilizando $Pb(AcO)_2$ como sal (ver figura 8). En este caso, la variación de la intensidad de fluorescencia es muy similar a la observada con los haluros de potasio, pero el aumento de la intensidad de fosforescencia resulta mucho más pronunciado, probablemente debido a que el Pb^{2+} tiene mayor capacidad para inducir un acoplamiento spin-órbita que los haluros.

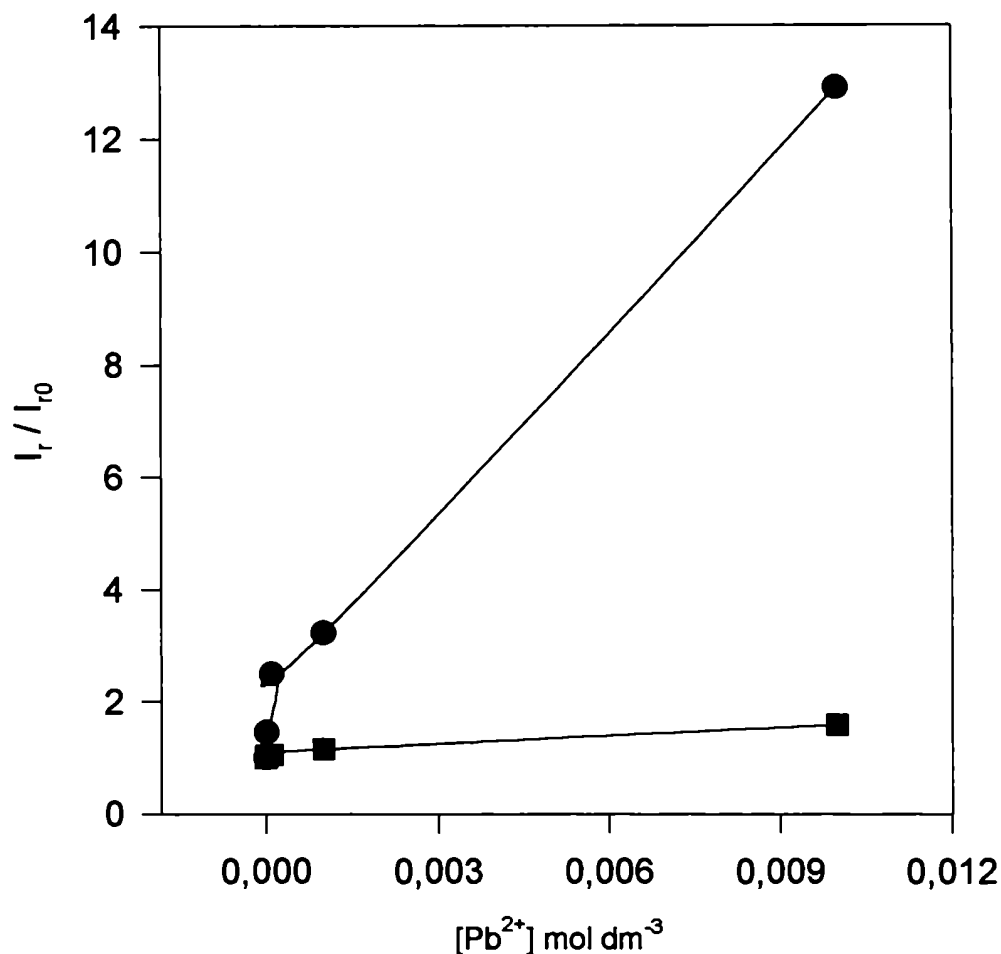


Figura 8. Intensidades relativas de emisión normalizadas de soluciones etanólicas de teofilina 10^{-5} $mol\ dm^{-3}$ en función de la concentración del $Pb(AcO)_2$. (■) Intensidad relativa de fluorescencia a 310 nm. (●) Intensidad relativa de fosforescencia a 430 nm. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

En el caso de las purinas se observaron efectos similares a los anteriormente explicados para las xantinas, aunque en estos casos sólo se pudo evaluar el efecto

del agregado de sales para la emisión fosforescente, ya que la fluorescencia es muy débil aún a 77 K. Nuevamente se observó que el incremento de las señales de fosforescencia sigue el orden $KI > KBr > KCl$, aunque para las purinas la magnitud del efecto resulta menor que para las xantinas. A modo de ejemplo, en la figura 9 se muestra el efecto del agregado de KI sobre la intensidad de fosforescencia de la purina.

Cuando este tipo de experimentos se realizan con sustratos que son eficientes emisores de fluorescencia a temperatura ambiente como el indol y el benzimidazol se puede ver que en etanol a 77 K el comportamiento es totalmente análogo al observado para las xantinas, es decir que se observa un gran incremento de la intensidad relativa de fosforescencia con el agregado de KI o KBr, mientras que la intensidad relativa de fluorescencia prácticamente no se ve afectada. Sin embargo, a temperatura ambiente se observó que tanto el KBr como el KI desactivan la fluorescencia del indol y del benzimidazol, aunque a 77 K la intensidad de fluorescencia aumenta con el agregado de estas sales. Estos resultados apoyan nuestra propuesta de que en realidad existen dos efectos (efecto de matriz y efecto de átomo pesado) que en el caso de la fluorescencia son opuestos, y por lo tanto según las magnitudes relativas de ambos pueden anularse o prevalecer uno sobre el otro. De todos modos, los resultados obtenidos indican que el efecto de matriz es generalmente superior al efecto de átomo pesado. En el caso de la fosforescencia ambos efectos tienden a aumentar la intensidad de la señal, y esta es la razón por la cual los incrementos de la fosforescencia normalmente no

van acompañados de un descenso en la intensidad de fluorescencia de igual magnitud.

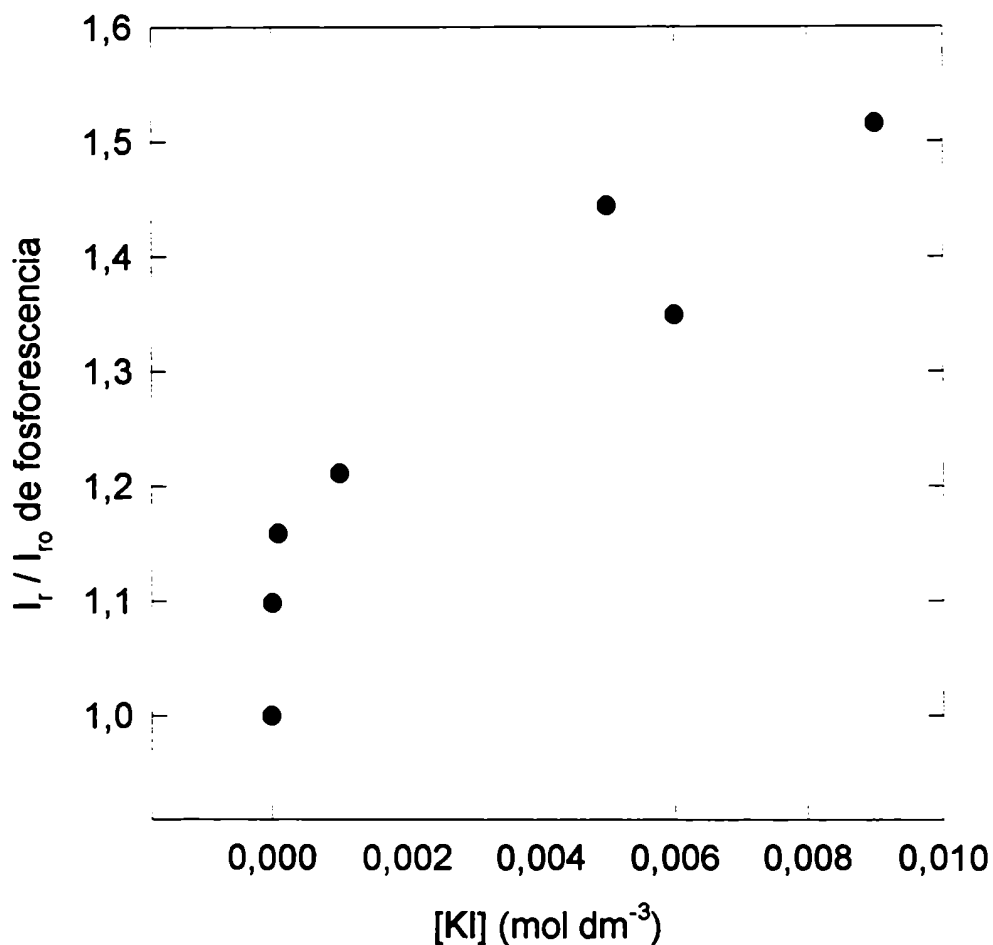


Figura 9. Intensidad relativa de fosforescencia normalizada de soluciones etanólicas de purina 10^{-5} mol dm⁻³ en función de la concentración del KI. $\lambda_{exc} = 260$ nm. $\lambda_{em} = 425$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

Un efecto diferente se observó al agregar MnCl_2 a las soluciones etanólicas de los diferentes sustratos. Por ejemplo, al agregar cantidades crecientes de MnCl_2 a una solución de teofilina se observa una marcada disminución de las intensidades relativas de fosforescencia y de fluorescencia (ver figura 10).

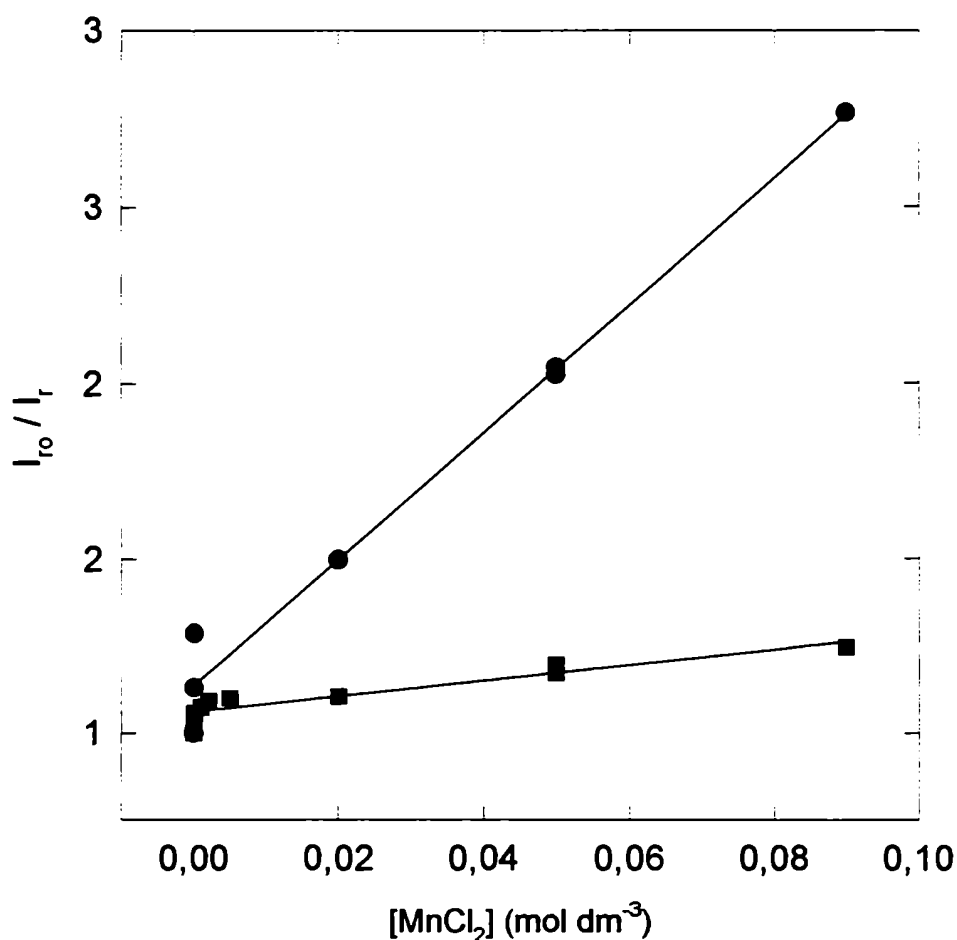


Figura 10. Relación I_{fo} / I_r para soluciones etanólicas de teofilina 10^{-5} mol dm^{-3} en función de la concentración de MnCl_2 con agregados crecientes de MnCl_2 . (■) Intensidad relativa de fluorescencia a 310 nm. (●) Intensidad relativa de fosforescencia a 430 nm. $\lambda_{exc} = 280$ nm. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 2,5. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms. T = 77 K.

Como puede verse en la figura 10, el efecto de desactivación por parte del MnCl_2 resulta mucho mayor para la fosforescencia que para la fluorescencia, de manera que la disminución observada en la intensidad relativa de fosforescencia no puede deberse exclusivamente a la desactivación del estado singulete que precede al triplete emisor, ya que en caso de ser así tanto la fluorescencia como la fosforescencia deberían desactivarse en igual magnitud. Por lo tanto se puede concluir que el MnCl_2 es un eficiente desactivante del estado triplete de las xantinas, aunque, si bien con menor eficiencia, también desactiva al estado excitado singulete de menor energía.

Nuevamente se utilizó al benzimidazol para estudiar este efecto por tratarse por una parte, de una sustancia con cierta relación estructural respecto de las purinas y xantinas y porque además presenta emisión fluorescente a temperatura ambiente. Así, se observó que el MnCl_2 también produce desactivación de la fluorescencia del benzimidazol a temperatura ambiente (ver figura 11) y de la fluorescencia y fosforescencia a 77 K (ver figura 12).

En el caso del benzimidazol también se observa una mayor desactivación del estado excitado triplete que del singulete, aunque en este caso la diferencia es menor que para las xantinas. Similares resultados se obtuvieron para el indol. Es importante destacar que mientras que los tiempos de vida de los estados excitados singulete de menor energía (S_1) de las xantinas y purinas en solución y a temperatura ambiente se estima que son del orden de los picosegundos,⁵ en los casos del benzimidazol y del indol estos tiempos son de aproximadamente 5 ns.²⁰⁻²²

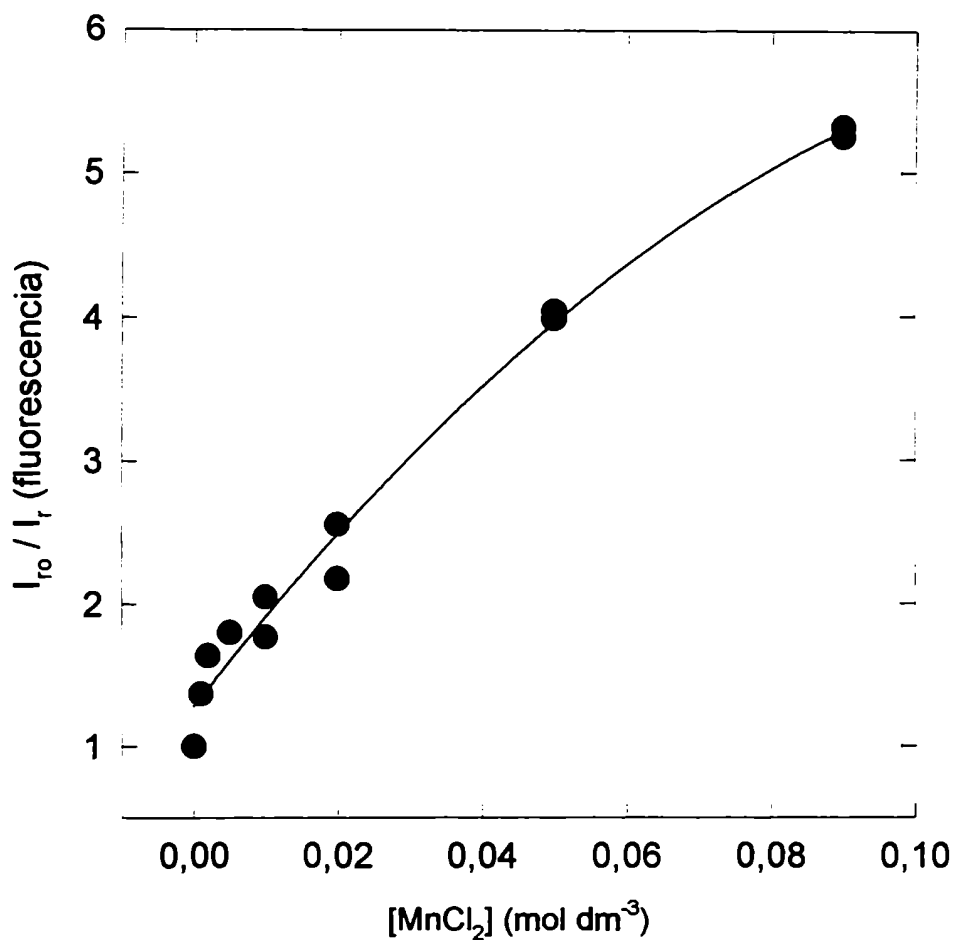


Figura 11. Relación I_{r_0} / I_r de fluorescencia a 292 nm para soluciones etanólicas de benzimidazol $10^{-5} mol\ dm^{-3}$, en función de la concentración de $MnCl_2$.

$\lambda_{exc} = 270\ nm$. Ventana de excitación = 2,5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala = 0,4. Velocidad de barrido = 20 nm/min. $T=298\ K$.

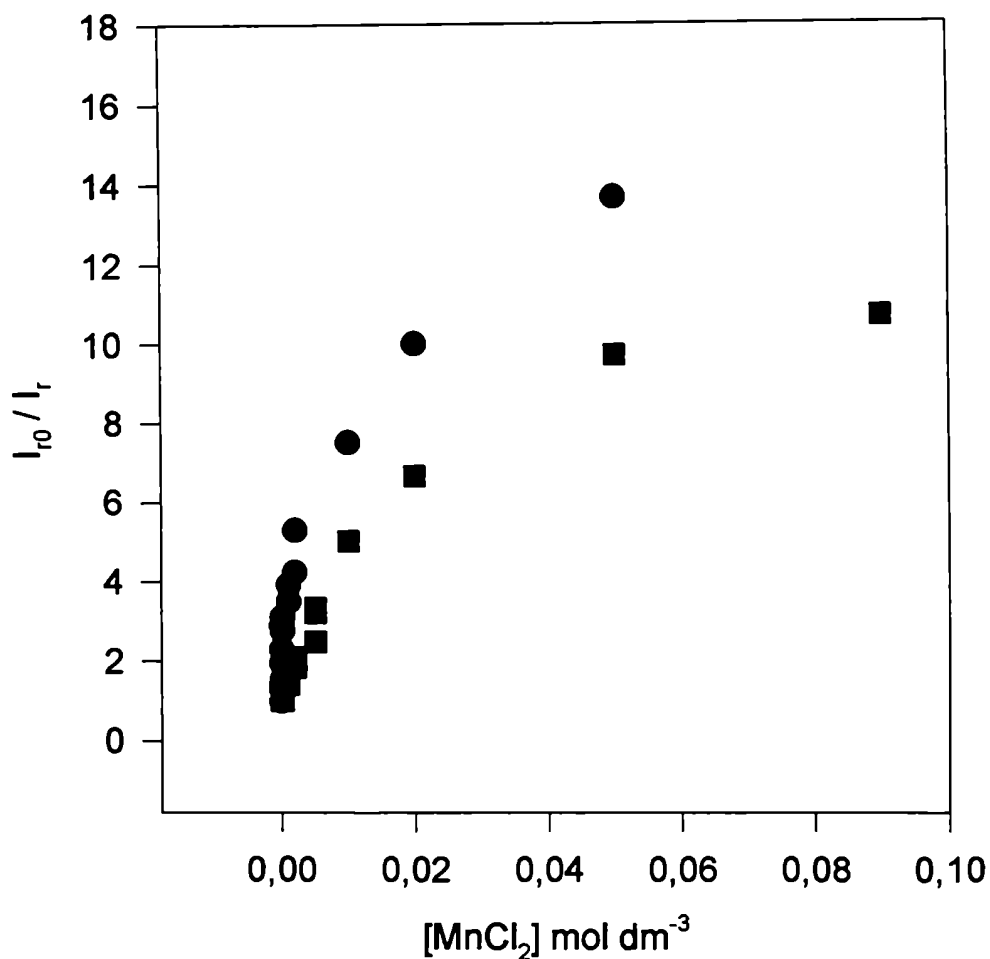


Figura 12. Relación I_0 / I_r para soluciones etanólicas de benzimidazol 10^{-5} mol dm^{-3} en función de la concentración de MnCl_2 . (■) Intensidad relativa de fluorescencia a 292 nm. (●) Intensidad relativa de fosforescencia a 423 nm. $\lambda_{\text{exc}} = 270$ nm. Ventana de excitación = 5. Ventana de emisión = 2,5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala de fluorescencia = 0,1. Factor de escala de fosforescencia = 10. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo de fosforescencia = 0,1 ms. Gate = 9 ms. $T = 77$ K.

En el caso de las purinas, también se detecta una importante desactivación de la fosforescencia, la que resulta bastante mayor que para las xantinas. En la

figura 13 se ejemplifica este efecto con la purina. Para el resto de las purinas se obtuvieron resultados similares.

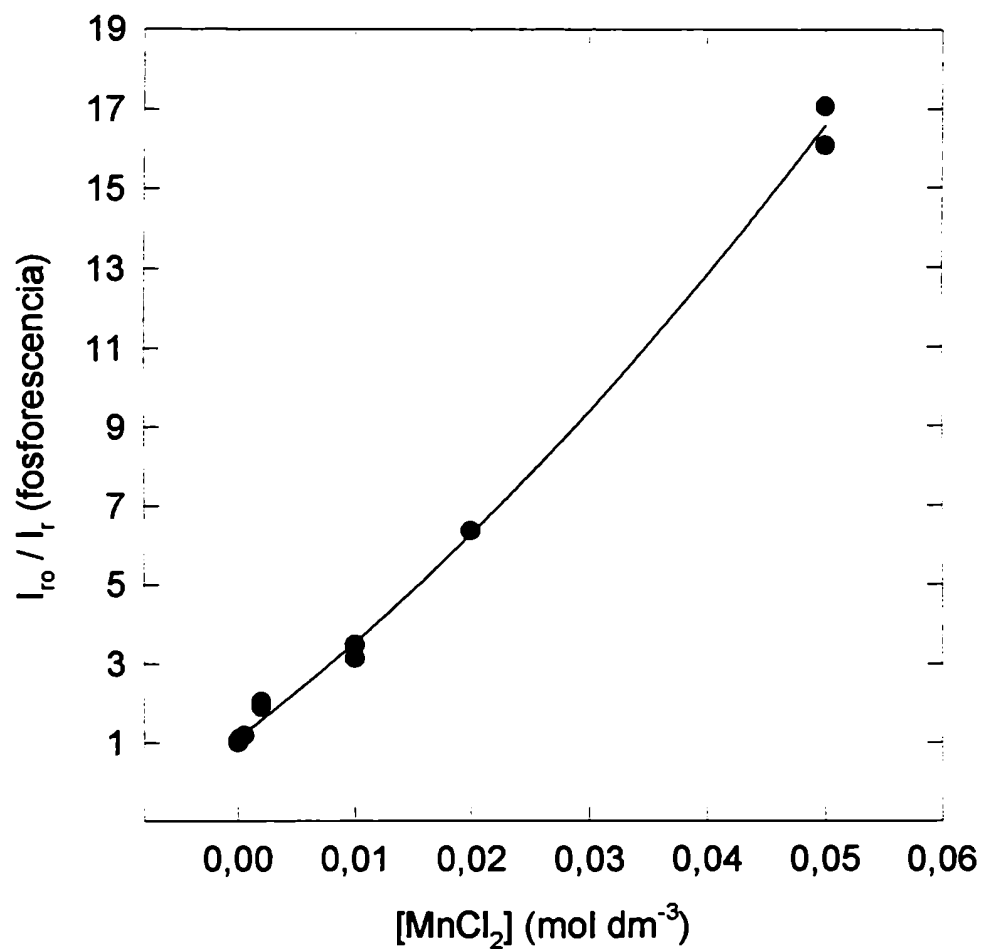


Figura 13. Relación I_0 / I_r de fosforescencia a 425 nm para soluciones etanólicas de purina $10^{-5} mol\ dm^{-3}$ en función de la concentración de $MnCl_2$. $\lambda_{exc} = 280\ nm$. Ventana de excitación = 10. Ventana de emisión = 5. Factor de respuesta = 3. Factor de escala = 2. Velocidad de barrido = 20 nm / min. Tiempo de retardo = 0,1 ms. Gate = 9 ms. $T = 77\ K$.

Esta importante desactivación que se observa para los estados triplete de las purinas por parte del MnCl_2 está de acuerdo con lo observado por Arce y col.²³ en estudios de flash fotólisis y con lo observado por nosotros mismos en el presente trabajo de tesis, al realizar estudios de espectroscopía optoacústica inducida por láser (ver capítulo 2).

1.3 Resumen y conclusiones.

Se estudiaron y describieron los espectros electrónicos de absorción en solventes polares de las diferentes xantinas y purinas utilizadas en este trabajo de tesis. En los casos en que esos espectros ya estaban descriptos, nuestros resultados fueron coincidentes con los de la literatura.

Se determinó que ninguno de los sustratos estudiados es un eficiente emisor fluorescente a temperatura ambiente y se estableció una cota superior para los rendimientos cuánticos de emisión ($\phi_f < 10^{-3}$).

Se estudiaron los espectros de emisión fluorescente y fosforescente de las diferentes purinas y xantinas a 77 K, observándose que para el caso de las purinas, aún a esta temperatura, el rendimiento cuántico de fluorescencia es extremadamente pequeño lo que no permite obtener espectros aceptables con nuestro instrumental.

Por otra parte se analizó el efecto de la matriz sobre las intensidades de emisión a bajas temperaturas. Se observó que dichas intensidades son fuertemente dependientes de la composición del solvente cuando se utilizan las mezclas etanol-

agua. También se analizó el cambio que produce el agregado de sales inorgánicas sobre las intensidades de emisión, encontrándose que existen dos tipos de efectos:

- a) Un efecto de matriz que implica un mejoramiento en la calidad óptica de la misma y por lo tanto un incremento de las señales de emisión al aumentar la concentración de las sales. Este efecto resultó equivalente para los tres haluros estudiados (KCl, KBr y KI) y para el acetato de plomo.
- b) Un efecto de átomo pesado que conduce a un incremento en las intensidades de fosforescencia. La magnitud de este último efecto es dependiente de la sal empleada y sigue el orden: $\text{KCl} \ll \text{KBr} < \text{KI} < \text{Pb}(\text{AcO})_2$.

Finalmente, se estableció que el agregado de MnCl_2 conduce a una importante disminución de las intensidades de emisión de todos los sustratos estudiados. En el caso de las xantinas se pudo ver que esta disminución es mucho mayor para la fosforescencia que para la fluorescencia, lo que indicaría que el MnCl_2 es más eficiente como desactivante de los estados excitados triplete que como desactivante de los correspondientes estados singulete. Este efecto también podría atribuirse a la formación de algún tipo de complejo entre el Mn^{+2} y las xantinas en su estado fundamental. Sin embargo la ausencia de cambios en los espectros de absorción, emisión y excitación al agregar esta sal a las soluciones de las diferentes xantinas y purinas nos permiten, en principio, considerar a esto como poco probable.

1.4 Sección experimental.

Las xantinas (Nacalai Tesque Inc.), las purinas, el benzimidazol y el indol (Aldrich Chemical Co. Inc.) utilizados son de máxima pureza (la pureza se controló por ccd y por CG) y no fue necesaria su purificación adicional. El etanol (Merck, grado espectrofotométrico), el éter etílico (Dorwil) y el isopentano (Riedel-de Haën) fueron controlados por espectrofotometría UV-visible y utilizados tal como se los recibió. El agua fue bidestilada y pasada por filtros Millipore antes de su uso. Las sales inorgánicas utilizadas son de máxima pureza (Merck Suprapur).

Los espectros de absorción UV-visible fueron registrados en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8541 A, equipado con detector de arreglo de diodos. En los casos en que resultó necesario, se utilizó un porta celdas equipado con una camisa para circulación forzada de líquido termostatzado mediante un crióstato con recirculador externo (Lauda RC6).

Los espectros de emisión y excitación fluorescente y fosforescente fueron registrados en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS5. Los espectros a temperatura ambiente se registraron utilizando celdas normales de fluorescencia de 1 cm de paso óptico y geometría de 90°. Los espectros a bajas temperatura (77 K) se registraron utilizando celdas cilíndricas de cuarzo de 2 mm de diámetro interno instaladas en un portaceldas refrigerado por nitrógeno líquido. Durante estas medidas se hace circular una corriente de nitrógeno gaseoso seco sobre las ventanas ópticas para evitar la condensación de agua durante las mediciones.

Todas las medidas de fluorescencia y fosforescencia a 77 K fueron realizadas como mínimo por triplicado ya que la dispersión de los datos, en lo que se refiere a las intensidades relativas de emisión, es considerable debido a que es muy difícil obtener matrices idénticas en los diferentes experimentos. Además, en todos los experimentos de fluorescencia y fosforescencia se registraron los espectros totales para controlar que no ocurrieran modificaciones en su forma por agregado de las diferentes sales.

1.5 Referencias.

- (1) Drobnik J. y L. Augenstein (1966) Spectroscopic studies of purines -I. Factors affecting the first excited levels of purine. *Photochem. Photobiol.* **5** 13-30.
- (2) Drobnik J. y L. Augenstein (1966) Spectroscopic studies of purines -II. Properties of purine substituted at the second and sixth carbons. *Photochem. Photobiol.* **5** 83-97.
- (3) Drobnik J., V. Kleinwächter y L. Augenstein (1967) Spectroscopic studies of purines -IV. Polarization of emission from purine and some of its derivatives. *Photochem. Photobiol.* **6** 147-154.
- (4) Lonworth J.W, R. O. Rahn y R. G. Schulman (1966) Luminiscence of pyrimidines, purines, nucleosides and nucleotides at 77 K. The effect of ionization y tautomerization. *J. Phys. Chem.* **45** 2930-2939.
- (5) Daniels M. y W. Hauswirth (1971) Fluorescence of purine and pyrimidine bases of the nucleic acids in neutral aqueous solution at 300 K. *Science* **171** 675-677.
- (6) Aaron J. J. y J. D. Winefordner (1973) Lowest excited triplet - state dissociation constants of purines in aqueous solution. Substituent effects. *Photochem. Photobiol.* **18** 97-102.
- (7) Smith J. J. (1976) The lowest singlet state of purine. *Photochem. Photobiol.* **23** 365-368.

-
- (8) Moller G. y A. M. Nishimura (1977) Solvent and substitution effects on the phosphorescence properties of several purine molecules. *J. Phys. Chem.* **81** 147-150.
- (9) Gibson E. P. y J. H. Turnbull (1979) Luminiscence characteristics of adenosine and its phosphates. *J. Photochem.* **11** 313-319.
- (10) Wilson R. W. y P. R. Callis (1980) Fluorescent tautomers and the apparent photophysics of adenine and guanine. *Photochem. Photobiol.* **31** 323-327.
- (11) Tohara A. y A. Y. Hirakawa (1980) Polarized fluorescence excitation spectra of adenine. *Chem. Phys. Lett.* **75** 145-147.
- (12) Knighton W. B., G. O. Giskaas y P. R. Callis (1982) Fluorescence from adenine cations. *J. Phys. Chem.* **86** 49-55.
- (13) Børrensen H. C. (1963) On the luminescence properties of some purines and pyrimidines. *Acta Chem. Scand.* **17** 921-929.
- (14) Parkanyi C., D. Bouin, D. C. Shich, S. Tunbrant, J. J. Aaron y A. Tine (1984) The effect of pH on the electronic absorption, fluorescence and phosphorescence spectra of purines and pyrimidines. Determination of the lowest singlet and triplet state ionization constants. *J. Chim. Phys.* **81** 21-31.
- (15) Andino M. M., C. G. de Lima y J. D. Winefordner (1987) Luminiscence characteristics of caffeine and theophylline. *Spectrochimica Acta* **43A** 427-437.
- (16) Gaye M. D. y J. J. Aaron (1988) A comparative study of heavy – atom effects on the room temperature phosphorescence of biologically important purines. *Anal. Chim. Acta* **205** 273-278.

-
- (17) Gaye M. D. y J. J. Aaron (1989) The effect of pH on the room temperature phosphorescence properties of several purine and pyrimidine derivatives. *Talanta* **36** 445-449.
- (18) Gaye M. D., M. Delamar y J. J. Aaron (1990) Study of intermolecular interactions on several solid substrates using room temperature phosphorescence and XPS analysis. *Analisis* **18** 571-577.
- (19) Lukasiewicz R. J., J. J. Mousa y J. D. Winefordner (1972) Influence of solvent matrix upon phosphorescence signals. *Anal. Chem.* **44** 963-966.
- (20) Bent D. V. y E. Hayon (1975) Excited state chemistry of aromatic amino acids and relative peptides. III. Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **97** 2612-2619.
- (21) Encinas M. V., E. A. Lissi, S. G. Bertolotti, J. J. Cosa y C. M. Previtali (1990) Photophysical studies of indole alcanoic acids and tryptamine in reverse micelles of sodium dioctyl sulfosuccinate. *Photochem. Photobiol.* **52** 981-986.
- (22) Murov S. L., I. Carmichael y G. L. Hug (1993) *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker, INC. New York.
- (23) Arce R., L. A. Jimenez, V. Rivera y C. Torres (1980) Intermediates in the room temperature flash photolysis and low temperature photolysis of purine solutions. *Photochem. Photobiol.* **32** 91-95.

Capítulo 2

**Estudio de las desactivaciones no radiativas de
compuestos purínicos y xantínicos por espectroscopía
optoacústica inducida por láser**

2.1 Introducción.

2.1.1 Aspectos generales.

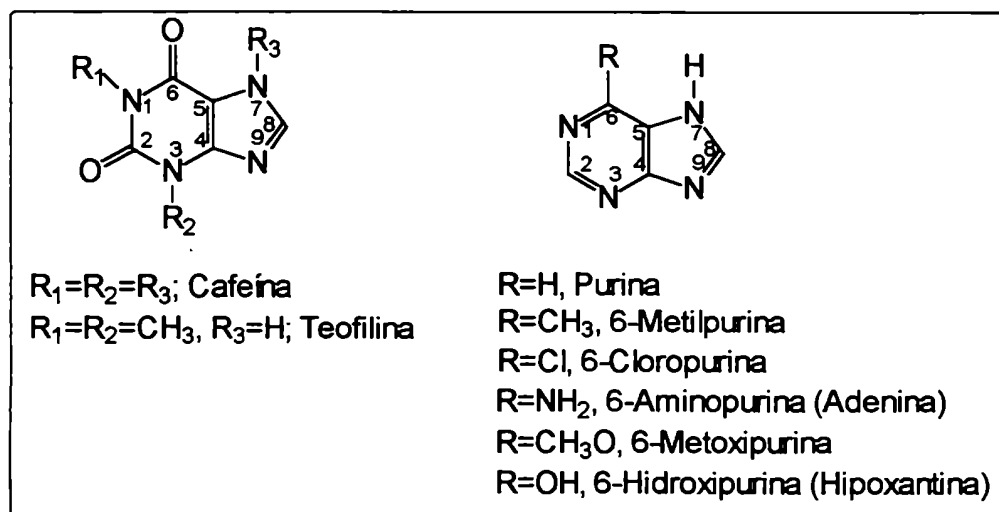
Los procesos de desactivación no radiativa en sistemas biológicos¹⁻⁸ y en sistemas químicos en general⁹ han sido objeto de numerosas investigaciones mediante el uso de técnicas fototérmicas y fotoacústicas. Estos métodos son especialmente útiles para sistemas fotoquímicamente estables y con bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia,^{9,10} aunque también pueden ser utilizados para la determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos de reacciones químicas.¹¹⁻¹⁴

Los compuestos purínicos y xantínicos estudiados en este trabajo de tesis, resultaron ser fotoquímicamente estables cuando se los irradió en forma directa en soluciones de acetonitrilo o de etanol (ver sección 2.4.2). Estos resultados experimentales son coincidentes con lo informado por otros autores al estudiar la estabilidad fotoquímica de este tipo de compuestos.¹⁵ Por ejemplo, Calkins y col.¹⁶ propusieron el uso de soluciones de cafeína como filtros y líquido refrigerante de láseres de colorantes bombeados por lámparas coaxiales debido a esta propiedad.

Por otra parte, a pesar de que Parkanyi y col.,¹⁷ Aaron y col.¹⁸ y Andino y col.¹⁹ han descripto los espectros de emisión y excitación fluorescente de diversas purinas en etanol y mezclas etanol-agua a temperatura ambiente, en nuestras condiciones experimentales no se observaron señales de fluorescencia en acetonitrilo y se estableció un valor límite para los rendimientos cuánticos de fluorescencia a temperatura ambiente ($\phi_f < 10^{-3}$).

El hecho de que los componentes de esta familia de compuestos muestren una muy baja o nula reactividad fotoquímica cuando son irradiados en forma directa, junto con la particularidad de poseer rendimientos cuánticos de fluorescencia de magnitud despreciable a temperatura ambiente, implica que la mayor parte de la energía de excitación es devuelta al medio en forma de calor. Estas características tornan a estas sustancias especialmente aptas para ser estudiadas mediante la técnica de espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS).

En este capítulo del presente trabajo de tesis se describe el estudio de la fotofísica de compuestos purínicos (purina, 6-metilpurina, 6-cloropurina, 6-aminopurina, 6-metoxipurina) y xantínicos (teofilina, cafeína) en acetonitrilo, utilizando la técnica de espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS) en la región ultravioleta del espectro electromagnético (266 nm).



Esquema 1

2.1.2 Fundamentos teórico-prácticos de la técnica LIOAS.

Como es sabido, una molécula electrónicamente excitada puede liberar su exceso de energía mediante vías radiativas, no radiativas o reaccionando químicamente. Cuando no ocurren procesos químicos, el segundo mecanismo es el único responsable de la liberación de calor al medio, dando lugar a la generación de ondas térmicas. La medición del calor producido luego de la absorción de luz puede dar información tanto cinética (rendimientos cuánticos de procesos, tiempos de vida) como termodinámica (contenidos energéticos) de las especies transientes generadas en el sistema por el pulso de luz. Cuando el dispositivo experimental empleado detecta el aumento de temperatura, ya sea en forma directa o indirecta, las técnicas se denominan fototérmicas. Si en cambio se detectan las ondas de sonido generadas por la expansión térmica mediante un micrófono o un transductor piezoeléctrico, el método se denomina fotoacústico u optoacústico. En este trabajo de tesis se empleó concretamente la técnica denominada espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS).^{9,10}

La ecuación general (1) establece la relación que existe entre las diferentes formas de disipación de energía en ausencia de procesos químicos:

$$E_a = \phi_f E_f + \alpha E_a + \phi_{ST} E_{ST} \quad (1)$$

donde E_a es la energía molar absorbida. En el lado derecho de la igualdad, el primer término representa la energía disipada en forma de fluorescencia, expresada como el producto del rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_f , multiplicado por la

energía molar del estado emisor, E_f . El segundo término representa la fracción α de la energía absorbida que es depositada como calor al medio dentro del tiempo de integración experimental. El tercer término da cuenta de la energía que es almacenada por especies cuyos tiempos de vida son superiores al tiempo de resolución, y se expresa como el producto del rendimiento cuántico de formación de la especie en cuestión, por su contenido energético molar. Estas especies pueden ser productos estables o estados transientes. Cuando existe alguna otra vía de desactivación, (por ejemplo fosforescencia) deben agregarse a la ecuación anterior los términos correspondientes.

El tiempo de resolución experimental o tiempo de integración de calor determina la separación del calor rápido del calor almacenado por distintas especies transientes. Este tiempo depende básicamente de tres factores: (a) el tiempo de respuesta del equipo electrónico empleado, (b) el ancho temporal del pulso láser y (c) el arreglo geométrico del experimento, que determina el valor del tiempo de tránsito acústico.

El cambio que provoca la liberación de calor al medio puede describirse analizando por separado los cambios en la densidad (ρ) y en la presión (P) en función del tiempo (t) y de la distancia a la fuente de calor (r).

El diseño más utilizado en optoacústica, y que se utilizó en este trabajo de tesis (ver sección 2.4.2) consiste en colocar al detector en contacto con una de las paredes de la celda que contiene a la muestra, ubicándolo así en un plano paralelo a la dirección de propagación del haz del láser de excitación. En este caso, si la absorbancia de la muestra es baja, la fuente de calor es un cilindro de igual diámetro

que el haz del láser y de igual longitud que la celda. Además, en estas condiciones la expansión volumétrica ocurre radialmente.

Teniendo en cuenta que los cambios en ρ y en P son mucho menores que sus valores iniciales, y que la conductividad térmica es despreciable, las ecuaciones de transporte para ρ y para P son las ecuaciones diferenciales inhomogéneas que se describen a continuación:

$$(\nabla^2 \rho - v_a^{-2} \cdot \delta^2 \rho / \delta t^2) = -\beta / C_p \cdot \nabla^2 Q \quad (2)$$

$$(\nabla^2 P - v_a^{-2} \cdot \delta^2 P / \delta t^2) = -\beta / C_p \cdot \delta^2 Q / \delta t^2 \quad (3)$$

Donde ∇^2 es la función de Laplace, $\beta = 1/V \cdot \delta V / \delta T$ es el coeficiente de expansión volumétrica ($V =$ volumen, $T =$ temperatura), C_p es la capacidad calorífica a presión constante, v_a es la velocidad del sonido en el medio y $Q = f(r,t)$ es el calor depositado al sistema integrado hasta un tiempo t y una distancia r de la fuente de emisión de calor.

La ecuación 2 provee el modelo matemático para el tratamiento de las señales en técnicas fototérmicas como por ejemplo la denominada lente térmica resuelta en tiempo. Por su parte, la ecuación 3 expresa la forma de la onda de presión u onda acústica generada por el pulso de calor, describiendo entonces matemáticamente a las señales obtenidas en la técnica LIOAS.

Existen muchos trabajos en la literatura donde se presentan distintas aproximaciones para la solución de la ecuación 3.^{9,10} Todos ellos parten de similares

suposiciones y llegan a resultados muy parecidos. Tal vez el tratamiento más riguroso es el realizado por Lai y Young⁹. Según estos autores, $P(r,t)$ es proporcional a $d\phi_0(\xi)/dt$, es decir, la derivada respecto del tiempo del potencial de velocidad $\phi_0(\xi)$. Esta derivada determina la forma espacial del pulso de presión.

En ausencia de procesos no radiativos lentos, $\phi_0(\xi)$ es una función cuya forma está determinada por la forma del pulso láser, donde $\xi = (t - r/v_a) / \tau_{ef}$ no es más que una forma modificada de escribir la variable tiempo.

La resolución de la ecuación 3 da entonces como resultado la siguiente expresión:

$$P(r,t) = \beta E_a / 8 \pi^{1/2} C_p (v_a/r)^{1/2} \tau_{ef}^{-3/2} d\phi_0(\xi)/dt \quad (4)$$

Donde r es la distancia entre la fuente y el detector, que debe ser más corta que el largo de la cubeta para considerar al problema como bidimensional. Además, la energía absorbida por la muestra es $E_a = E_l (1 - 10^{-A})$ y $\tau_{ef} = (\tau_l^2 + \tau_a^2)^{1/2}$, donde $\tau_a = R/v_a$ (τ_a = tiempo de tránsito acústico), R es el radio del haz del láser y τ_l es el ancho temporal del pulso del láser.

Teniendo en cuenta estas ecuaciones, pueden distinguirse dos casos extremos: pulsos láser largos donde τ_l domina y pulsos láser cortos donde domina τ_a . Para ambos casos la ecuación 4 predice una señal bipolar. Para pulsos largos ($\tau_l > \tau_a$) habrá una señal de expansión con su máximo situado a $t = (r / v_a - \tau_l)$ y una rarefacción o contracción con su mínimo situado a $t = (r / v_a + \tau_l)$. Cuando se

utilizan pulsos cortos, la magnitud de la amplitud, el tiempo de arribo al detector y la forma de la curva dependen del tiempo de tránsito acústico ($\tau_a = R/v_a$).

Si sólo se desea conocer la magnitud de la onda de presión, la ecuación 4 se simplifica a la siguiente expresión:

$$|P(r,t)| \propto \beta E_a / 8 \pi^{1/2} C_p (v_a/r)_{1/2} \tau_{ef}^{-3/2} \quad (5)$$

En base a estas ecuaciones, se puede tomar a la amplitud del primer máximo o bien a la distancia entre el primer máximo (expansión) y el primer mínimo (contracción), como una medida del calor rápido liberado al medio (H), ya que H está directamente relacionado a $P(r,t)$ mediante una constante instrumental, y su valor disminuye cuando se producen en el sistema especies que almacenan energía. Por lo tanto, cuando se utiliza excitación pulsada, la amplitud de la señal acústica, registrada por el transductor de presión, puede relacionarse con la fluencia del pulso láser (F) y con la absorbancia de la solución (A) mediante la siguiente ecuación:^{9,10}

$$H = K \alpha F (1-10^{-A}) \quad (6)$$

donde H es la amplitud de la señal optoacústica obtenida experimentalmente y K es una constante que depende de la geometría del experimento, de factores instrumentales y de los parámetros viscoelásticos del solvente. La validez de la ecuación 6 presupone la generación de ondas cilíndricas, condición que es

alcanzada cuando se trabaja con soluciones diluidas. La fracción de calor disipado en forma rápida (α) se origina en todos los procesos que ocurren en tiempos menores que el tiempo de tránsito acústico efectivo ($\tau'_a = 2\tau_a$), por ejemplo, desactivación vibracional del estado singlete excitado, conversión interna, cruce intersistemas, etc.

Para asegurar una buena separación del calor rápido y el lento o acumulado, el primero debe liberarse en un tiempo menor que $\tau_D/5$, donde τ_D es el tiempo de detección, que generalmente es igual τ'_a . Por otro lado, las especies almacenadoras de energía deben tener un tiempo de vida mayor que $5\tau_D$.

La espectroscopía optoacústica inducida por láser (LIOAS) resulta particularmente útil para sistemas donde la detección óptica no es posible, ya sea por un fuerte solapamiento de los espectros electrónicos de los transientes con los del estado fundamental, o bien debido a la turbidez u opacidad del medio. Esta técnica ha sido utilizada para determinar parámetros cinéticos y espectroscópicos tales como rendimientos cuánticos de procesos fotofísicos y contenidos energéticos de fotoproductos.^{9,20-27} Por ejemplo, se han determinado rendimientos cuánticos de cruces intersistemas (ϕ_{ci}) de numerosos compuestos orgánicos, comparando las señales optoacústicas producidas en soluciones primero saturadas con aire y luego desgasadas.⁹ Como es sabido^{28,29}, la determinación de ϕ_{ci} por métodos ópticos, está limitada por requerimientos experimentales tales como la determinación de los coeficientes de absorción molar de los estados transitorios. Con el advenimiento de las técnicas fototérmicas y fotoacústicas, se dispone de un nuevo método

alternativo para realizar estas determinaciones. Sin embargo, este tipo de mediciones requiere la determinación del parámetro α para poder hacer uso de la ecuación 6. Usualmente el valor de α se obtiene experimentalmente a partir del cociente:

$$H_S/H_R \quad (7)$$

donde H_S es la señal optoacústica normalizada en fluencia, medida en la muestra (S), y H_R es la señal normalizada obtenida para una referencia calorimétrica (CR).

Idealmente, una referencia calorimétrica es una sustancia con las mismas propiedades ópticas que la muestra, que tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia bien conocido y en lo posible nulo, y que posee una alta eficiencia para liberar el exceso de energía en forma de calor, dentro del tiempo de resolución experimental. Por otra parte, las medidas con la muestra y con la referencia deben realizarse exactamente en las mismas condiciones experimentales para poder eliminar el factor K (ecuación 6). Es importante tener en cuenta que tanto la muestra como la referencia deben ser diluídas y debe utilizarse el mismo solvente, ya que todo el tratamiento antes descrito presupone que las propiedades termoelásticas son las del solvente, mientras que las ópticas son las del soluto.

Las referencias calorimétricas pueden ser internas o externas. Una referencia interna es, usualmente, la misma sustancia en estudio, cuyo comportamiento se modifica de manera de inhibir o producir algún proceso de almacenamiento de energía. El concepto de referencia interna fue introducido por

Callis³⁰ y ha sido utilizado en varias oportunidades.^{24,31,32} Un caso particular, es la desactivación de estados triplete por oxígeno.⁹

Cuando no es posible disponer de una referencia interna, debe recurrirse a una de tipo externo. En la literatura, pueden encontrarse numerosos compuestos útiles como referencias calorimétricas cuando se trabaja con longitudes de onda de excitación por encima de los 300 nm.³³⁻³⁸ La mayoría de ellos resultan útiles sólo en el rango de fluencias de excitación menores a 250 J m^{-2} . Por ejemplo, para el rango entre 300 y 360 nm se han propuesto varias referencias tales como antraceno, fluoreno, xantona, piridazina, 2-hidroxibenzofenona, benzofenona desactivada con KI y 2-aminobenzofenona entre otras. Dentro del rango de 400 a 800 nm existen otras referencias como por ejemplo carotenos, tetrafenil porfirina de Co(II), azuleno, cristal violeta, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, FeCl_3 y CoCl_2 entre otras. Sin embargo, por debajo de 300 nm no existía hasta el momento en que nosotros publicamos nuestros resultados,³⁹ ninguna sustancia descrita como referencia.

Debido a que las purinas y xantinas, además de no ser emisores fluorescentes y de ser fotoestables en acetonitrilo, absorben por debajo de esta longitud de onda, una parte importante de este trabajo, y que dio lugar a una publicación³⁹, consistió en caracterizar a las mismas como nuevas referencias calorimétricas para esta región del espectro electromagnético.

De acuerdo con las ecuaciones 6 y 7, y para aumentar la calidad de las medidas, el factor α puede determinarse graficando la amplitud de la señal fotoacústica (H) en función de la fluencia de excitación (F), tanto para la muestra como para la referencia. Este procedimiento se repite para varias soluciones de

muestra y referencia con diferentes valores de absorbancia, y luego, graficando las pendientes de las rectas obtenidas, H/F , en función de la fracción de luz absorbida, $(1-10^{-A})$, para muestra y referencia, puede obtenerse el valor del parámetro α de la muestra a partir del cociente de las pendientes de las nuevas rectas.

2.2 Resultados y discusión.

2.2.1 Evaluación de la 2-hidroxibenzofenona como posible referencia calorimétrica.

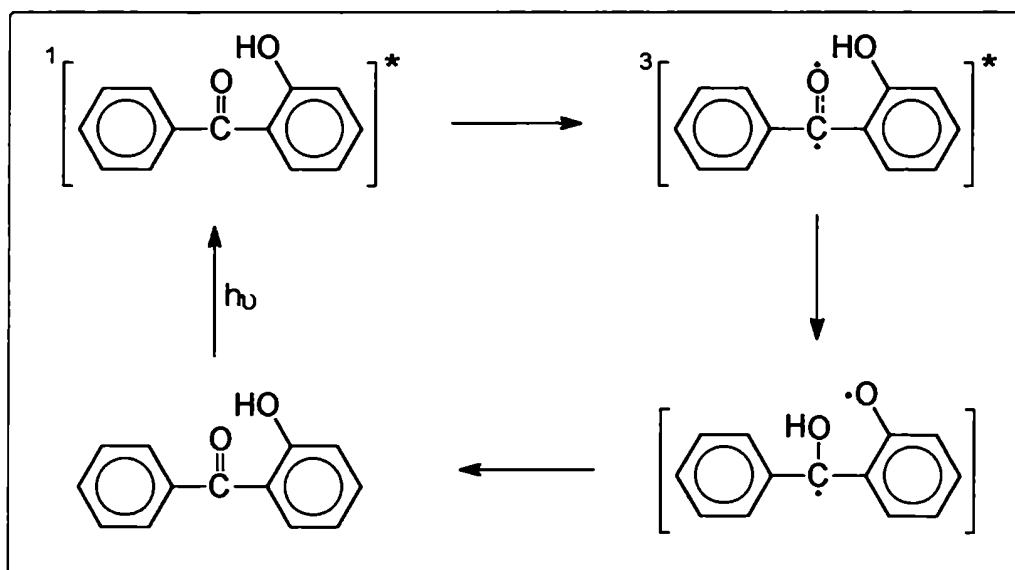
Con el objeto de conocer la influencia de la fluencia de excitación (F) en el comportamiento fotoquímico de los compuestos estudiados, se registraron las señales fotoacústicas en función de F dentro del rango $1-14.000 \text{ J m}^{-2}$, para absorbancias por debajo de $0,12$. En todos los casos se obtuvieron respuestas lineales por debajo de 1.500 J m^{-2} , y no se observó fotoblanqueo de las muestras durante los experimentos, para fluencias por debajo de ese valor.

Como se mencionó en la introducción, para poder determinar el valor del parámetro α de una muestra es necesario recurrir a una referencia calorimétrica. Debido a que no existían en la literatura referencias probadas para trabajar con una longitud de onda de excitación de 266 nm , parte de nuestro trabajo consistió en establecer nuevas referencias calorimétricas para dicha longitud de onda.

En primer lugar analizamos el comportamiento de soluciones de benzofenona con diferentes agregados de KI. Como es sabido,³⁶ la benzofenona electrónicamente excitada en estado singulete cruza al estado triplete en unos pocos

picosegundos con eficiencia unitaria. El estado triplete formado puede ser desactivado eficientemente con KI, con constantes cinéticas de orden difusional, y de esta manera toda la energía absorbida por la benzofenona es devuelta al medio en forma de calor en unos pocos nanosegundos. Sin embargo, una vez realizadas las mediciones, esta referencia fue descartada debido a que las correlaciones de datos obtenidas no resultaron satisfactorias.

El segundo intento se realizó con soluciones de 2-hidroxibenzofenona. También en este caso el rendimiento cuántico de cruce intersistemas es unitario, pero este compuesto tiene la ventaja de que su estado triplete se desactiva rápidamente mediante un proceso de abstracción de H intramolecular reversible (ver esquema 2).



Esquema 2. Desactivación de la 2-hidroxibenzofenona mediante una abstracción de hidrógeno intramolecular.

Esta sustancia ya había sido previamente propuesta como referencia calorimétrica para longitudes de onda comprendidas entre 320 y 355 nm,³³ tanto en etanol como en acetonitrilo. Dado que su rendimiento cuántico de cruce intersistemas (ϕ_{ci}) es unitario, y que por lo tanto el estado reactivo es siempre el mismo (T_1), y dado que no se requiere el agregado adicional de desactivantes externos que podrían complicar el sistema, pensamos que en principio al trabajar a 266 nm no debería observarse ninguna diferencia respecto de lo descrito por otros autores a otras longitudes de onda de excitación.³³

En la figura 3 se muestra la amplitud de la señal fotoacústica obtenida en función de la fluencia de excitación para una solución de 2-hidroxibenzofenona en acetonitrilo, excitando a 266 nm.

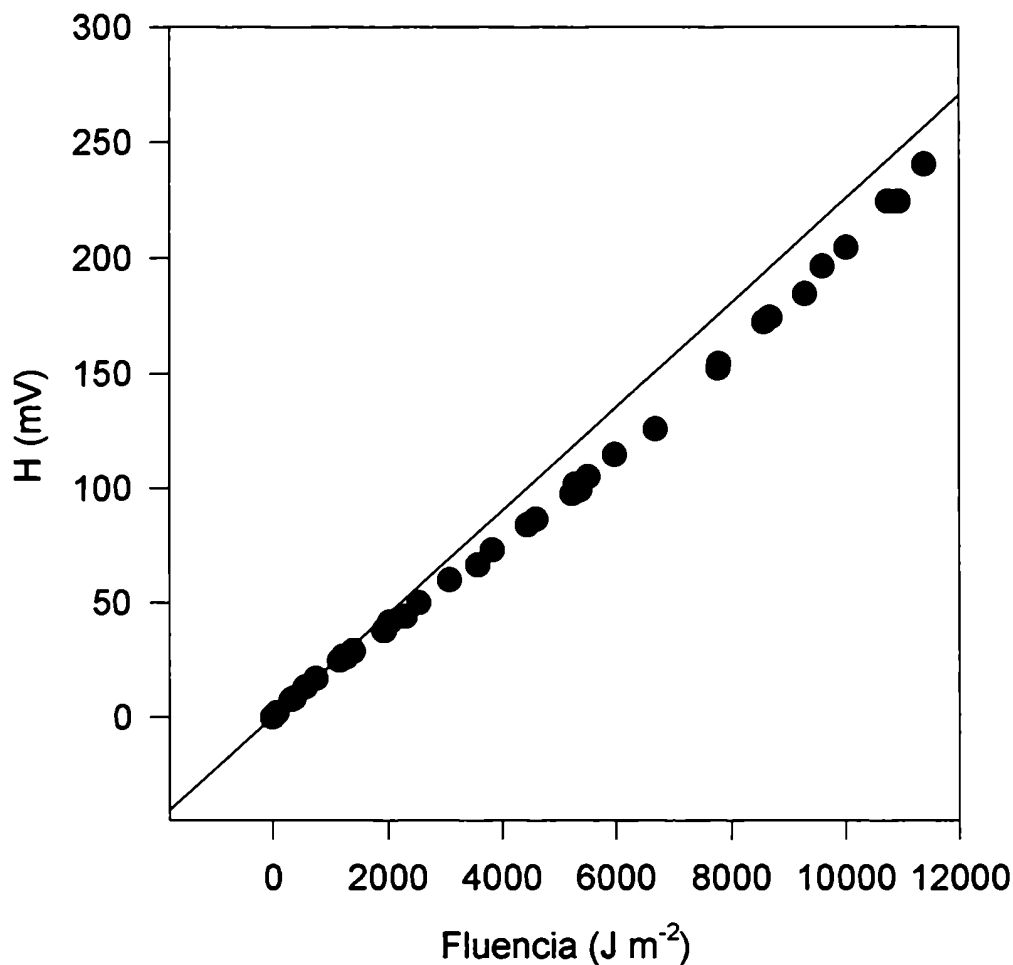


Figura 1. Amplitud de la señal fotoacústica en función de la fluencia de excitación para una solución de 2-hidroxibenzofenona en acetonitrilo. $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm.

Como puede verse en dicha figura, para valores de fluencia superiores a 1000 J m^{-2} se producen desviaciones negativas de la linealidad. Este resultado puede explicarse como un fotoblanqueo del estado fundamental, y es coincidente con el comportamiento descrito por Van Hava y col.³³ Para fluencias de excitación inferiores a 1000 J m^{-2} las relaciones obtenidas son lineales y con muy buena reproducibilidad en todo el rango de concentraciones investigado (ver figura 2).

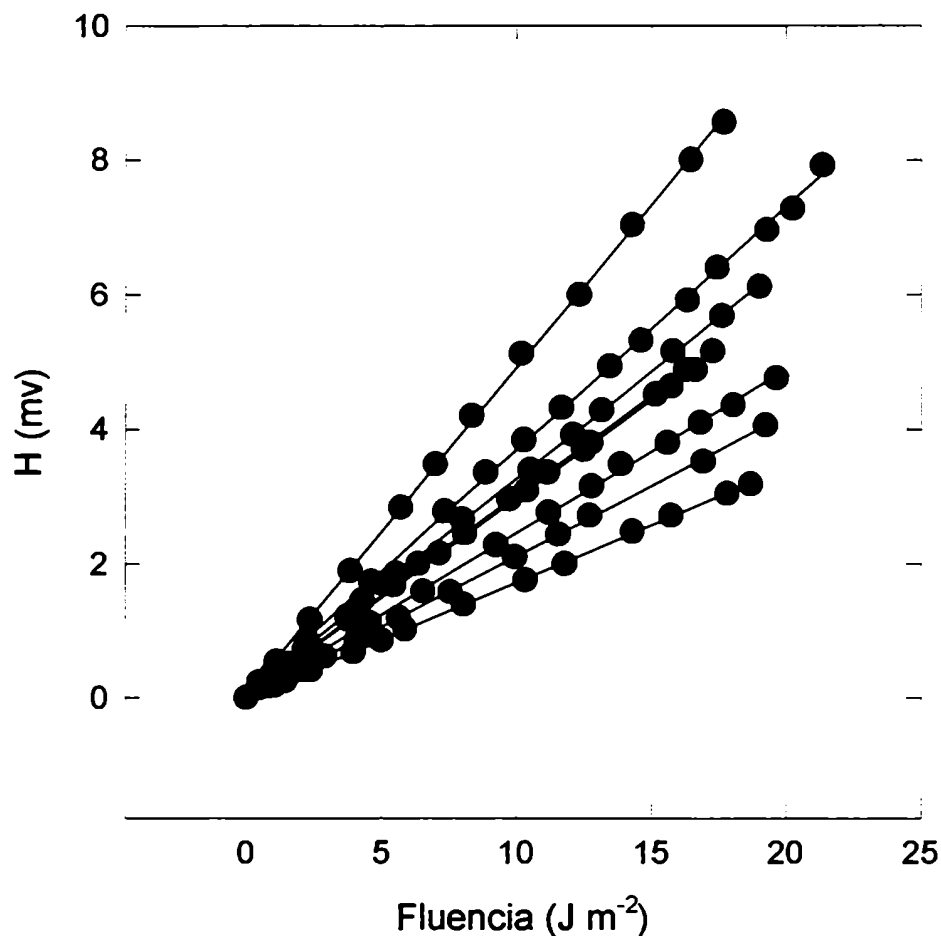


Figura 2. Amplitud de la señal fotoacústica en función de la fluencia de excitación para soluciones de 2-hidroxibenzofenona en acetonitrilo con diferentes concentraciones. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$. $T = 298 \text{ K}$.

Dentro de esta región de bajas fluencias de excitación, las soluciones de 2-hidroxibenzofenona no muestran cambios en la absorbancia durante el experimento.

En coincidencia con la ecuación 6, cuando se grafica la señal fotoacústica normalizada por la fluencia de excitación (H/F) en función de la fracción de luz absorbida ($1-10^{-A}$), dentro de la zona de bajas fluencias, se obtiene una buena

relación lineal para soluciones de 2-hidroxibenzofenona con absorbancias dentro del rango de 0,08 a 0,20 (figura 3).

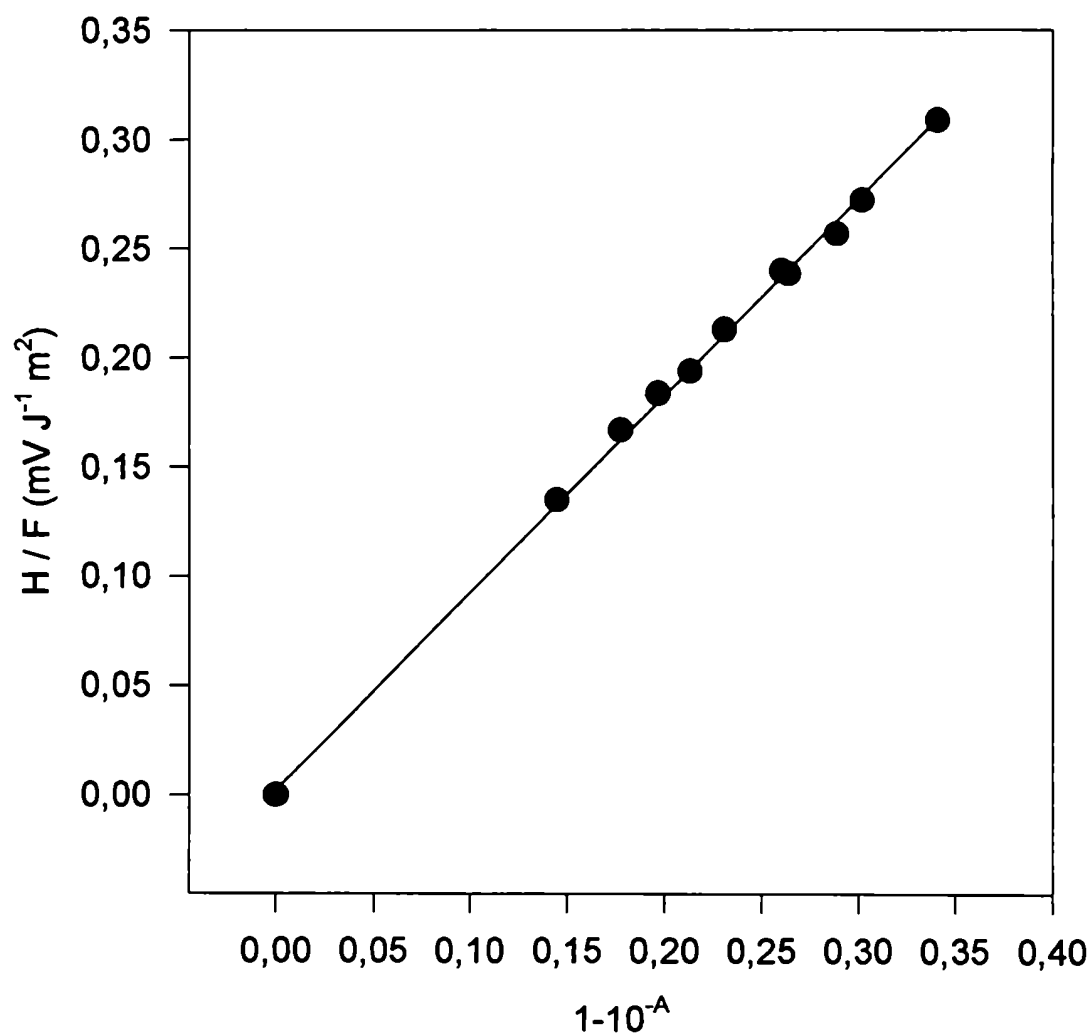


Figura 3. Cociente H/F en función de la fracción de energía absorbida para soluciones de 2-hidroxibenzofenona en acetonitrilo. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$. $T = 298 \text{ K}$.

Estos resultados nos permitieron, en principio, utilizar a la 2-hidroxibenzofenona como referencia calorimétrica, aunque estrictamente estos experimentos no nos permitían asegurar *a priori* que su valor de α fuera unitario. Sin embargo, como se muestra más adelante, esta duda se terminó de disipar cuando se comparó la respuesta fotoacústica de la 2-hidroxibenzofenona con las de las diferentes purinas y xantinas estudiadas en el presente trabajo.

Para que la presentación de los experimentos y su discusión resulte más clara, los resultados correspondientes a las purinas y xantinas serán discutidos en dos secciones. Primero analizaremos la región de bajas fluencias (típicamente por debajo de 6 J m^{-2}), y posteriormente la región de altas fluencias.

2.2.2 Respuesta optoacústica de purinas y xantinas utilizando bajas fluencias de excitación.

a) *6-Cloropurina, 6-metoxipurina, 6-aminopurina (adenina), teofilina y cafeína:*

Las soluciones de 6-cloropurina, 6-metoxipurina, 6-aminopurina, teofilina y cafeína en acetonitrilo verifican relaciones lineales entre la amplitud de la señal optoacústica y la fluencia del pulso láser (ver figura 4).

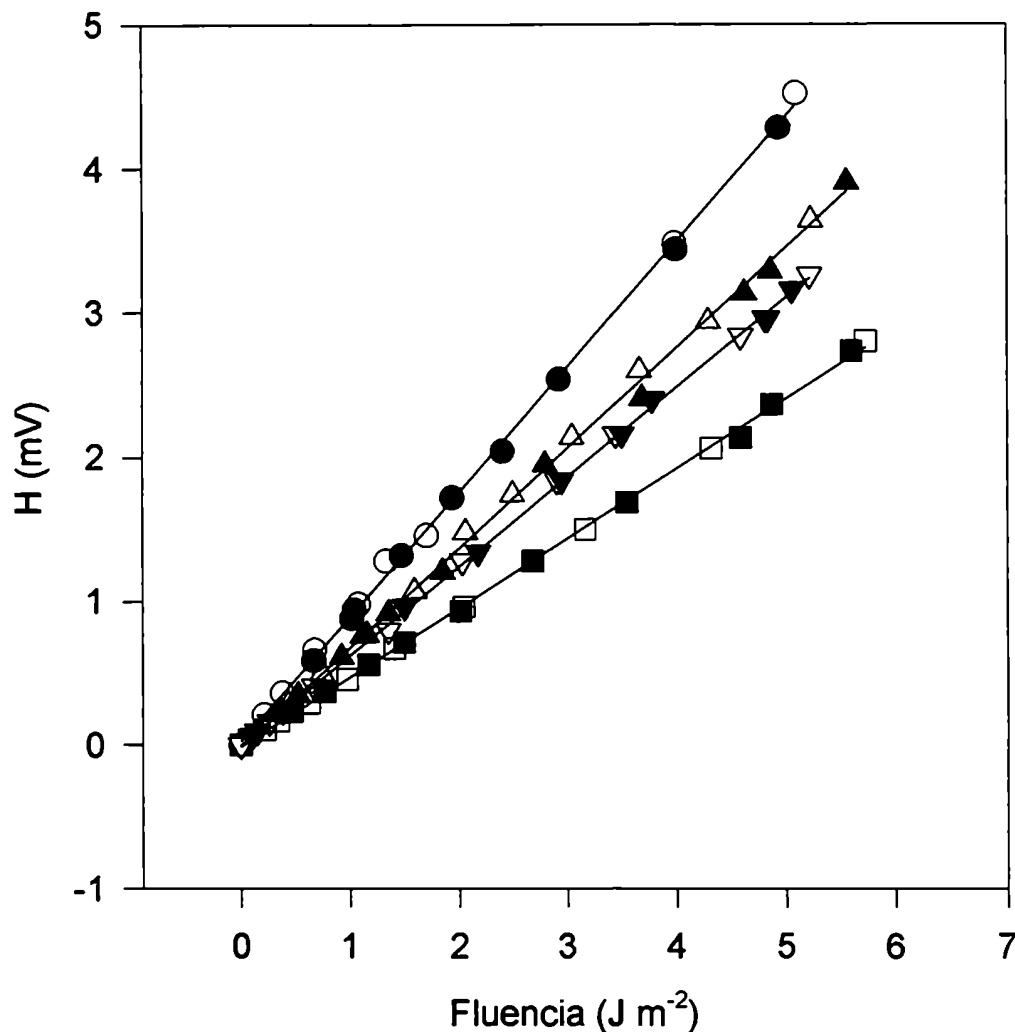


Figura 4. Amplitud de la señal optoacústica en función de la fluencia del pulso láser para soluciones en acetonitrilo de : (○) teofilina AS, (●) teofilina NS ($A = 0,160$); (△) 6-aminopurina AS, (▲) 6-aminopurina NS ($A = 0,113$); (▽) 6-cloropurina AS, (▼) 6-cloropurina NS ($A = 0,107$); (□) 6-metoxipurina AS, (■) 6-metoxipurina NS ($A = 0,086$). AS = solución saturada con aire; NS = solución saturada con nitrógeno. $\lambda_{exc.} = 266$ nm. $T = 298$ K.

Como puede verse en dicha figura, las pendientes H/F no se ven modificadas, dentro del error experimental, cuando las experiencias son realizadas

sucesivamente en atmósfera normal (solución saturada con aire, AS) y en atmósfera inerte (solución saturada con nitrógeno, NS). Dado que el oxígeno es un eficiente desactivante de estados triplete⁴⁰, en algunos casos es posible determinar propiedades de estos estados mediante medidas fotoacústicas, variando simplemente la concentración de oxígeno en la solución.⁹ Teniendo en cuenta el tiempo de resolución experimental (1 μ s, detector PZT, ver sección 2.4.3), junto con el hecho de que los tiempos de vida reportados para los estados triplete de algunas purinas son superiores a 1 μ s,²⁸ podemos concluir que en nuestras condiciones experimentales, a temperatura ambiente, los rendimientos cuánticos de formación de estados tripletes para estos sustratos son extremadamente bajos o nulos.

La información fotofísica disponible sobre estos tripletes es escasa. Wilson y Callis⁴¹ sugirieron que tanto los estados triplete como singulete de la adenina tienen tiempos de vida muy cortos a 140-165 K, mientras que Kasama y col.⁴² señalaron que la excitación directa de la adenina no produce la absorción de transientes en las regiones visible y ultravioleta a temperatura ambiente, y que el agregado de acetona induce una débil absorción asociada a un radical neutro. Ambos trabajos concluyen que el triplete de la adenina es claramente observable si es producido mediante transferencia de energía triplete-triplete. Aunque Kasama y col. describen la absorción triplete-triplete de la cafeína usando acetona como fotosensibilizador, no pudieron observar ningún transiente por excitación directa del sustrato. Hasta donde nosotros sabemos, la teofilina presenta un comportamiento fotofísico y espectroscópico similar al de la cafeína,^{19,43} por lo tanto, podemos asumir que la

teofilina tampoco puebla fácilmente el estado triplete al ser irradiada en solución a temperatura ambiente.

Los resultados antes mencionados están de acuerdo con el hecho de que no se observa ningún efecto sobre la señal fotoacústica de la adenina y de la teofilina al cambiar la atmósfera del sistema.

Cabe destacar además, que no existe en la literatura información sobre la caracterización de transientes de la 6-cloropurina y de la 6-metoxipurina.

Es importante señalar que al no conocerse exactamente los tiempos de vida de los estados triplete de todas las sustancias estudiadas, los resultados que se muestran en la figura 5 podrían deberse básicamente a dos motivos, o los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas son muy bajos o nulos, o los tiempos de vida de los estados triplete son claramente inferiores a $1\mu\text{s}$ y por lo tanto su desactivación es integrada como calor rápido por el detector cerámico. Sin embargo, cuando las medidas se repitieron utilizando un film de PVF_2 como detector, en cuyo caso el tiempo de resolución fue de 150 ns, se observó para todos los sustratos exactamente el mismo tipo de comportamiento que con el detector de PZT. Este último resultado refuerza la idea de que para estos sustratos los rendimientos cuánticos de cruce de sistemas son extremadamente bajos o nulos, ya que la desactivación de los estados triplete para retornar al estado fundamental singulete son procesos prohibidos por spin, y por lo tanto los tiempos de vida de estas especies son típicamente del orden de los microsegundos.

Teniendo en cuenta que, en acetonitrilo y a temperatura ambiente, no se detecta una emisión fluorescente significativa para ninguno de estos sustratos ($\phi_f <$

10^{-3}), de acuerdo con la ecuación 1 deberían obtenerse para todos ellos, valores similares de α y ser estos cercanos a 1. Esto se verifica graficando la relación H/F , obtenida al graficar la señal optoacústica medida en función de la fluencia de excitación para varias soluciones de diferentes absorbancias de cada uno de los sustratos, en función de la fracción de luz absorbida por la muestra ($1-10^{-A}$), tal como se muestra en la figura 5.

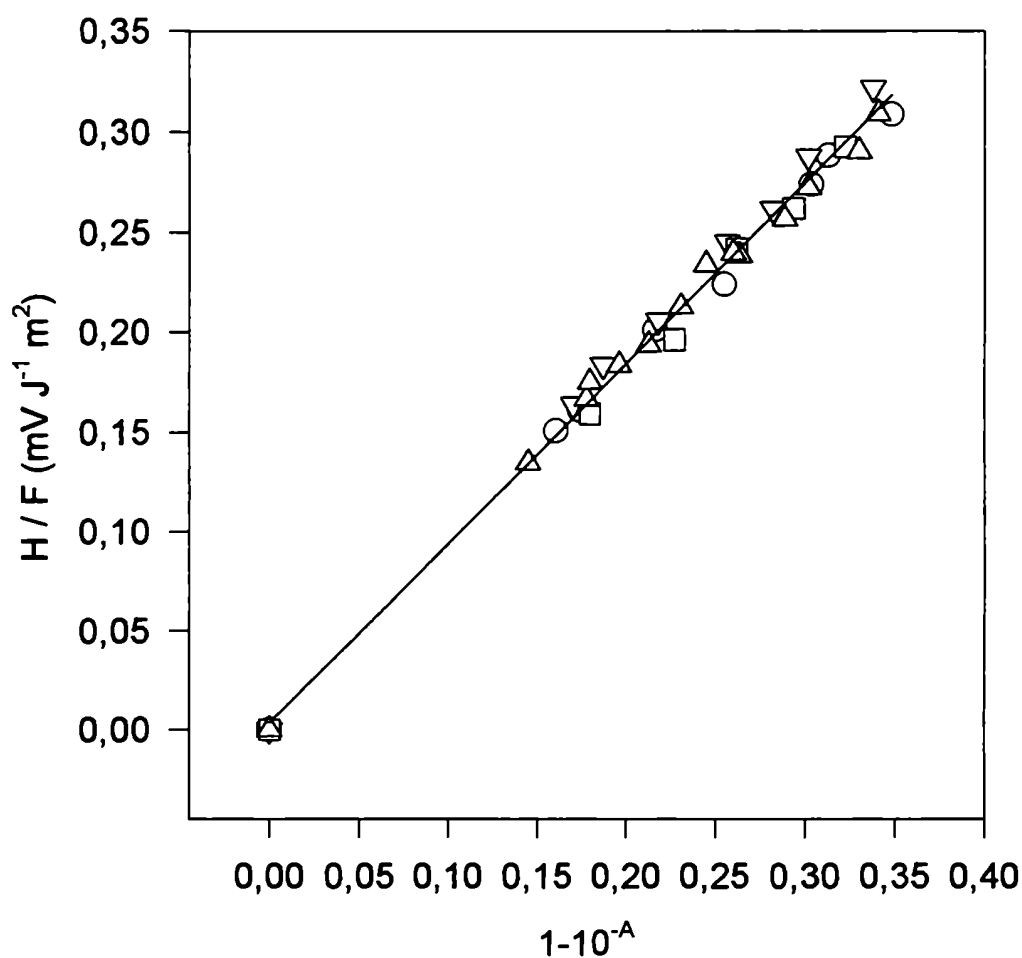


Figura 5. Cociente H/F en función de la fracción de energía absorbida para soluciones en acetonitrilo de : (O) teofilina, (Δ) 6-cloropurina, (∇) 6-metoxipurina, (\square) 2-hidroxi-benzofenona. $\lambda_{exc.} = 266$ nm. $T = 298$ K.

Como puede verse en dicha figura, para todos los compuestos estudiados se obtienen relaciones lineales, y las pendientes son coincidentes dentro del 5 % de error experimental. Para determinar los valores de α , se utilizó 2-hidroxibenzofenona como referencia calorimétrica externa. Como puede apreciarse en esta misma figura, todas las rectas, incluyendo la correspondiente a la referencia son coincidentes. Cuando se realiza el cociente de pendientes de a pares, siempre se obtiene un valor de $\alpha = 1 \pm 0,05$. Este resultado permite no sólo extender el uso de la 2-hidroxibenzofenona como referencia calorimétrica a longitudes de onda cortas (266 nm), sino que además permite proponer a los derivados purínicos antes mencionados como nuevas referencias calorimétricas para una zona donde hasta el momento no existían referencias disponibles.

b) Purina y 6-metilpurina: Las soluciones saturadas con nitrógeno (NS) de purina en acetonitrilo presentan relaciones lineales entre la amplitud de la señal acústica y la fluencia del pulso láser, dentro de la zona de bajas fluencias y para absorbancias dentro del rango de 0,06 a 0,19 (fig. 7).

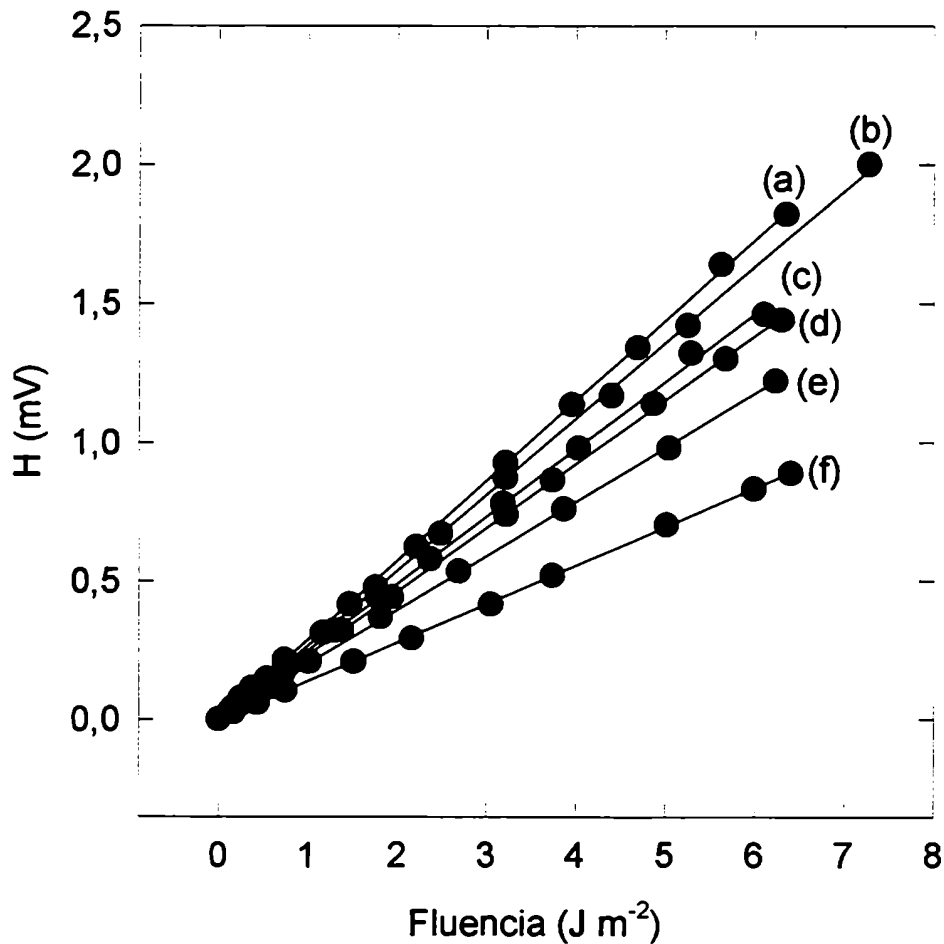


Figura 6. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia de excitación para soluciones con diferentes concentraciones de purina (NS) en acetonitrilo. $\lambda_{exc} = 266$ nm. $T = 298$ K. (a) $A = 0,172$, (b) $A = 0,137$, (c) $A = 0,129$, (d) $A = 0,110$, (e) $A = 0,097$, (f) $A = 0,061$.

Cuando sobre las mismas muestras se realizan mediciones sucesivas, modificando en cada caso solamente el tipo de atmósfera (NS y AS), los cocientes H/F obtenidos en soluciones NS resultan menores a aquéllos obtenidos en soluciones AS. Por otra parte los valores de H/F (NS) y H/F(AS) obtenidos

sucesivamente sobre la misma muestra (primero NS, segundo AS, tercero NS y así sucesivamente) son siempre los mismos, dentro del error experimental (figura 7).

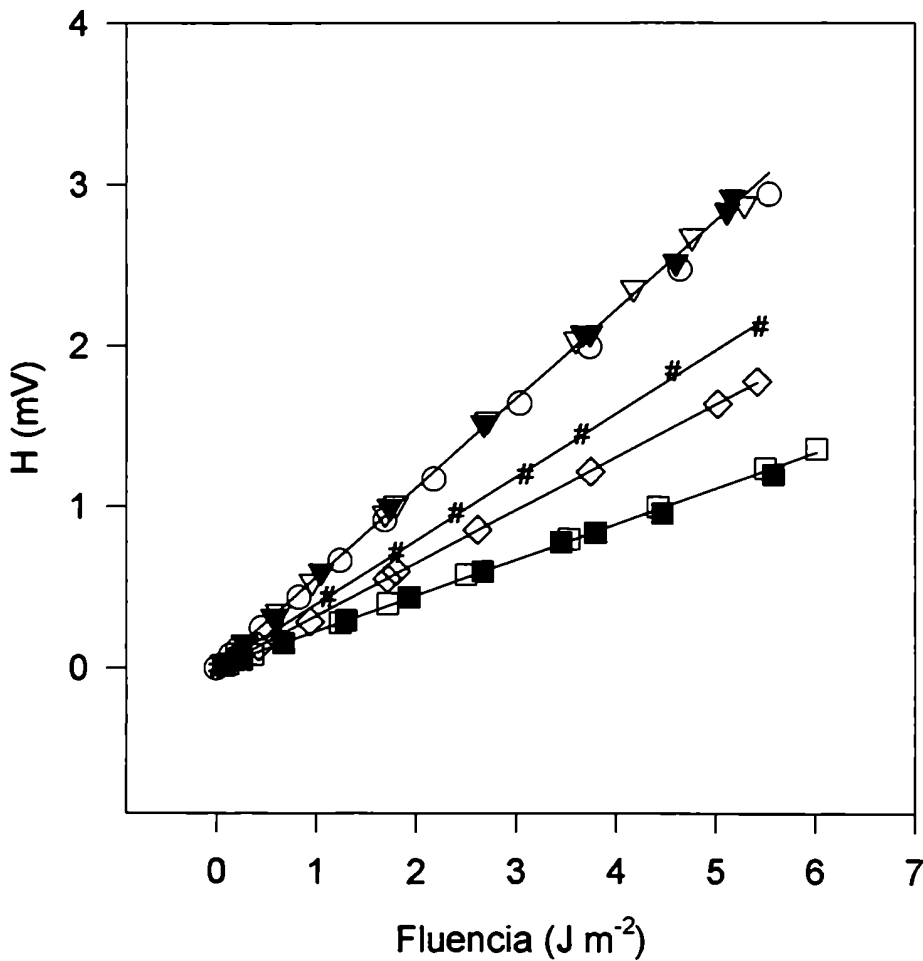


Figura 7. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia de excitación para soluciones en acetónitrilo de : (□) purina NS, (▽) purina AS, (■) purina NS, (▼) purina AS (estas cuatro mediciones fueron efectuadas sucesivamente sobre la misma solución), (#) purina Xe, (◇) purina MnCl₂, (○) 2-hidroxibenzofenona. Absorbancia = 0,089. λ_{exc} 266 nm. T = 298 K. AS = solución saturada con aire; NS = solución saturada con nitrógeno.

Estos resultados muestran que en soluciones saturadas con nitrógeno se genera un transiente cuyo tiempo de vida es superior al tiempo de resolución experimental (1 μ s, detector PZT) y por lo tanto actúa como una especie almacenadora de energía, y que éste es desactivado en forma no reactiva por el oxígeno.

Adicionalmente, cuando una solución de purina es saturada con Xe o con $MnCl_2$, se observa una clara disminución en el valor de la pendiente H/F, respecto de la solución saturada con nitrógeno (ver figura 8). Como es sabido, el $MnCl_2$ ha sido utilizado como un efectivo desactivante de la fluorescencia de indoles⁴⁴ y del estado triplete de la purina.⁴⁵ Por otra parte, el Xe ha sido descrito como desactivante de estados singulete⁴⁶ y triplete.⁴⁷

Un comportamiento análogo se pudo observar cuando se realizaron experiencias similares con la 6-metilpurina. Como se muestra en la figura 8, también en este caso se obtienen relaciones lineales entre la amplitud de la señal optoacústica y la fluencia del pulso láser para soluciones con diferentes concentraciones de 6-metilpurina.

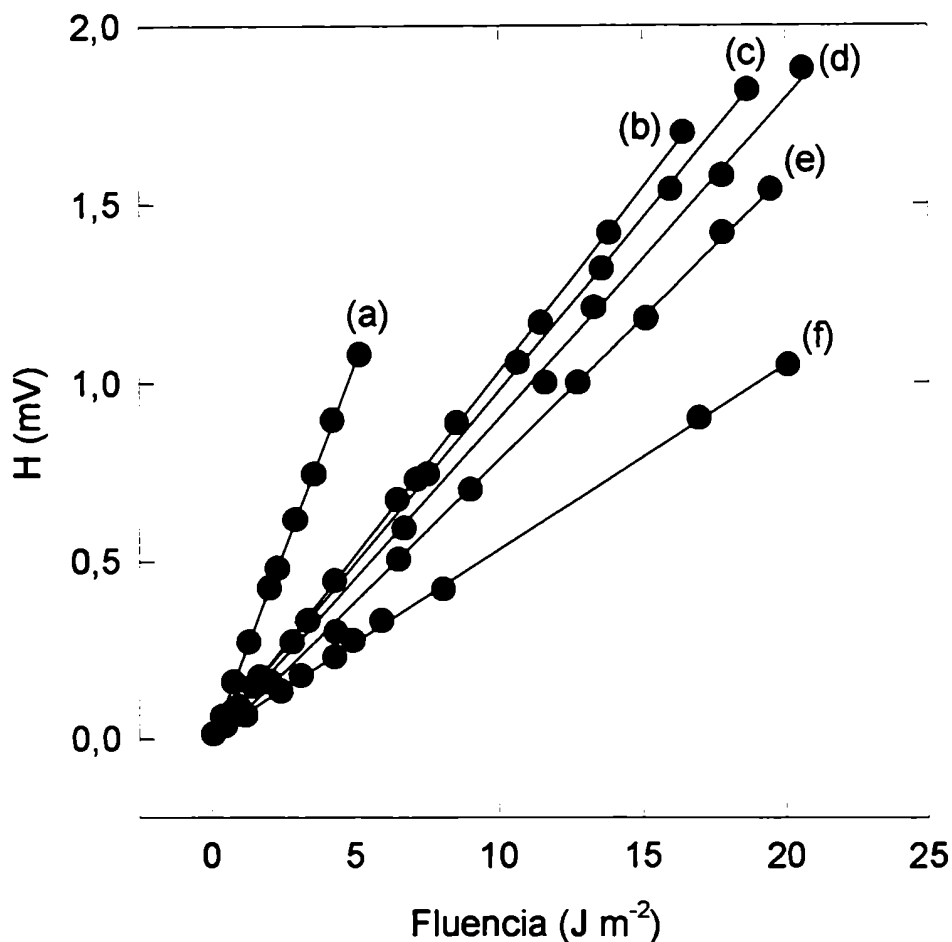


Figura 8. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia de excitación para soluciones con diferentes concentraciones de 6-metilpurina en acetonitrilo (NS). $\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$, $T = 298 \text{ K}$. (a) $A = 0,194$, (b) $A = 0,175$, (c) $A = 0,165$, (d) $A = 0,134$, (e) $A = 0,099$, (f) $A = 0,084$.

Por otra parte, también en este caso se detecta la formación de un transiente en atmósfera de nitrógeno que, como puede verse en la figura 9, es desactivado en forma no reactiva por el oxígeno (los valores de $H/F(\text{NS})$ y $H/F(\text{AS})$ son perfectamente reproducibles cuando se realizan medidas sucesivas sobre una misma solución de 6-metilpurina, cambiando sólo la atmósfera).

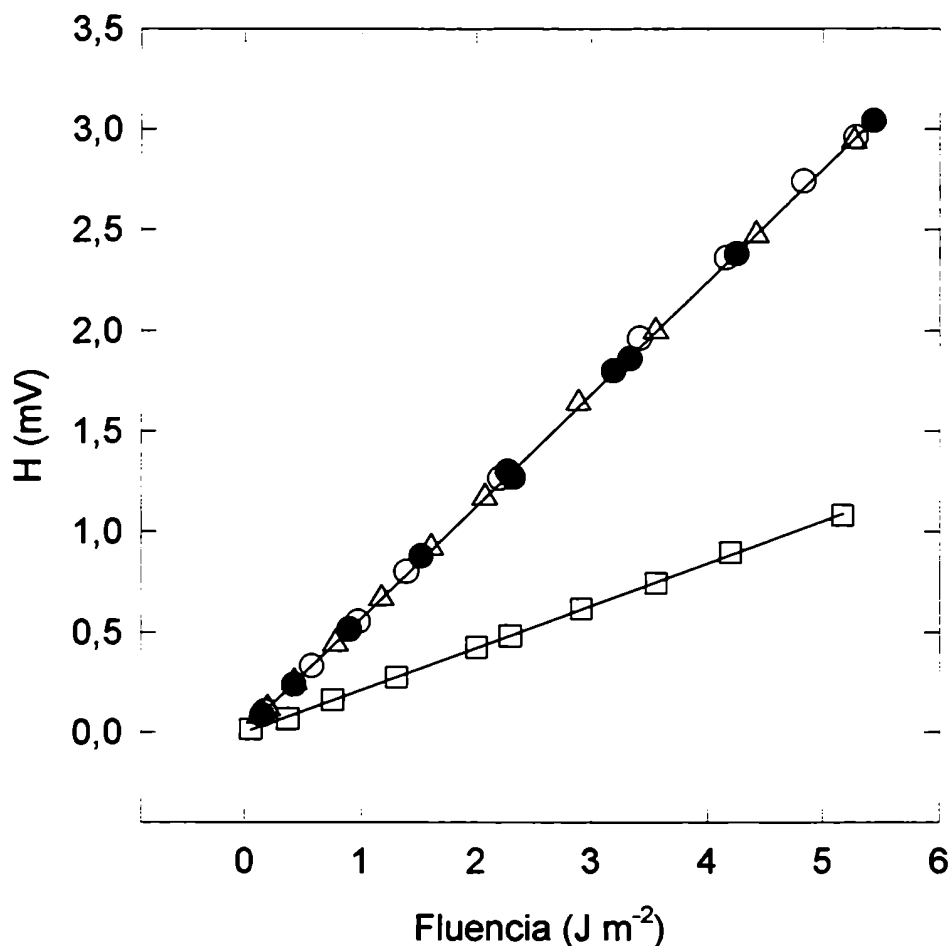


Figura 9. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia de excitación para soluciones en acetonitrilo de : (i) 6-metilpurina, (○) AS, (□) NS, (●) AS (estas tres mediciones fueron realizadas sucesivamente sobre la misma solución) y (ii) (Δ) 2-hidroxibenzofenona. AS = solución saturada con aire; NS = solución saturada con nitrógeno. La absorbancia de todas las soluciones fue 0,090. $\lambda_{exc} = 266$ nm, $T = 298$ K.

Como puede apreciarse en la figura 10, cuando se grafican los cocientes H/F en función de la fracción de la energía absorbida ($1-10^{-A}$), tanto para la purina

como para la 6-metilpurina en soluciones de acetonitrilo saturadas con nitrógeno, se obtienen relaciones lineales con la misma pendiente.

Utilizando 2-hidroxibenzofenona como referencia, y de acuerdo con las ecuaciones 6 y 7, se obtiene, para ambos compuestos en solución saturada con nitrógeno un valor de $\alpha = 0,38 \pm 0,02$.

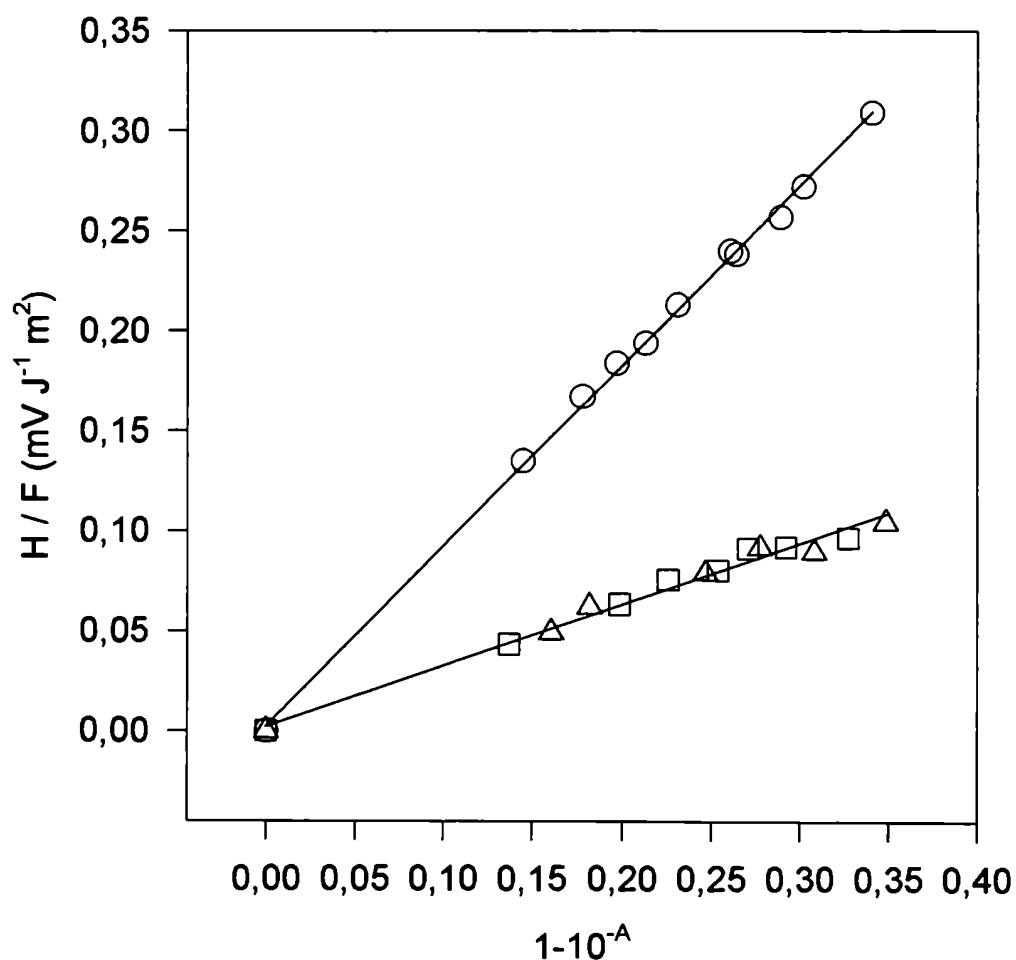


Figura 10. Cociente H/F en función de la fracción de energía absorbida para soluciones (NS) en acetonitrilo de : (□) purina , (Δ) 6-metilpurina y (○) 2-hidroxibenzofenona . NS = solución saturada con nitrógeno. $\lambda_{exc} = 266$ nm, T = 298 K.

Los resultados anteriores nos permiten postular que las mencionadas especies almacenadoras de energía corresponden a los estados excitados triplete de mas baja energía de ambos compuestos. Teniendo en cuenta el balance de energía de la ecuación 1, y considerando que en estas condiciones el rendimiento cuántico de fluorescencia es despreciable, podemos escribir la siguiente expresión:

$$N_A (h c / \lambda_l) = N_A \phi_{ci} E_T = N_A \alpha_S (h c / \lambda_l) \quad (8)$$

donde N_A es el número de Avogadro, h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, λ_l es la longitud de onda del láser, E_T es la energía del estado triplete vibracionalmente frío y ϕ_{ci} es el rendimiento cuántico de formación del estado triplete o rendimiento cuántico de cruce intersistemas.

A su vez, los valores de E_T fueron estimados a partir de los correspondientes espectros de fosforescencia a 77 K (ver figura 11), mediante la siguiente expresión:

$$E_T = h c / \lambda_p \quad (9)$$

donde λ_p es la longitud de onda correspondiente a la transición radiativa $^1S_0 \rightarrow ^3T_0$ en acetonitrilo a 77 K.

Como puede apreciarse en la figura 11 los espectros de fosforescencia de ambas purinas presentan un hombro en la zona de la transición 0-0, lo que permite

obtener una buena estimación de la energía del estado triplete (E_T). Tomando entonces estos valores de E_T , y los valores de α antes mencionados, se obtiene que tanto para la purina como para la 6-metilpurina, los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas son: $\phi_{ci} = 0,88 \pm 0,03$.

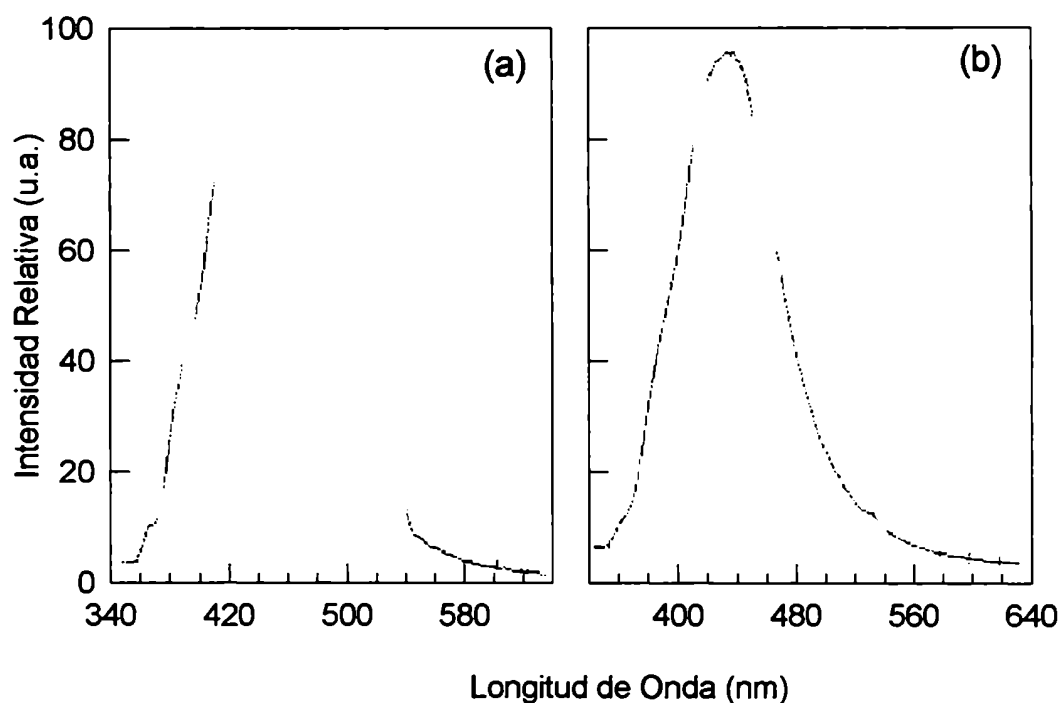


Figura 11. Espectros de fosforescencia de soluciones de (a) purina y (b) 6-metilpurina en acetonitrilo a 77 K.

Es interesante mencionar, que aunque Arce y col. caracterizaron el estado triplete de la purina en solución acuosa mediante la técnica de transferencia de energía,^{48,49} encontrando un tiempo de decaimiento de 1,7 μ s, no existe ninguna información sobre el valor de ϕ_{ci} .

Como se discutió previamente, los estados almacenadores de energía son desactivados por O_2 , $MnCl_2$ y Xe (figura 7), y esta desactivación no produce fotoblanqueo de la solución ni conduce a la formación de productos estables.

Existen antecedentes en la literatura que muestran que la desactivación fotofísica (no reactiva) de estados tripletes por oxígeno no ocurre sólo mediante transferencia de energía para generar $O_2(^1\Delta_g)$, sino que existe un mecanismo competitivo que es el cruce intersistemas $T_1 \rightarrow S_0$ inducido por el oxígeno.^{9,50}

Arce y col.⁴⁸ sugirieron que la desaparición del triplete de la purina en soluciones saturadas con aire se debe fundamentalmente a un mecanismo de transferencia de energía con la consiguiente formación de $O_2(^1\Delta_g)$. En nuestras condiciones experimentales, nosotros pudimos observar que igualando las absorbancias de soluciones de purina o 6-metilpurina con la de una solución de 2-hidroxibenzofenona (CR), cuando la solución está saturada con aire, el cociente H/F es el mismo para muestra y referencia ($\alpha = 1 \pm 0,05$, figura 7). Esto significa que una muy alta población del estado triplete es desactivada por el oxígeno. Teniendo en cuenta que el estado triplete de la purina es de naturaleza $\pi-\pi^*$,⁵¹⁻⁵³ y que para esta clase de tripletes las constantes de velocidad de desactivación por oxígeno son 1/9 del valor difusional⁵⁴ ($k_q = 2,6 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ en acetonitrilo), el 99,5 % de la población del estado triplete debería estar desactivada 1 μs después de la interacción con el pulso láser.

Dado que el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$ en acetonitrilo es suficientemente largo (50 μs)⁵⁵ como para asegurar que esa especie, en caso de formarse, jugaría el

rol de especie almacenadora de energía, se puede plantear para dicha situación el siguiente balance de energía:

$$E_a = \phi_{ci} f_{\Delta} E_{O_2(^1\Delta_g)} + \alpha E_a \quad (10)$$

donde $E_{O_2(^1\Delta_g)}$ es el contenido energético del $O_2(^1\Delta_g)$ y f_{Δ} es la fracción de tripletes desactivados que generan $O_2(^1\Delta_g)$. Considerando que $E_{O_2(^1\Delta_g)} = 0,9757$ eV^{56,57} y $\phi_{ci} = 0,88$, si f_{Δ} fuera unitario, el valor de α para la purina en atmósfera de aire debería ser 0,82. Sin embargo nuestros resultados experimentales nos llevan a un valor de $\alpha = 1 \pm 0,05$.

Considerando un error del 5 % en la determinación de los cocientes H/F, a partir de la ecuación 10 se calcula que, en caso de formarse $O_2(^1\Delta_g)$ esto ocurriría con una eficiencia $f_{\Delta} < 0,3$. Este resultado muestra que la transferencia de energía no es el mecanismo principal para explicar el desactivación de los tripletes purínicos por parte del oxígeno, y por lo tanto el mecanismo debe ser, al menos mayoritariamente, un cruce intersistemas inducido por el oxígeno.

Por otra parte, no se logró registrar ninguna señal cuando se intentó medir la fosforescencia infrarroja del oxígeno singulete en estado estacionario irradiando a las purinas y xantinas con una lámpara de xenon y utilizando un diodo de germanio como detector.

Similares resultados y conclusiones se obtienen para la 6-metilpurina.

Finalmente, es interesante señalar, que aunque normalmente se acepta que la fotoionización de purinas y xantinas a 266 nm ocurre mediante la absorción sucesiva de dos fotones, y con baja eficiencia,⁵⁸⁻⁶¹ Quinones y col.⁴⁹ propusieron que la ionización de la purina ocurriría mediante un proceso monofotónico.

Los umbrales de energía para estos procesos en acetonitrilo pueden expresarse de la siguiente forma:

$$E_i^{\text{CH}_3\text{CN}} = E_i + P^* + V_b \quad (11)$$

donde $E_i^{\text{CH}_3\text{CN}}$ es la energía de ionización para la transferencia electrónica desde la purina al acetonitrilo, E_i es la energía de ionización de una molécula aislada en el vacío, V_b es la energía de solvatación del electrón y P^* es la energía de polarización del medio por parte del catión resultante. P^* puede obtenerse a partir de la ecuación de Born:

$$P^* = (e^2/2R_+) (1-1/\epsilon) \quad (12)$$

donde e es la carga del electrón, R_+ es el radio de la esfera del catión (para las purinas $R_+ = 5 \text{ \AA}$), y ϵ es la constante dieléctrica. Para la purina, utilizando los valores $E_i = 9,5 \text{ eV}$, $P^* = 1,4 \text{ eV}$ y $V_b = 1,5 \text{ eV}$,⁵⁶ obtenemos $E_i^{\text{CH}_3\text{CN}} = 6,6 \text{ eV}$. Por lo tanto, la ionización monofotónica de la purina desde el estado S_0 utilizando excitación de 266 nm (4,66 eV) no sería termodinámicamente factible ni en acetonitrilo ni en agua ($E_i^{\text{H}_2\text{O}} = 6,45 \text{ eV}$), a menos que una fuerte interacción

específica solvente-purina, con una alta energía de solvatación para la producción del catión radical y del electrón solvatado pudiera otorgar una estabilización adicional.

En concordancia con las predicciones teóricas y con la literatura, nosotros no encontramos ninguna evidencia experimental de que ocurra un proceso de ionización monofotónica.

2.2.3 Respuesta optoacústica de purinas y xantinas utilizando altas fluencias de excitación.

Para realizar medidas con altos valores de fluencias de excitación, el haz del láser fue enfocado mediante lentes adecuadas, de forma tal de alcanzar valores de fluencias cercanos a los 14.000 J m^{-2} . En estas experiencias se utilizó un segundo tipo de detector (film de PVF_2), y como en las anteriores mediciones, en cada experiencia se utilizaron soluciones frescas.

Todos los compuestos estudiados muestran una relación lineal entre la amplitud de la señal fotoacústica y la fluencia de excitación utilizada para valores de $F < 2.000 \text{ J m}^{-2}$. Por encima de este valor se observan, según los casos, desviaciones positivas (figuras 12 a 15) y negativas (figura 17).

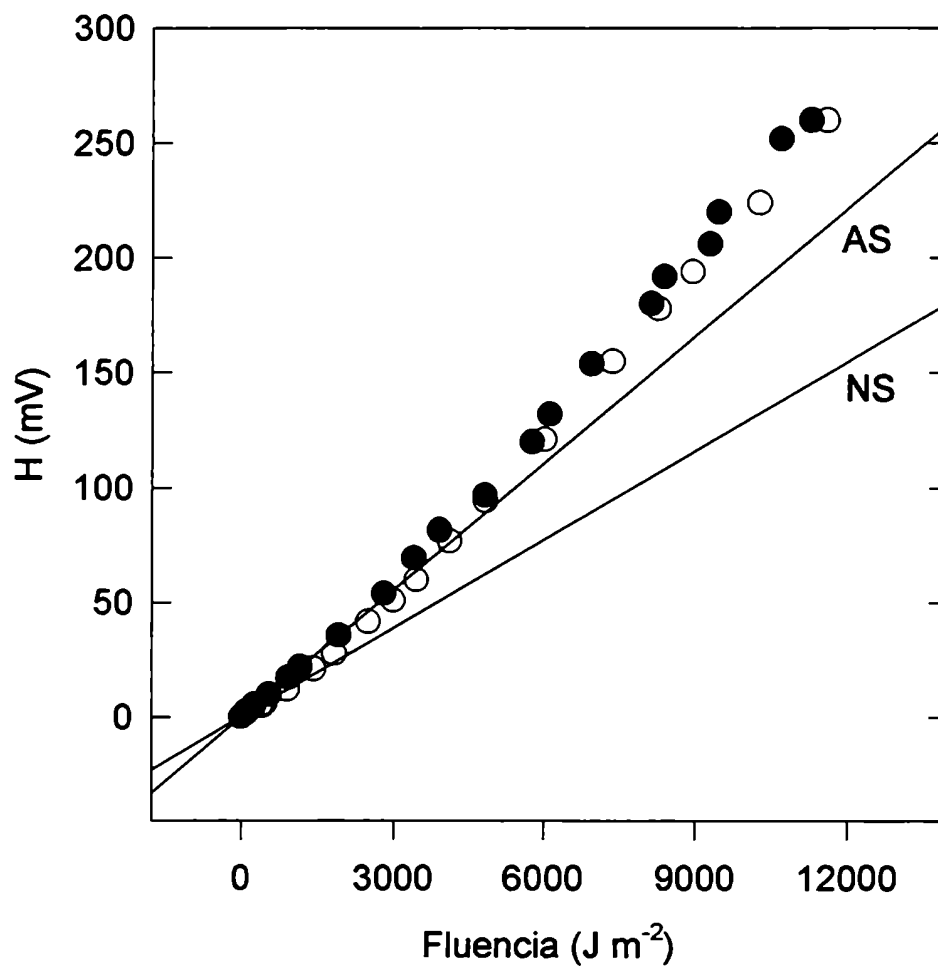


Figura 12. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de purina en acetonitrilo. (○) Solución saturada con aire (AS). (●) Solución saturada con nitrógeno (NS). $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

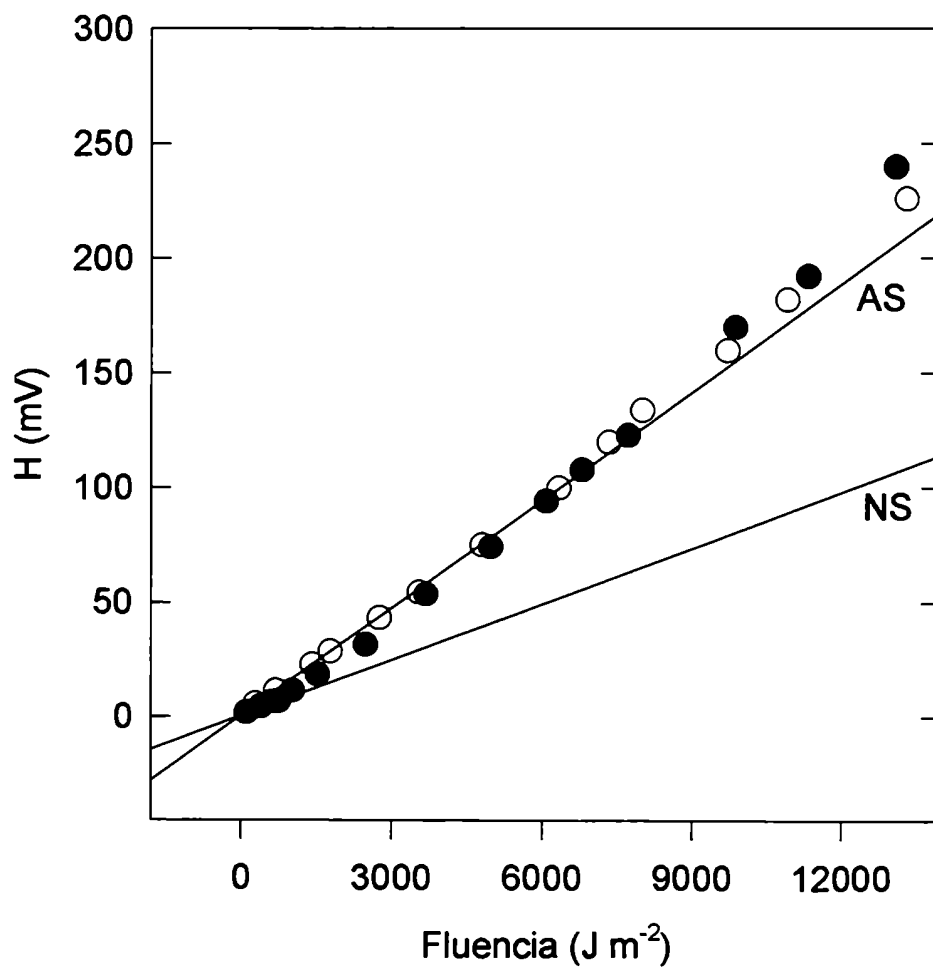


Figura 13. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de 6-metilpurina en acetonitrilo. (○) Solución saturada con aire (AS). (●) Solución saturada con nitrógeno (NS). $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

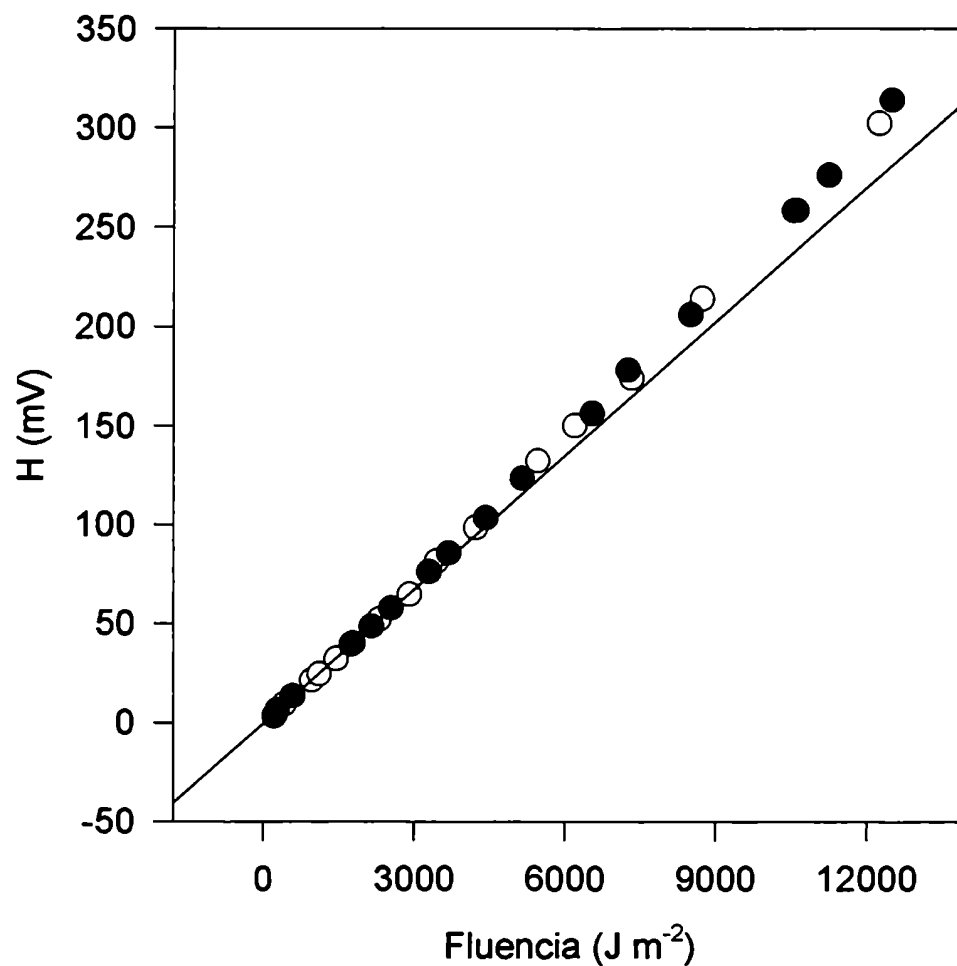


Figura 14. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de 6-metoxipurina en acetonitrilo. (O) Solución saturada con aire. (●) Solución saturada con nitrógeno. $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

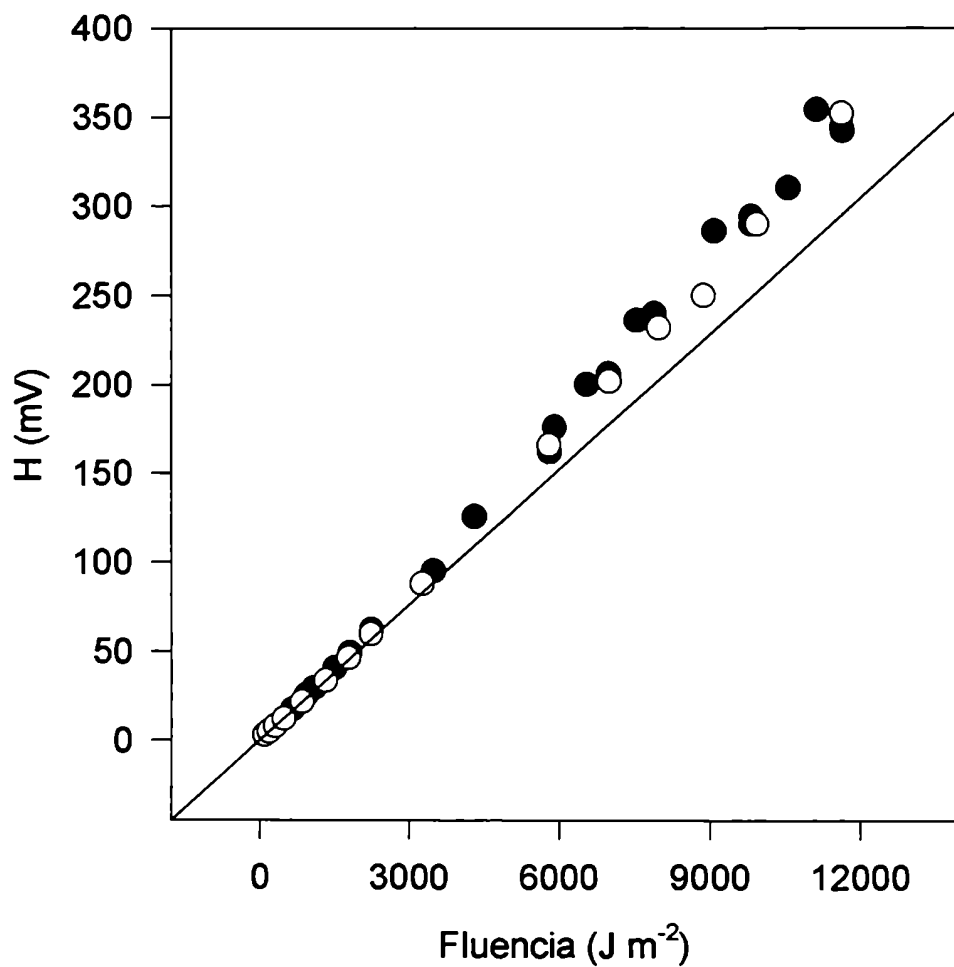


Figura 15. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de 6-cloropurina en acetonitrilo. (○) Solución saturada con aire. (●) Solución saturada con nitrógeno. $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

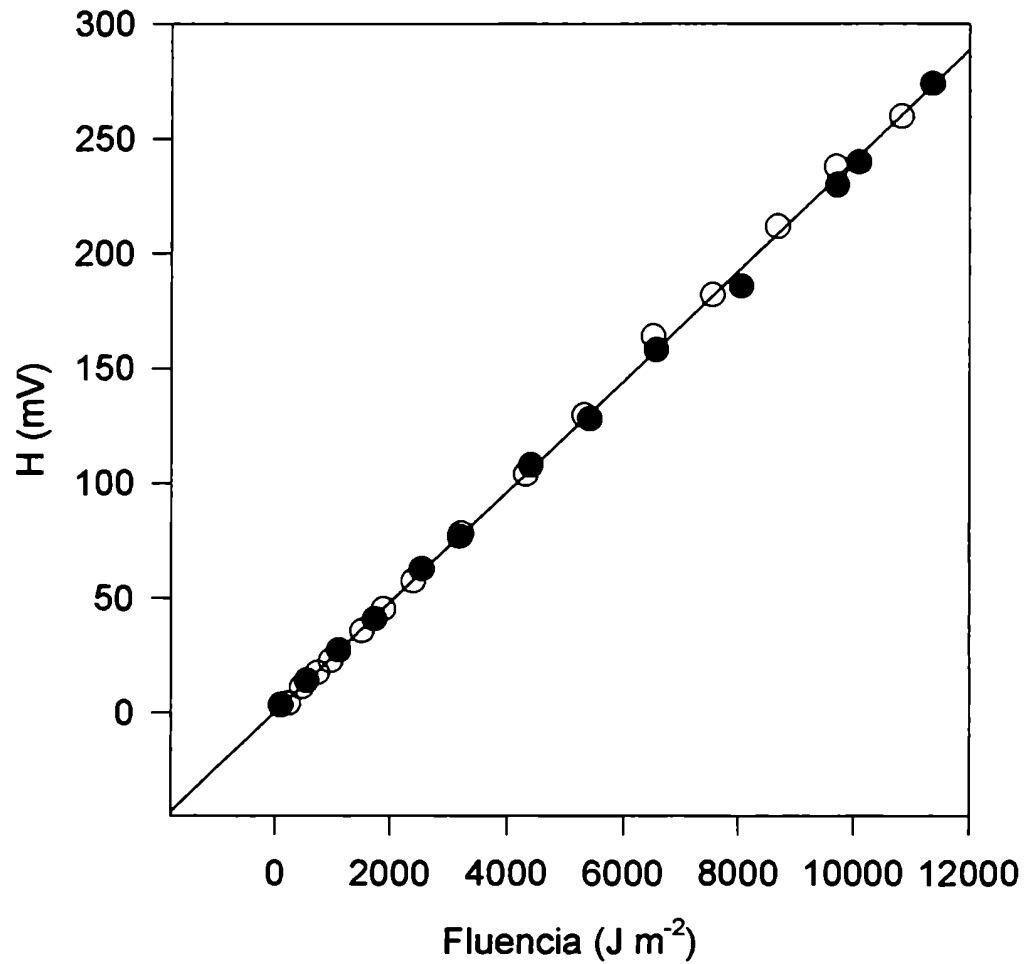


Figura 16. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de 6-aminopurina (adenina) en acetonitrilo. (○) Solución saturada con aire. (●) Solución saturada con nitrógeno. $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

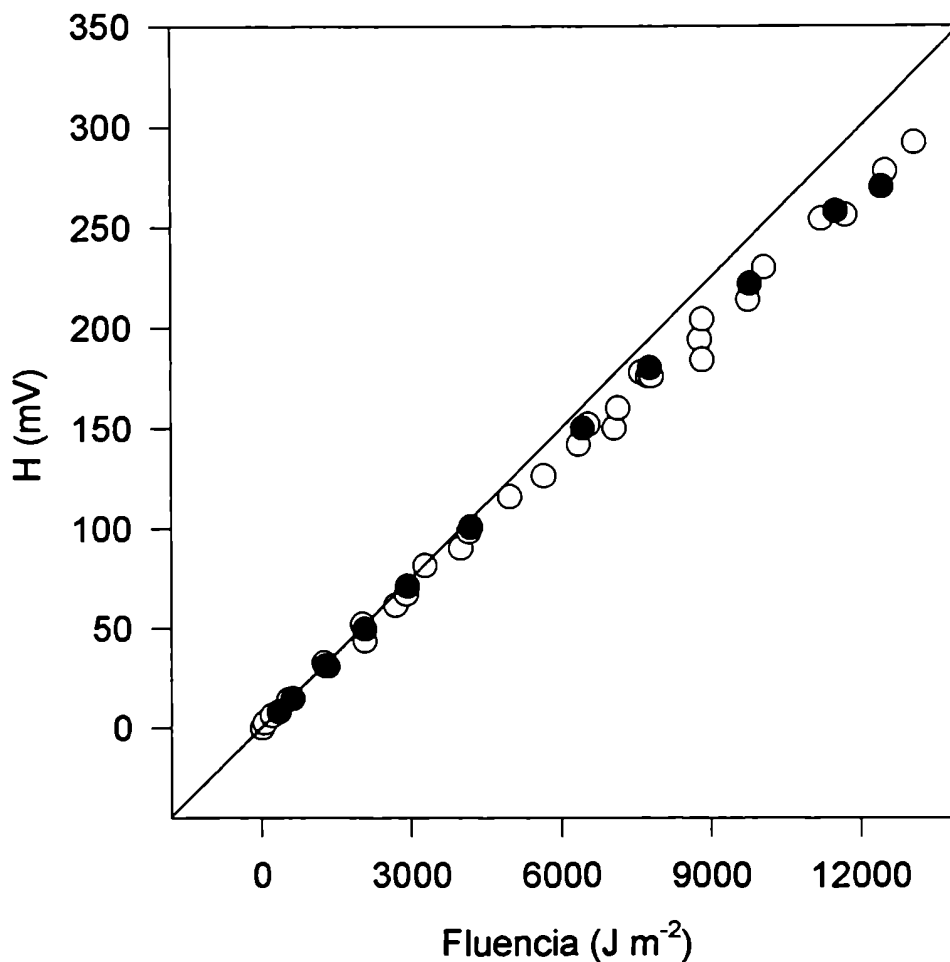


Figura 17. Amplitud de la señal acústica en función de la fluencia del pulso láser para una solución de teofilina en acetonitrilo. (O) Solución saturada con aire. (●) Solución saturada con nitrógeno. $T = 298 \text{ K}$. $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

Teniendo en cuenta el paso óptico de la celda que contiene a la muestra (1cm), cuando la absorbancia de la solución es aproximadamente 0,1, un pulso de fluencia 220 J m^{-2} ($\lambda = 266 \text{ nm}$) produciría una concentración de estados excitados de magnitud aproximadamente $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Dado que la concentración molar de los compuestos purínicos en una solución de esa absorbancia es aproximadamente

10^{-5} mol dm⁻³, sería esperable observar desviaciones negativas de la relación H vs. F para valores de F menores que 220 J m⁻², debido al fotoblanqueo del estado fundamental de la muestra. El hecho de que se obtengan relaciones lineales hasta valores tan altos de fluencia puede ser explicado teniendo en cuenta que el decaimiento del estado excitado singulete al estado fundamental (picosegundos) es suficientemente rápido como para ocurrir dentro del ancho temporal del pulso láser (nanosegundos). Dado que la misma molécula puede excitarse y retornar al estado fundamental varias veces durante el pulso, el fotoblanqueo del estado fundamental y la concentración del estado excitado S₁ serán mucho menores que lo esperado. Sin embargo, cuando la fluencia es muy alta, pueden ocurrir desviaciones negativas como consecuencia de la aparición de emisión estimulada.

De la misma manera, pueden producirse desviaciones positivas debido a la absorción simultánea de dos fotones por parte de moléculas en su estado fundamental, o a la absorción de fotones por parte de moléculas ya excitadas. En este último caso, para obtener una desviación positiva, el coeficiente de absorción molar del estado excitado debe ser mayor que el producto del coeficiente de absorción molar del estado fundamental por el valor de α para el proceso que ocurre luego de la absorción del primer fotón.

Como consecuencia, el comportamiento resultante dependerá de las contribuciones relativas de cada uno de los procesos explicados anteriormente.

Para evaluar la posibilidad de que los fotones de 266 nm sean absorbidos por los estados excitados S₁, utilizamos programas de modelados molecular que permiten predecir los espectros electrónicos de absorción UV-visible tanto desde el

estado fundamental ($S_0 \rightarrow S_1$) como desde el primer estado singlete excitado ($S_1 \rightarrow S_n$). En primer lugar se optimizaron las geometrías moleculares mediante el método semiempírico PM3, y luego mediante un cálculo puntual utilizando el método ZINDO/S se obtuvieron las longitudes de onda y fuerzas del oscilador para todas las transiciones de las moléculas estudiadas (ver tabla 1).⁶²

Tabla 1. Fuerzas del oscilador calculadas para las absorciones desde los estados S_0 y S_1 a una longitud de onda cercana a 266 nm.

Compuesto ^a	Fuerza del oscilador (f) ^b (Probabilidad de la transición)	
	$S_0 - S_1$	$S_1 - S_n$
Purina	0,287	0,339
6-Metilpurina	0,246	0,306
6-Metoxipurina	0,208	0,355
6-Aminopurina (Adenina)	0,197	0,383
Teofilina	0,347	0,354

^a La 6-cloropurina no fue modelada porque el átomo de cloro no está parametrizado en el método ZINDO/S.

^b Se utilizó el método ZINDO/S.

Resulta interesante mencionar que los espectros de absorción obtenidos mediante estos métodos de cálculo para el estado fundamental de cada compuesto en fase gaseosa, coinciden muy bien con los espectros medidos experimentalmente en solución.

Como puede observarse en la tabla 1, para la 6-metoxipurina, el valor de la fuerza del oscilador para la transición de longitud de onda larga $S_1 \rightarrow S_n$ es 1,7 veces mayor que para la transición $S_0 \rightarrow S_1$. Es decir que desde el estado S_1 la absorción de un fotón de 266 nm es más probable que desde el nivel S_0 . Este resultado teórico coincide con el conocimiento experimental de que algunos compuestos purínicos pueden absorber sucesivamente dos fotones de 266 nm (4,66 eV), poblando estados electrónicos denominados de quasi-Rydberg (S_N).⁵⁸ Sin embargo, dado que el tiempo de vida del estado S_1 de los compuestos purínicos es de unos pocos picosegundos^{58,63,64} la absorción del segundo fotón, cuando la duración del pulso láser es de algunos nanosegundos, sólo puede ocurrir cuando se utilizan fluencias muy altas.⁵⁸ Este podría ser el caso para la 6-metoxipurina y 6-cloropurina (figuras 14 y 15), donde las desviaciones positivas ocurren desde 2000 J m^{-2} en adelante, y para las cuales no se detectó formación del estado triplete.

Respecto al estado de quasi-Rydberg S_N , su energía es superior al umbral de energía requerido para la formación del par catión radical-electrón solvatado. La ionización de moléculas aromáticas puede entenderse como una transferencia electrónica de un estado electrónicamente excitado y vibracionalmente no relajado al solvente, mediante algún tipo de estado de transferencia de carga, donde el electrón excitado se encuentra deslocalizado sobre la esfera de solvatación de la

molécula en cuestión. Este proceso puede conducir a la formación del catión radical del soluto y del electrón solvatado ($((\text{CH}_3\text{CN})_2\cdot^-)$) o revertir mediante una transferencia electrónica inversa, al soluto neutro en su estado fundamental, liberando energía en forma de calor.

El bajo fotoblanqueo de las muestras (aproximadamente 1 % o menor) observado para todos los compuestos estudiados luego de irradiarlos durante 20 ó 30 minutos con altas fluencias de excitación, estaría de acuerdo con una eficiente reversión de la transferencia electrónica.

Cuando soluciones saturadas en aire son sometidas al mismo tratamiento, los porcentajes de blanqueo de las muestras resultan mayores; esto se debe simplemente a que el oxígeno es un eficiente atrapante de electrones y quencher químico.

Candeias y col.⁵⁹ demostraron que cuando se utiliza una fuente de excitación de 193 nm, el rendimiento cuántico de ionización monofotónica de compuestos purínicos en agua es aproximadamente 10^{-2} , por lo tanto parece razonable obtener bajos rendimientos para el proceso bifotónico en acetonitrilo.

Como se ve en la figura 16, la adenina presenta una relación lineal entre la señal fotoacústica y la fluencia de excitación para todo el rango de fluencias estudiadas. Este resultado anómalo no puede ser explicado fácilmente, ya que la fuerza del oscilador para la transición $S_n \rightarrow S_1$ resulta 1,9 veces superior a la de la transición $S_0 \rightarrow S_1$ (tabla 1). Se requerirían experimentos adicionales para explicar este resultado.

Por otra parte, la purina y la 6-metilpurina presentan una interesante respuesta optoacústica al trabajar a altas fluencias. Como puede verse en las figuras 12 y 13, para soluciones saturadas con aire, se observa una suave desviación positiva a valores de fluencia superiores a 2000 J m^{-2} , siendo este comportamiento similar al observado para la 6-metoxipurina y la 6-cloropurina (figuras 14 y 15). Sin embargo, cuando las experiencias son realizadas con soluciones saturadas con nitrógeno, se obtienen importantes desviaciones positivas a partir de valores de fluencias del orden de 500 J m^{-2} .

Dado que los tiempos de vida de los estados singlete de la purina y 6-metilpurina son de unos pocos picosegundos, y que los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas son muy altos ($\phi_{ci} = 0,88$ para ambos compuestos), cuando se utilizan altas fluencias la concentración de estados tripletes que se obtiene dentro del tiempo del pulso láser es muy alta. Cuando esta concentración de moléculas electrónicamente excitadas en estado triplete es alta, dado que su tiempo de vida es muy largo respecto de la duración del pulso, la absorción de un segundo fotón por las mismas es altamente probable.

Como ha sido explicado anteriormente, la absorción de un segundo fotón de 266 nm resulta en la formación de estados de quasi-Rydberg (en este caso T_N). A partir de estos estados, debido a su corto tiempo de vida,^{58,65,66} la energía absorbida es convertida casi completamente en calor dentro del tiempo de resolución experimental (150 ns o 1 μs , según se use detector PZT o PVF₂), obteniéndose así una desviación positiva. Una pequeña proporción de los estados T_N se desactivarían mediante un proceso de ionización, como lo indica el bajo porcentaje

de fotoblanqueo (~1 %) que se observa al irradiar las muestras con altas fluencias durante 20 ó 30 minutos. También en este caso el porcentaje de blanqueo aumenta ligeramente cuando las experiencias se realizan con soluciones saturadas con aire.

En soluciones saturadas con aire, el estado triplete es eficientemente desactivado por el oxígeno, resultando por lo tanto un comportamiento similar al observado para la 6-metoxipurina y la 6-cloropurina.

Finalmente, para el caso de soluciones de teofilina saturadas con nitrógeno, se obtienen relaciones H vs. F lineales hasta valores de F de 2000 J m^{-2} , y por encima de ese valor se registran pequeñas desviaciones negativas (figura 17). La fuerza del oscilador para la transición $S_1 \rightarrow S_n$ de la teofilina es similar a la correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ (tabla 1), por lo tanto, las desviaciones positivas debidas a la absorción sucesiva de dos fotones son menos importantes que para el caso de las purinas, y aquellos efectos que conducen a la aparición de desviaciones negativas (ver comienzo de esta discusión) adquieren mayor importancia relativa.

2.3 Resumen y conclusiones.

En el presente trabajo de tesis, utilizando la técnica LIOAS se logró determinar el parámetro α para distintas purinas (purina, 6-metilpurina, 6-metoxipurina, adenina y 6-cloropurina) y xantinas (cafeína y teofilina). En los casos de la purina y de la 6-metilpurina se obtuvieron valores de $\alpha = 0,38 \pm 0,02$. A partir de este valor de α y estimando las energía de los estados tripletes mediante la técnica de fosforescencia a 77 K se determinó el rendimiento cuántico de cruce

intersistemas para ambas purinas, obteniéndose un valor de $\phi_{ci} = 0,88 \pm 0,03$. Para el resto de los compuestos estudiados se obtuvieron valores de $\alpha = 1 \pm 0,05$, lo cual implica que casi la totalidad de la energía absorbida por las moléculas es devuelta al medio en forma de calor en un tiempo inferior a 1 μ s.

Por otra parte, se pudo establecer que si bien los estados triplete de la purina y la 6-metilpurina son eficientemente desactivados por el oxígeno molecular, esta desactivación ocurre mayoritariamente debido a un cruce intersistemas inducido por el oxígeno y no por transferencia de energía. Este resultado coincide además con la ausencia de señal de emisión a 1270 nm debida a la fosforescencia del oxígeno excitado singulete.

Se estudió además la respuesta optoacústica de las distintas xantinas y purinas utilizando altas fluencias de excitación. Para valores de fluencias superiores a 2000 J m⁻² se observaron desviaciones positivas y negativas de la linealidad según cual fuera el sustrato estudiado. Estas desviaciones se analizaron teniendo en cuenta los espectros de absorción de los estados excitados calculados por modelado molecular (métodos PM3 y ZINDO/S).

Finalmente, se establecieron nuevas referencias calorimétricas para una zona del espectro electromagnético donde no existía ningún precedente en la literatura, y se extendió además el uso de la 2-hidroxibenzofenona como referencia a 266 nm.

2.4 Sección experimental.

2.4.1 Reactivos y solventes.

Las xantinas (Nacalai Tesque Inc.), purinas y 2-hidroxibenzofenona (Aldrich Chemical Co. Inc.) utilizadas son de máxima pureza (la pureza se controló por ccd y por CG) y no fue necesaria su purificación adicional. El acetonitrilo y el etanol (J. T. Baker, grado HPLC), luego de controlar su calidad por espectrofotometría UV-visible, se utilizaron tal como se los recibió. El $MnCl_2$ es de la máxima pureza disponible (Merck Suprapur). Los gases utilizados (Xe, N_2 , Ar y O_2) fueron provistos por AGA.

2.4.2 Controles de estabilidad fotoquímica.

La estabilidad fotoquímica de las xantinas y purinas se determinó irradiando soluciones de las mismas de diferentes concentraciones (1×10^{-2} mol dm^{-3} a 1×10^{-5} mol dm^{-3}) en acetonitrilo y en etanol.

Las irradiaciones se realizaron colocando las soluciones en celdas de cuarzo de espectrofotometría de absorción de 1 cm x 1 cm. El portaceldas se montó en un banco óptico de construcción casera. Como fuente de excitación se utilizó o bien una lámpara de mercurio de baja presión (Hareaus GmbH POH-EL; $\lambda = 254$ nm) o una lámpara de arco de xenón OSRAM XBO de 450 W cuya luz se hizo pasar previamente por un filtro de agua y por un monocromador.

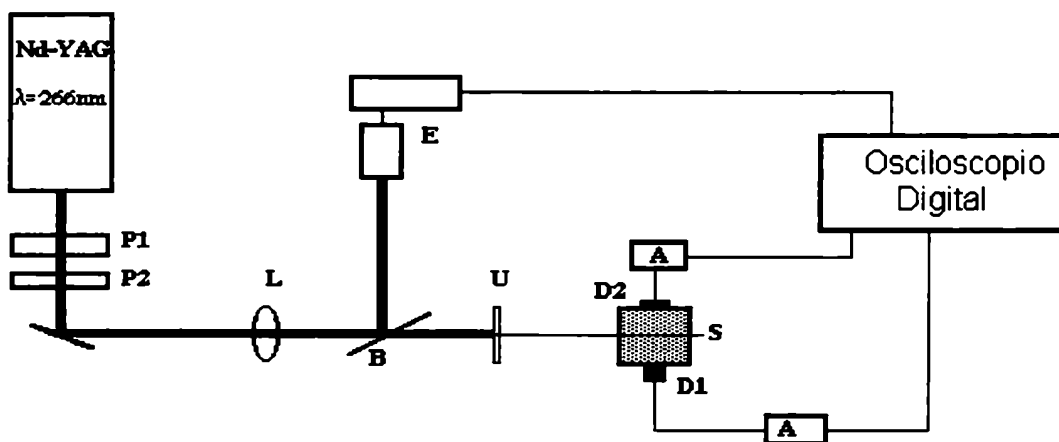
Las reacciones se monitorearon por espectrofotometría UV-visible (Hewlett Packard 8451-A y Shimadzu 160), por cromatografía de adsorción en capa delgada

de sílica-gel y por cromatografía gaseosa (Hewlett Packard 5840-A) utilizando indistintamente columnas capilares HP-5 y HP-17.

En ningún caso se observó consumo de las xantinas y purinas ni aún después de 24 horas de irradiación.

2.4.3 Medidas optoacústicas.

En la figura 1 se muestra un esquema del dispositivo experimental montado para realizar estas medidas.



Esquema 3. Esquema del dispositivo experimental de LIOAS. P1 y P2, polarizadores. L, lente. B, divisor de haz. U, *pin hole*. E, medidor de energía. D1 y D2 transductores piezoeléctricos. S, muestra. A, amplificadores.

La fuente de excitación empleada es la cuarta armónica ($\lambda = 266 \text{ nm}$) de un láser pulsado, Q-switched de Nd^{+3} -YAG (Surelite II, Continuum) con un ancho de pulso de 7 ns. La celda donde se coloca la muestra (S) es una cubeta espectrofotométrica

de cuarzo para UV lejano de 1 cm x 1 cm, provista de una tapa a rosca con septum de teflon-siliconas (Wilmad). El calor depositado por las muestras es monitoreado por dos tipos de transductores piezoeléctricos (D1 y D2). Para analizar el comportamiento de las moléculas a altas fluencias de excitación el haz del láser es enfocado mediante una lente de cuarzo de distancia focal 80 cm (L), que produce un haz cilíndrico de 100 μm de diámetro, y se utiliza como detector un film de fluoruro de polivinilideno (PVF₂)⁶⁷ en contacto con el fondo de la celda (D1). En este tipo de experimentos el tiempo de respuesta del sistema es de 150 ns. Para bajas fluencias se utilizó un transductor piezoeléctrico cerámico resonante de Pb-Zr-Ti (PZT, 4x4 mm) pegado a una de las paredes de la celda mediante un film de siliconas (D2). En este caso, el diámetro del haz del láser se controló mediante un *pin hole* de 1 mm de diámetro (U), y el tiempo de resolución fue de 1 μs . Para variar la energía se utilizaron dos polarizadores (P1 y P2) montados en un sistema *made at home* que permite rotar uno respecto al otro.

Las señales acústicas son amplificadas (A) y luego procesadas con un osciloscopio digital (TDS 540, Tektronix). Las medidas de energía se realizaron con un detector piroeléctrico (E) (RjP-765, Laser Precision) utilizando un divisor de haz de cuarzo (B). Todas las medidas fueron realizadas promediando las señales de 64 o 128 disparos para aumentar la relación señal ruido.

Tal como se muestra en la figura 18, se utilizó la amplitud del primer pulso acústico (H) como medida del calor rápido entregado al medio por el sistema.

La absorbancia de las soluciones se controló antes y después de cada experimento para descartar la posibilidad de fotoblanqueo de las muestras. Para ello

se utilizaron espectrofotómetros Beckman DU-65 y Hewlett Packard 8451-A. En todos los casos los experimentos se realizaron con soluciones frescas. Las absorbancias de las muestras fueron variadas entre 0,06 y 0,20. Cuando fue necesario las muestras fueron burbujeadas con N_2 , O_2 , Xe o Ar durante 15 minutos antes de la medida.

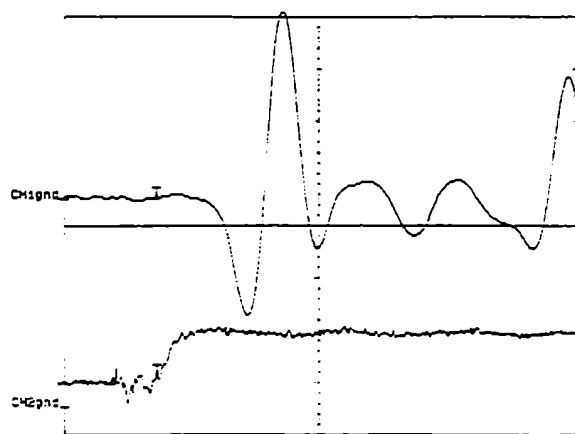


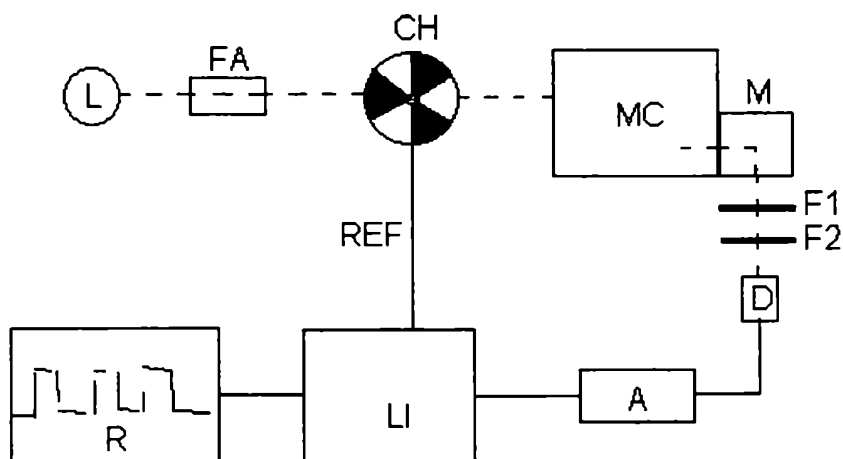
Figura 18. Onda acústica típica registrada con un detector cerámico (PZT).

2.4.4 Determinaciones de fluorescencia y fosforescencia.

Los controles de emisión fluorescente a temperatura ambiente y las mediciones de los espectros de fosforescencia a 77 K para estimar las energías de los estados triplete se realizaron con un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-5 (ver detalles en el capítulo 1).

2.4.5 Fosforescencia de oxígeno singulete. Detección estacionaria.

Se empleó el equipo que se muestra en el esquema 4.



Esquema 4. Equipo de detección estacionaria de fosforescencia de oxígeno singlete. L, lámpara. FA, filtro de agua. CH, *chopper*. MC, monocromador. M, muestra. F1 y F2 filtros. D, detector. A, amplificador. LI, amplificador lock-in. R, registrador.

La excitación monocromática se efectuó mediante una lámpara (L) de arco de xenón (OSRAM XBO) de 450 W, cuya luz se hizo pasar en primer lugar por un filtro de agua (FA) y luego por un monocromador (MC) para finalmente incidir sobre la muestra colocada en una celda de fluorescencia (M) ubicada inmediatamente a la salida del monocromador. Antes de la entrada al monocromador, se colocó un *chopper* mecánico (CH) (Stanford SR 540) para modular el haz de excitación. La emisión del oxígeno singlete se detectó a 90° con un fotodiodo (D) de germanio de 5 mm de diámetro (Judson J16-8SP-R05M) colocado sobre la pared de la cubeta. La longitud de onda de emisión se restringió por medio de dos filtros (F1 y F2) colocados antes del detector: un filtro de corte

de silicio a 1050 nm (Glen Spectra) y uno de interferencia centrado a 1270 nm, con 80 nm de ancho de banda y 60% de transmitancia en el máximo (Spectrogon).

La salida del detector fue amplificada (A) y luego enviada a un amplificador *lock-in* (LI) (Stanford SR 530) para recobrar la señal. La referencia externa para el amplificador *lock-in* fue provista por el *chopper*. La salida del *lock-in* se graficó en un registrador (R) de tipo x-t (Siemens C 1011).

2.4.6 Modelado molecular.

Para calcular las diferencias de energías entre el estado electrónico fundamental y los primeros estados excitados, y poder reproducir los espectros electrónicos de absorción, la geometría de las moléculas se optimizó utilizando la teoría semiempírica de orbitales moleculares. Para ello se utilizó el método PM3 tal cual está implementado en el programa HyperChem.⁶² Estos cálculos se realizaron utilizando la aproximación restringida de Hartree Fock (RHF), límite de convergencia 0,001, gradiente RMS 0,001 Kcal (Å mol) y el método de gradiente conjugado de Polak-Ribiere.

Para calcular los espectros UV-visible se realizaron cálculos puntuales mediante el método ZINDO/S (RHF, CI). La interacción de configuraciones (CI) fue realizada con criterio orbital 12:12. Para realizar estos cálculos puntuales se partió de las geometrías previamente optimizadas mediante el método PM3.

2.5 Referencias.

- (1) Braslavsky S. E. (1986) Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and substances of biological interest. *Photochem. Photobiol.* **43**, 667-675.
- (2) Malkin S., M. Charland y R. M. Leblanc (1992) Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. *Photosynthesis Res.* **33**, 37-50.
- (3) Poulet P., D. Cahen y S. Malkin (1983) Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 433-446.
- (4) Bults G., P. E. Nordal y S. O. Kanstad (1982) In vivo studies of gross photosynthesis in attached leaves by means of photothermal radiometry. *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 234-237.
- (5) Amsellem Z., M. A. K. Jansen, A. R. J. Driesenaar y J. Gressel (1993) Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *cornyza*. *Plant Physiol.* **103**, 1097-1106.
- (6) Bults G., B. A. Horwitz, S. Malkin y D. Cahen (1982) Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange. *Biochim. Biophys. Acta* **679**, 452-465.
- (7) Malkin S., N. Lasser-Ross, G. Bults y D. Cahen (1981) *Photoacoustic Spectroscopy in Photosynthesis*; Balaban: Philadelphia.
- (8) Malkin S., M. S. Churio, S. Shochat y S. E. Braslavsky (1994) Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial

-
- photosynthesis. A laser induced optoacoustic study. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **23**, 79-85.
- (9) Braslavsky S. E. y G. H. Heibel (1992) Time-resolved photothermal and Photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chem. Rev.* **92**, 1381-1410.
- (10) Patel C. K. N. y A. C. Tam (1981) Pulsed optoacoustic spectroscopy of condensed matter. *Rev. Modern Phys.* **53**, 517-413.
- (11) Feitelson J. y D. Mauzerall (1996) Photoacoustic evaluation of volume and entropy changes in energy and electron transfer. Triplet state porphyrin with oxygen and naphthoquinone-2-sulfonate. *J. Phys. Chem.* **100** 7698-7703.
- (12) Wayner D. D. M., E. Luszyk, K. U. Ingold y P. Mulder (1996) Application of photoacoustic calorimetry to the measurement of the O-H bond strength in vitamine E (α - and δ -tocopherol) and related phenolic antioxidants. *J. Org. Chem.* **61** 6430-6433.
- (13) Helms A. M. y R. Caldwell (1995) Triplet species from norbornadiene. Time resolved photoacoustic calorimetry and ab initio studies of nergy, geometry and spin-orbit coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 358-361.
- (14) Wayner D. D. M., E. Luszyk, D. Pagé, K. U. Ingold, P. Mulder, L. J. J. Laarhoven y H. S. Aldrich (1995) Effects of solvation on the enthalpies of reaction of *tert*-butoxyl radicals with phenol and on the calculated O-H bond strength in phenol. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 8737-8744.

-
- (15) Steinmaus H., I. Rosenthal y D. Elad (1971) Light-and γ -ray induced reactions of purines and purine nucleosides with alcohols. *J. Org. Chem.* **36** 3594-3598.
- (16) Calkins J., E. Colley y J. Hazle (1982) The use of caffeine as a liquid filter in coaxial flashlamp pumped dye lasers. *Optics Comm.* **42** 275-277.
- (17) Parkanyi C., D. Bovin, , D-Ch. Shich, S. Tunbrant, J. J. Aaron y A. Tine (1984) The effect of pH on the electronic absorption, fluorescence and phosphorescence spectra of purines and pyrimidines. Determination of the lowest excited singlet and triplet state ionization constants *J. Chim. Phys.* **81**, 21-31.
- (18) Aaron, J. J. y J. D. Winefordner (1973) Lowest excited triplet-state dissociation constants of purines in aqueous solution. Substituent effect. *Photochem. Photobiol.* **18**, 97-102.
- (19) Andino M. M., C. G. Lima y J. D. Winefordner (1987) Luminescence characteristics of caffeine and theophylline. *Spectrochim. Acta* **43A**, 427-437.
- (20) Ni T. Q. y L. Melton (1992) Non-radiative decay lifetime standars. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **67**, 167-172.
- (21) Arnaut L. G. y R. A. Caldwell (1992) The heat of formation of the benzophenone ketyl radical by time-resolved photoacoustic calorimetry. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **65**, 15.
- (22) Terazina M., T. Azumi y N. J. Hirota (1992) Photothermal reinvestigation on the dark triplet states. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **65**, 21-28.

-
- (23) Bilmes G. M., J. O. Tocho y S. E. Braslavsky (1987) Laser-induced optoacoustic studies of the photoisomerization of the laser dye 3-3 diethyloxadicarbocyanine iodide (DODCI). *Chem. Phys. Lett.* **134**, 335-430.
- (24) Bilmes G. M., J. O. Tocho y S. E. Braslavsky (1988) . Spectrum, energy content and relaxation mechanisms of the photoisomer of the laser dye 3-3'-diethyloxadicarbocyanine iodide (DODCI). Laser-induced optoacoustic studies. *J. Phys. Chem.* **92**, 5958-5962.
- (25) Bilmes G. M., J. O. Tocho y S. E. Braslavsky (1989) Photophysical processes of polymethine dyes. An absorption, emission, and optoacoustic study on 3,3'-diethylthiodicarbocyanine iodide (DTDCI). *J. Phys. Chem.* **93**, 6696-6699.
- (26) Adam W., H. Platsch, J. S. Sendelbach y J. Wirz (1993) Determination of the triplet lifetime of 1,3-cyclopentadiyl biradicals derived from the photodenitrogenation of azaalkanes with time-resolved photoacoustic calorimetry. *J. Org. Chem.* **58**, 1477-1482..
- (27) Komorowski S. J., Z. R. Grabowski y W. Zielenkiewickz (1985) Pulsed photoacoustic determination of the quantum yield of triplet state formation *J. Photochem.* **30**, 141-151..
- (28) Carmichael I. y G. L. Hug (1986) Triplet-triplet absorption spectra of organic molecules in condensed phases. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **15**, 1-250.
- (29) Labhart H. y W. Heinzelmann (1973) Triplet-triplet absorption spectra of organic molecules, *Organic Molecular Photophysics*, Vol. 1, J. B. Birks (editor), Wiley, New York.

-
- (30) Callis J. B., W. W. Parson y M. Gouterman (1972) Fast changes of enthalpy and volume in flash excitation of chromatium chromatophores. *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 348-362.
- (31) Malkin S. y D. Cahen (1979) Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: theory of the effect with special emphasis on photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **29** 803-813.
- (32) Carpentier R., B. Larue y R.M. Leblanc, *J. Phys. Colloq.* **44** (1983) 355.
- (33) Van Haver Ph., L. Viaene, M. Van de Auweraer y F. C. J. De Schryver (1992) References for laser-induced opto-acoustic spectroscopy using UV excitation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **63**, 265-277.
- (34) Rothberg, L. J., J. D. Simon, M. Bernstein y K. S. Peters (1983) Pulsed laser photoacoustic calorimetry of metaestable species. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3464-3468.
- (35) Rothberg, L. J.; M. Bernstein y K. S. Peters (1983) Time resolved photoacoustic spectroscopy applied to properties of picosecond transients. *J. Chem Phys.* **79**, 2569-2576.
- (36) Heihoff K. y S. E. Braslavsky (1986) Triplet lifetime determination by laser-induced optoacoustic spectroscopy. Benzophenone/iodide revisited. *Chem. Phys. Lett.* **131**, 183-188.
- (37) Burkey T. J., M. Majewski y D. Griller (1986) Heat of formation of radicals and molecules by photoacoustic technique. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2218-2221.

-
- (38) Goodman J. L., K. S. Peters, H. Misawa y R. A. Caldwell (1986) Use of pulsed time-resolved photoacoustic calorimetry to determine the strain energy of trans-1-phenylcyclohexene and the energy of the relaxed 1-phenylcyclohexene triplet. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6803-6805.
- (39) Murgida D. H., R. Erra Balsells y G. M. Bilmes (1996) New photocalorimetric references for UV excitation. *Chem. Phys. Lett.* **250** 198-202.
- (40) Turro N. J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry*; The Benjamin / Cumming Publishing Co. New York.
- (41) Wilson R. W. y P. R. Callis (1980) Fluorescent tautomers and the apparent photophysics of adenine y guanine. *Photochem. Photobiol.* **31**, 323-327.
- (42) Kasama K., A. Takematsu y S. Arai, (1982) Photochemical reactions of triplet acetone with indole, purine and pyrimidine derivatives. *J. Phys. Chem.* **86**, 2420-2427.
- (43) Ver capítulo 1 de la presente tesis doctoral.
- (44) Steiner R. F. y E. P. Kirby (1969) The interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers. *J. Phys. Chem.*, **73**, 4130-4135
- (45) Arce R., L. A. Jimenez, V. Rivera y C. Torres (1980) Intermediates in the room temperature flash photolysis and low temperature photolysis of purine solutions. *Photochem. Photobiol.* **32**, 91-95.
- (46) Horrocks A. R., A. Kearvell, K. Tickle y F. Wilkinson (1966) Mechanism of fluorescence desactivación in solution. Part. 2 - Desactivación by xenon and

-
- intersystem crossing efficiencies. *J. Chem. Soc., Trans. Faraday Soc.* **62**, 3393-3399.
- (47) Referencia 40, pag 193.
- (48) Arce R., S. Benitez, E. Rivera y M. Rivera (1982) Studies on the UV-photodestruction of purine free base in aqueous solutions at 77 and 298K. *Photochem. Photobiol.* **35**, 291-297.
- (49) Quinones E. y R. Arce (1989) Photochemistry and photophysics of purine free base and 6-methylpurine. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8218-8223.
- (50) Garner A. y F. Wilkinson (1977) Desactivación of triplet states by molecular oxygen and the role of charge-transfer interaction. *Chem. Phys. Lett.* **45**, 432-435.
- (51) Drobnik J. y L. Augenstein (1966) Spectroscopic studies of purines-I. Factors affecting the first excited levels of purine *Photochem. Photobiol.* **5**, 13-30.
- (52) Drobnik J. y L. Augenstein (1966) Spectroscopic studies of purine-II. Properties of purine substituted at the second and sixth carbons. *Photochem. Photobiol.* **5**, 83-97..
- (53) Drobnik J., V. Kleinwachter y L. Augenstein (1967) Spectroscopic studies of purines-IV. Polarization of emission from purine and some of its derivatives. *Photochem. Photobiol.* **6**, 147-154.
- (54) Redmond R. W. y S. E. Braslavsky (1988) Time-resolved thermal lensing and phosphorescence studies on photosensitized singlet molecular oxygen

- formation. Influence of the electronic configuration of the sensitizers on recrystallization efficiency. *Chem. Phys. Lett.* **148**, 523-529.
- (55) Scaiano J. C. (1989) CRC Handbook of Organic Photochemistry, CRC Press, Inc.
- (56) Wilkinson F., W. P. Helman y A. B. Ross (1993) Quantum yield for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22**, 113-262.
- (57) Nonell i Marrugat S. (1988) Photosensitized Production and Physicochemical Properties of Singlet Oxygen $O_2(1\Delta_g)$, Thesis, Max-Planck Institut. ISSN 0932-5131.
- (58) Nikogosyan D. N. (1990) Two-quantum UV photochemistry of nucleic acid: comparison with conventional low-intensity UV photochemistry and radiation chemistry. *Int. J. Radiat. Biol.* **57**, 233-299.
- (59) Candeias L. P. y S. Steenken (1992) Ionization of purine nucleosides and nucleotides and their components by 193-nm laser photolysis in aqueous solution: model studies for oxidative damage of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 699-704.
- (60) Nikogosyan D. N. y V.S. Letokhov (1983) Nonlinear laser photophysics, photochemistry and photobiology of nucleic acids. *Rev. Nuovo Cim.* **6**, 1-72.
- (61) Faria Joaquim L. y S. Steenken (1993) Photoionization of diarylmethyl radicals in acetonitrile and alcohol-water: laser flash production of diarylcarbenium ions. *J. Phys. Chem.* **97**, 1924-1930.
- (62) HyperChem Release 4.5 for Windows, Autodesk, Inc., 1995

-
- (63) Daniels M. y W. Houswirtl (1971) Fluorescence of the purine and pyrimidine bases of the nucleic acids in neutral aqueous solution at 300 K. *Science* **171**, 675-677.
- (64) Gibson E. P. y J. H. Turnbull (1979) Luminescence characteristics of adenosine and its phosphates *J. Photochem.* **11**, 313-319.
- (65) Wintgens V., L. J. Johnston y J. C. Scaiano (1988) Use of a photoreversible fulgide as an actinometer in one and two laser experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 511-517.
- (66) Vanthey E., P. Suppan y E. Haselbach (1986) Photoinduced electron transfer reactions of perylene in acetonitrile. *Helv. Chim. Acta*, **69**, 430-437
- (67) Heihoff K., S. E. Braslavsky y K. Schaffner (1987) Study of 1,2,4-kilodalton oat phytochrome. Photoconversion in vitro with laser-induced optoacoustic spectroscopy. *Biochemistry* **26**, 1422-1427.

Capítulo 3

Reacciones de xantinas fotosensibilizadas con benzofenona

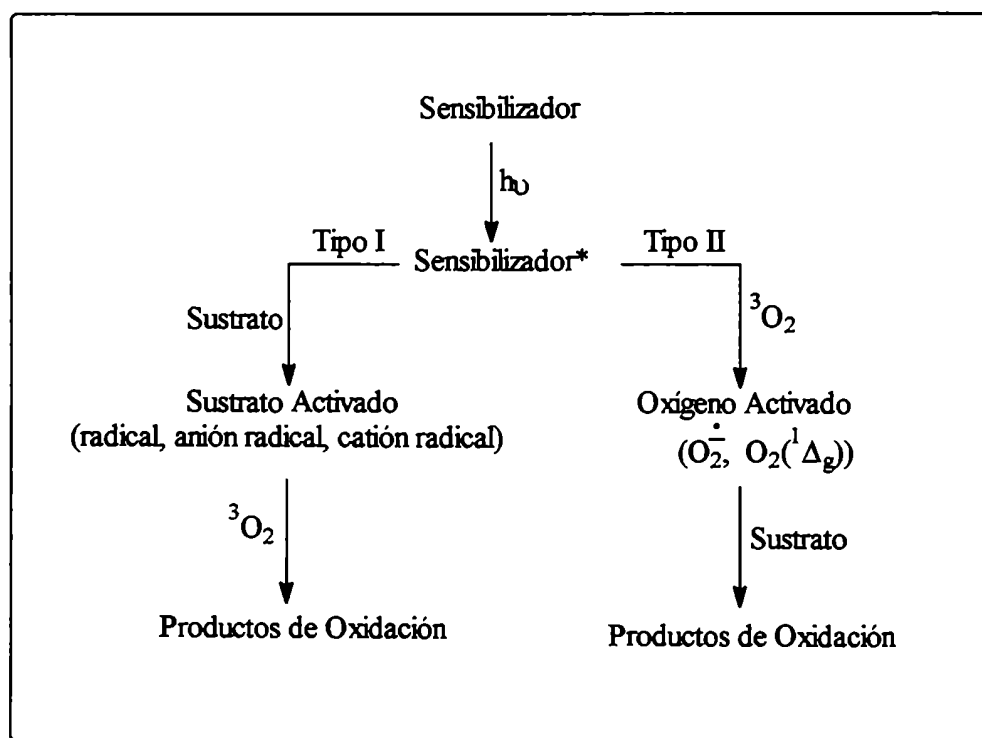
3.1 Introducción.

Debido al importante papel que cumplen los derivados de la purina, como es el caso de las xantinas, en procesos biológicos fundamentales, ya que muchas de ellas se encuentran presentes en tejidos vegetales,¹ su participación en reacciones fotoquímicas ha atraído la atención de numerosos grupos de investigación. Además, las xantinas constituyen una clase de compuestos de gran importancia en bioquímica, química clínica, farmacología y ciencias de los alimentos. Algunos aspectos de su comportamiento fotoquímico han sido largamente estudiados debido a que constituyen compuestos modelo simples para el estudio de la fotoquímica de los ácidos nucleicos.²⁻⁷ Como es sabido, la exposición de organismos vivos a la radiación solar puede inducir efectos mutagénicos y letales como resultado de modificaciones fotoinducidas y fotooxidativas en el ADN.⁵ A longitudes de onda comprendidas dentro de la región UVA ($\lambda = 320 - 400 \text{ nm}$) la mayoría de las fotooxidaciones en medios biológicos son inducidas por fotosensibilizadores endógenos y/o exógenos.^{8,9} Dichos procesos de fotosensibilización ocurren mediante dos mecanismos competitivos:¹⁰

- (a) Fotooxidaciones de tipo I, que involucran como etapa primaria una transferencia electrónica o una abstracción de hidrógeno hacia o desde el sustrato.
- (b) Fotooxidaciones de tipo II, que ocurren mediante la interacción del fotosensibilizador con el oxígeno molecular en su estado fundamental triplete (O_2), ya sea por transferencia de un electrón para generar el anión radical

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o por transferencia de energía para generar oxígeno electrónicamente excitado singlete ($O_2(^1\Delta_g)$).

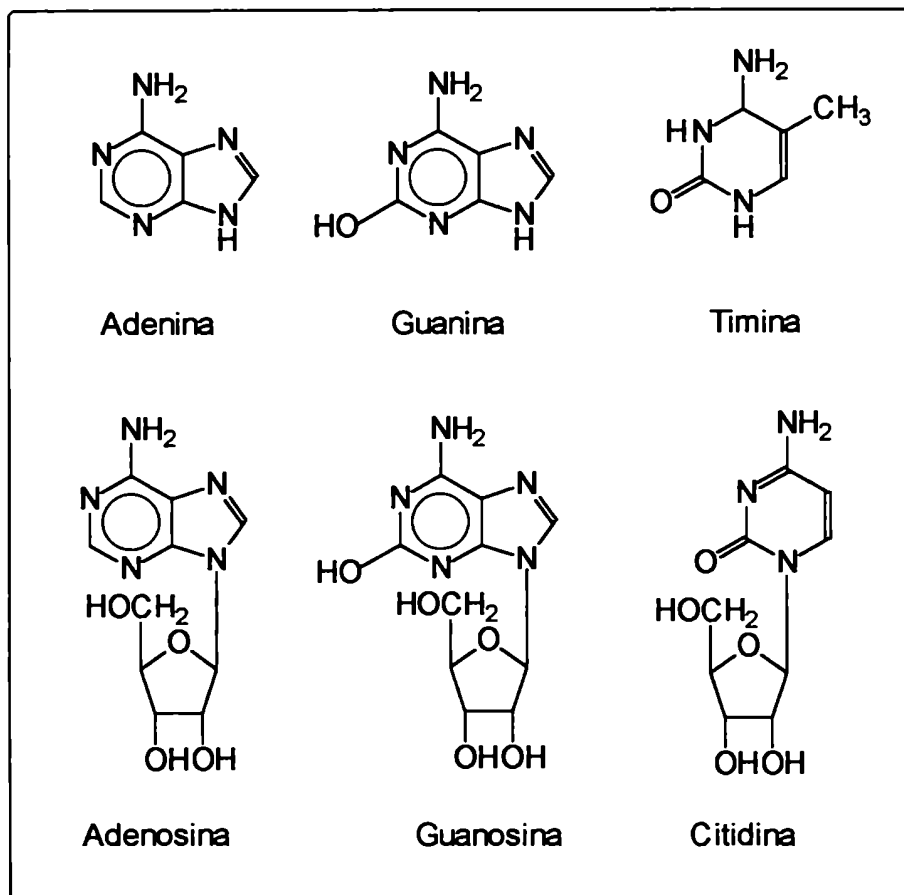
Una vez generadas, estas formas altamente reactivas del oxígeno pueden luego reaccionar con el sustrato.⁶



Esquema 1. Fotooxidaciones de tipo I y II.

Las quinonas como la 2-metil-1,4-naftoquinona (un componente de la vitamina K3)⁹ y las cetonas aromáticas como la benzofenona^{5,8} han sido descritas como eficientes fotosensibilizadores de tipo I al reaccionar con ciertas bases pirimidínicas.

En 1972 Charlier y Hélène¹¹ describieron las reacciones fotoquímicas de la benzofenona con adenina, adenosina y guanosa (ver esquema 2) en solución acuosa. A partir de estudios de flash fotólisis ellos concluyeron que la benzofenona electrónicamente excitada en su estado triplete reacciona con los derivados de la purina abstrayendo el hidrógeno purínico de la posición C-8, dando el radical difenilcarbinólico correspondiente.

**Esquema 2**

Los autores sugirieron en este mismo trabajo que los grupos amino presentes en la adenosina y en la guanosina no están involucrados en la reacción como donores de hidrógeno debido a que la citidina (una amino pirimidina) no da la misma reacción. Aunque en los experimentos realizados en estado estacionario ellos observaron que la velocidad en los cambios de la absorbancia es mucho menor para la adenosina que para la adenina, los autores no involucraron al grupo N-H de la purina en la formación del radical difenilcarbinólico. Es interesante mencionar además, que los autores no incluyen en su publicación ninguna información sobre la naturaleza de los fotoproductos formados.

Diez años después, en 1982, Kasama y col.¹² describieron las reacciones fotoquímicas de la acetona electrónicamente excitada en su estado triplete con derivados de la purina en solución acuosa. En este trabajo se informan absorciones de estados transientes asignados como los estados tripletes de la cafeína, la 7-metilguanina y la timina, junto con absorciones débiles de transientes caracterizados como radicales neutros para los casos de la adenina, la adenosina y la guanosina. En el primer caso la población de los estados triplete se explicó mediante un proceso de transferencia de energía, mientras que en el segundo la formación de los radicales neutros se atribuyó a un proceso de abstracción de hidrógeno. En este trabajo tampoco se analizaron los productos de reacción.

En el presente trabajo de tesis se estudió específicamente la naturaleza de los fotoproductos obtenidos, junto con los aspectos fotofísicos y fotoquímicos de reacciones fotosensibilizadas de xantinas (cafeína, teobromina y teofilina) utilizando benzofenona como sensibilizador. En este capítulo se describen los resultados

obtenidos en estudios cinéticos realizados utilizando tanto técnicas de estado estacionario como técnicas con resolución temporal (láser flash fotólisis) para los sistemas xantina - benzofenona. A partir de estos resultados se propone un mecanismo de reacción y se discute el papel que juega el alcohol en el proceso, así como el de las xantinas, especialmente en lo que se refiere a su potencial carácter donador de hidrógeno.

Por otra parte, haciendo uso de la ecuación de Rehm Weller¹³ y del modelo de Marcus – Hush¹⁴⁻¹⁹ se evalúa y discute la factibilidad termodinámica y cinética de un proceso de transferencia electrónica fotoinducida entre la benzofenona en su estado excitado triplete y las diferentes xantinas. Para poder utilizar esta ecuación fue necesario medir por primera vez en medio orgánico los potenciales de oxidación de las xantinas estudiadas.

Finalmente, se realizaron cálculos semiempíricos por modelado molecular para obtener evidencia adicional para la elección de las posibles vías de reacción.

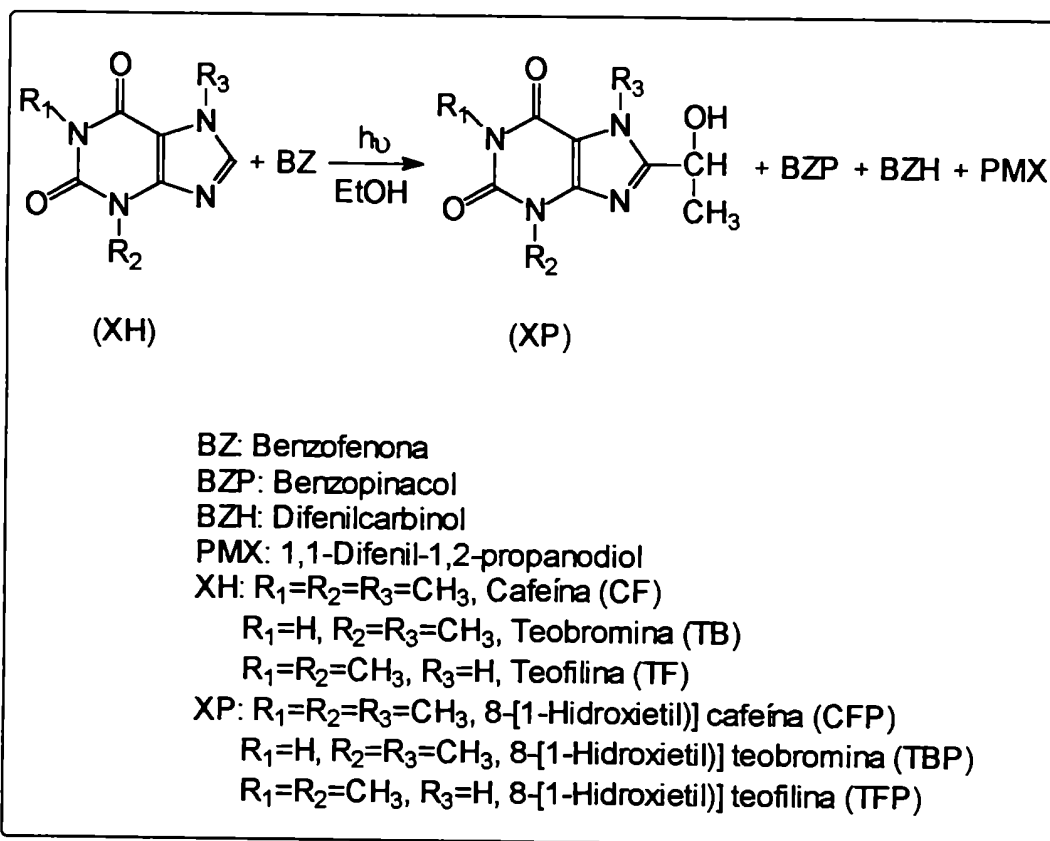
3.2 Resultados y discusión.

3.2.1 Mecanismo de la reacción.

Cuando una solución etanólica de benzofenona (BZ) y una de las tres xantinas (XH) estudiadas (cafeína, CF; teobromina, TB y teofilina, TF) es irradiada bajo atmósfera de nitrógeno en condiciones donde sólo la benzofenona absorbe luz ($\lambda > 300$ nm), sólo se observan cuatro productos de reacción importantes al analizar la mezcla obtenida por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Estos productos fueron aislados mediante cromatografía de adsorción en columna y posteriormente identificados mediante RMN-¹H, RMN-¹³C, espectrometría de masas (EM) y punto de fusión (p.f.) (ver sección 3.4.3).

Parte de los productos obtenidos fueron los esperables de la fotorreducción de la benzofenona en medio etanólico (benzopinacol, BZP; difenilcarbinol, BZH y 1,1-difenil-1,2-propanodiol, PMX)²⁰ además de obtenerse un producto que resultó ser el aducto xantina-etanol (8-[1-(1-hidroxietil)] xantina, XP), cuya estructura se muestra en el esquema 3.

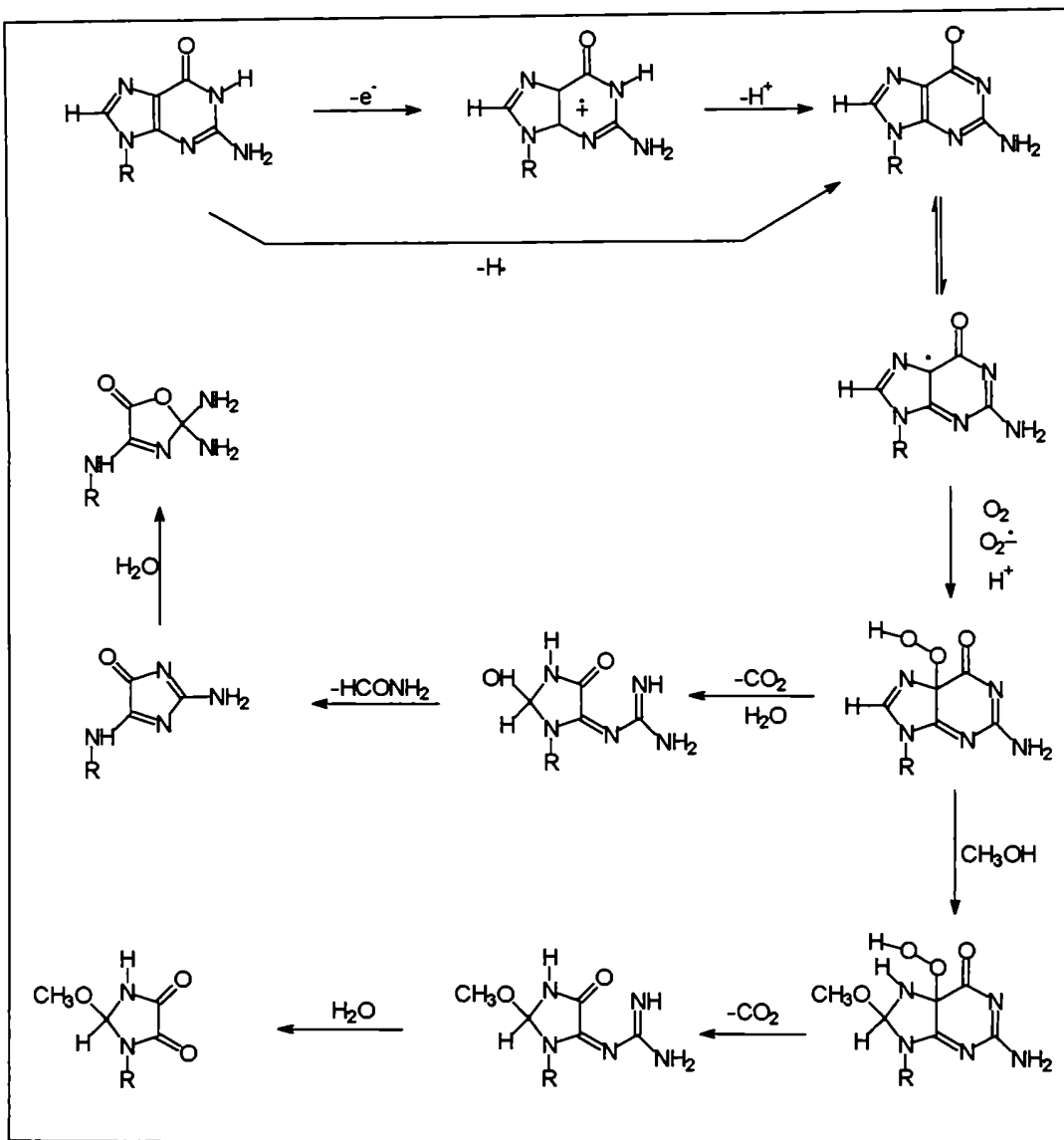


Esquema 3.

El aducto de cafeína con etanol fue descrito previamente por Solomon y Elad,²¹ quienes lo obtuvieron como producto de la reacción de ambos compuestos iniciada por peróxidos (diterbutilperóxido y dicumilperóxido). El aducto teofilina - etanol había sido obtenido previamente por fotólisis ($\lambda > 290$ nm) de la mezcla TF - acetona - etanol.²²

En nuestras experiencias, cuando las irradiaciones son realizadas en soluciones etanólicas saturadas con aire, el comportamiento fotoquímico cambia drásticamente. El rendimiento cuántico de consumo de benzofenona disminuye abruptamente. Al analizar la mezcla irradiada mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) sólo se detectan cantidades muy pequeñas ($< 0,5$ %) del aducto XP, conjuntamente con una cantidad similar del correspondiente aducto oxidado (8-acetilxantina) y una gran cantidad de materia prima inalterada.

Es interesante mencionar que Cadet y col.⁵ describieron que en soluciones de la mezcla metanol-agua (1:1) bajo atmósfera de aire, la benzofenona fotosensibiliza la formación de un metoxi derivado de la 2-deoxiguanosina mediante un mecanismo de tipo I. Los autores de este trabajo proponen un ataque nucleofílico por parte del metanol, siendo necesaria la presencia del oxígeno para que ocurra dicha reacción (ver esquema 4). Este mecanismo está indirectamente sustentado por la ausencia de productos que incluyan en su estructura al metanol cuando la irradiación se realiza en atmósfera inerte.



Esquema 4

En nuestras condiciones experimentales, utilizando benzofenona como sensibilizador, nosotros nunca detectamos la formación del aducto xantina-etanol originado por reacción del C-8 de las xantinas con el oxígeno del etanol. Sin embargo, sí pudimos observar este tipo de aducto cuando utilizamos Rosa de

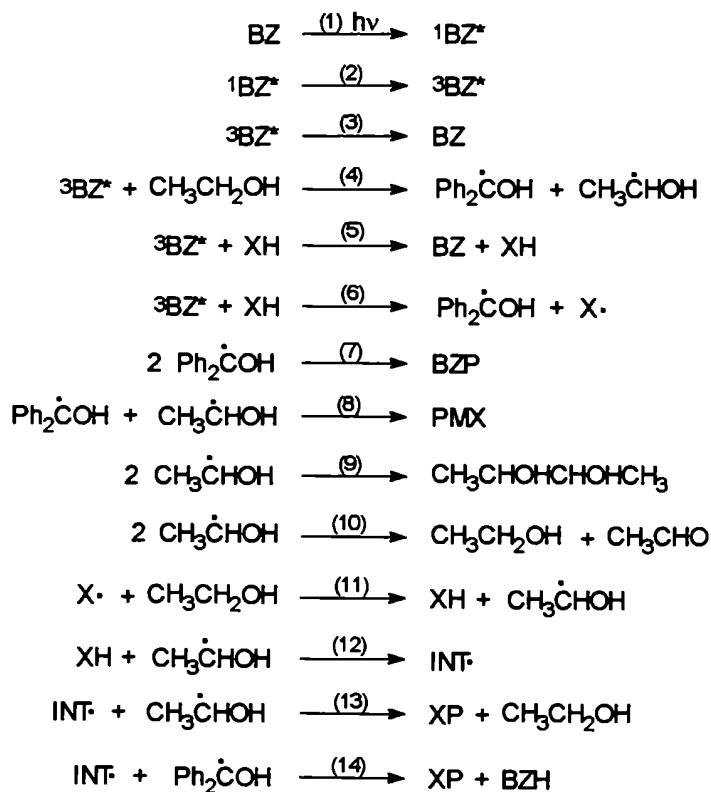
Bengala como fotosensibilizador en experiencias realizadas bajo atmósfera de aire (ver capítulo 4).

Con el objeto de lograr una mayor comprensión de este tipo de reacciones, se realizaron numerosos experimentos cinéticos utilizando técnicas basadas en estado estacionario y técnicas con resolución temporal (láser flash fotólisis).

Algunos de los resultados más relevantes que se obtuvieron, y que constituyen importantes evidencias mecanísticas, pueden resumirse de la siguiente forma:

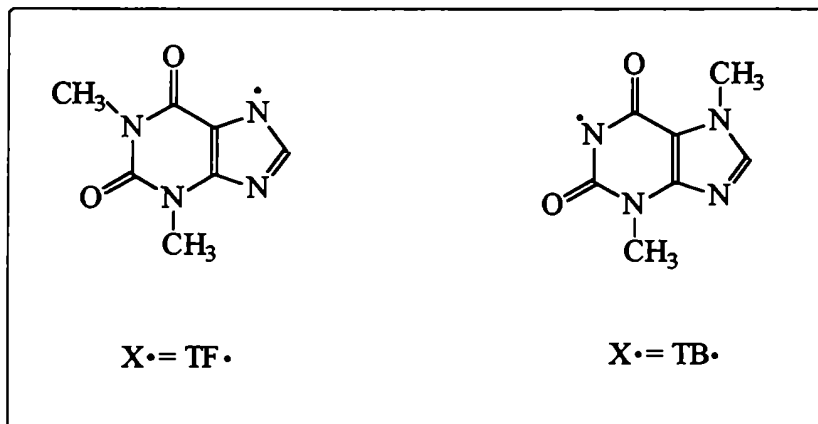
- (a) El rendimiento cuántico de consumo de benzofenona disminuye cuando la concentración de xantina aumenta. Este efecto es mayor para la cafeína que para la teobromina, y resulta muy pequeño para la teofilina.
- (b) El estado triplete de la benzofenona es desactivado por la cafeína, la teobromina y la teofilina con aproximadamente la misma constante cinética.
- (c) El rendimiento cuántico de formación del radical difenilcarbinólico disminuye cuando aumenta la concentración del compuesto xantínico. Este último efecto es mayor para la cafeína que para la teobromina, y resulta muy pequeño para la teofilina.

Basándonos en estas y en otras evidencias que se detallan más adelante, se propone el siguiente mecanismo de reacción:



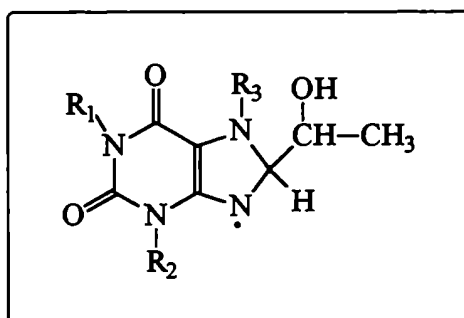
Esquema 5. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de las xantinas (XH) en etanol bajo atmósfera de nitrógeno utilizando benzofenona (BZ) como fotosensibilizador.

Las especies designadas como X \cdot en el esquema 5, para los casos de la teofilina y la teobromina, tienen las estructuras que se muestran en el esquema 6. Como se explica más adelante esta especie no tiene existencia para el caso de la cafeína, es decir que el paso 6 del esquema 5 sólo es aplicable a la teofilina y a la teobromina.



Esquema 6

A su vez, para las tres xantinas, el radical intermediario $INT\cdot$ tiene la estructura general que se muestra en el esquema 7.



Esquema 7

De acuerdo con el mecanismo propuesto, el rendimiento cuántico de consumo de benzofenona en ausencia de xantinas puede expresarse como:

$${}^0\Phi_{BZ} = \Phi_{ci} [k_4 / (k_3 + k_4)] \quad (1)$$

donde Φ_{ci} es el rendimiento cuántico de cruce intersistemas. Esta magnitud (${}^0\Phi_{BZ}$) fue medida utilizando el actinómetro de Hatchard y Parker,²³ obteniéndose un valor unitario en coincidencia con lo descrito previamente por Beckett y Porter.²⁴ Teniendo además en cuenta que $\Phi_{ci} = 1$,²⁵ puede concluirse que $k_3 \ll k_4$.

En presencia de xantinas el rendimiento cuántico de consumo de benzofenona ${}^{XH}\Phi_{BZ}$ puede expresarse como:

$${}^{XH}\Phi_{BZ} = \Phi_{ci} [(k_4 + k_6[XH]) / (k_3 + k_4 + (k_5 + k_6)[XH])] \quad (2)$$

teniendo entonces en cuenta que $k_3 \ll k_4$, se obtiene la siguiente expresión:

$${}^0\Phi_{BZ} / {}^{XH}\Phi_{BZ} = 1 + (k_5[XH] / (k_4 + k_6[XH])) \quad (3)$$

La figura 1 muestra los valores experimentales de la relación ${}^0\Phi_{BZ} / {}^{XH}\Phi_{BZ}$ en función de la concentración de las diferentes xantinas $[XH]$ obtenidos mediante irradiaciones y mediciones en estado estacionario, y la curva obtenida al ajustar en forma no lineal los datos a la ecuación 3. Los parámetros de ajuste se muestran en la tabla 1. Para k_4^{-1} se utilizó el tiempo de vida del triplete de la benzofenona en etanol descrito en la literatura²⁶ (0,104 μ s).

Estos resultados indican que en el caso de la cafeína el mecanismo de desactivación de la benzofenona en estado triplete es de naturaleza física, mientras

que para la teofilina el mecanismo es esencialmente químico, es decir, abstracción de hidrógeno. En el caso de la teobromina ambos mecanismos resultan operativos.

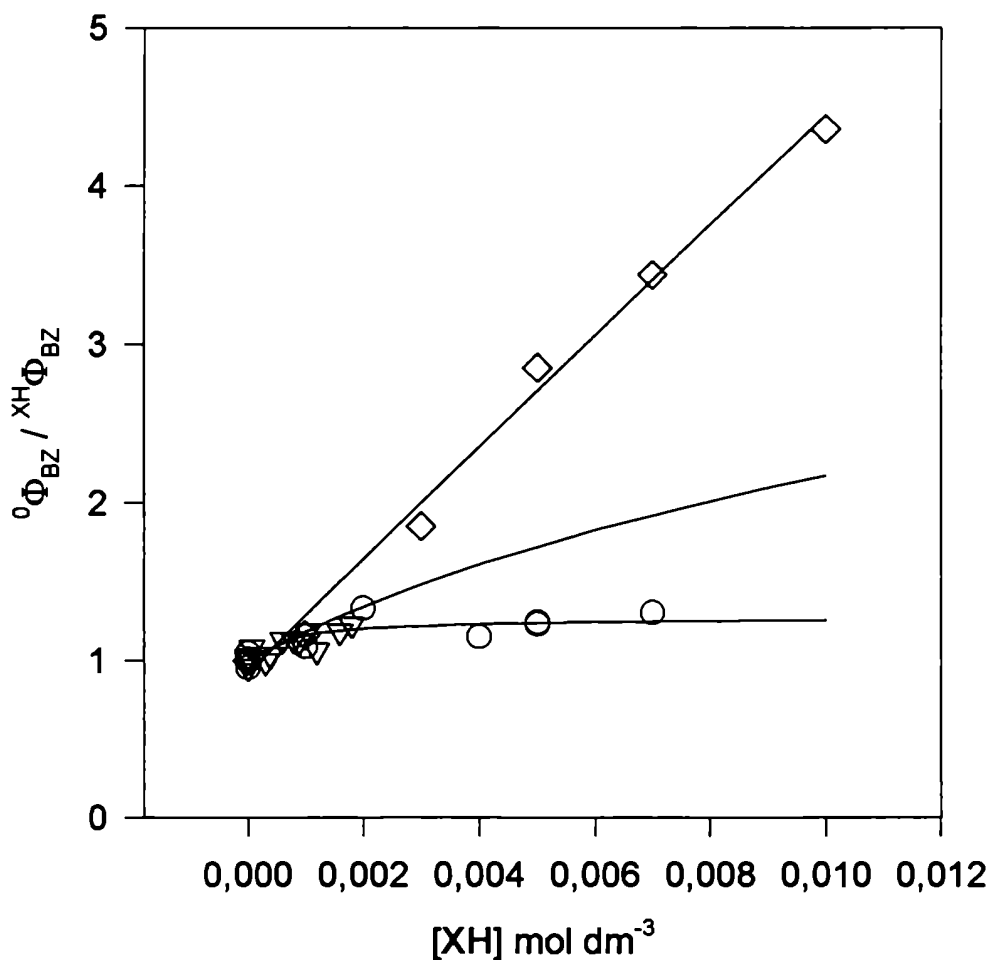


Figura 1. Rendimiento cuántico de consumo de BZ en ausencia de XH dividido por el rendimiento cuántico de consumo de BZ en presencia de XH, en función de la concentración de XH. (◊) XH=CF; (▽) XH=TB; (○) XH=TF. Solvente: etanol.

En etanol el tiempo de vida del estado triplete de la benzofenona resulta demasiado corto²⁶ (0,104 μs) para el tiempo de resolución de nuestro dispositivo

de láser flash fotólisis. Por lo tanto las mediciones con resolución temporal fueron realizadas utilizando una mezcla de H₂O/CH₃CN 2/1 (v/v) como solvente. En este medio se pudo observar inmediatamente después del pulso láser, el espectro de absorción del estado triplete de la BZ con un máximo de absorción a 520 nm en coincidencia con lo descrito por otros autores.²⁶⁻³⁰

Tabla 1. Reacciones de xantinas fotosensibilizadas por benzofenona, en solución etanólica. Experimentos realizados en estado estacionario: constantes de velocidad k_5 y k_6 obtenidas a partir del ajuste de los datos experimentales de la figura 1 con la ecuación 3.

XH	k_5 ($\times 10^{-9}$) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	k_6 ($\times 10^{-9}$) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
CF	3,48	< 0,026
TB	3,06	1,015
TF	< 0,6	2,4

El decaimiento exponencial del triplete conduce a la formación de un transiente de vida larga con un máximo de absorción a 540 nm, que de acuerdo con la literatura²⁶⁻³¹ puede asignarse como el radical difenilcarbinólico (ver figura 2).

En la figura 3 se muestra un decaimiento típico registrado a 520 nm para una solución de benzofenona en H₂O / CH₃CN con agregado de teofilina. Como puede apreciarse en la figura, el decaimiento es monoexponencial, y la absorción no

cae a cero, sino que existe una absorción residual como consecuencia de la formación del radical difenilcarbinólico de tiempo de vida largo.

Midiendo el tiempo de vida del estado triplete (τ_T) a 520 nm en función de la concentración de las xantinas, es posible obtener las constantes totales de desactivación, $k_Q = k_5 + k_6$ (ver figura 4 y tabla 2) ajustando los valores experimentales con la siguiente ecuación:

$$1 / \tau_T = (k_3 + k_4) + (k_5 + k_6) [XH] = 1 / \tau_T^0 + k_Q [XH] \quad (4)$$

donde τ_T^0 es el tiempo de vida del estado triplete de la benzofenona en H_2O/CH_3CN 2/1. A partir de la figura 4 se obtiene que este valor es igual a 7 μs .

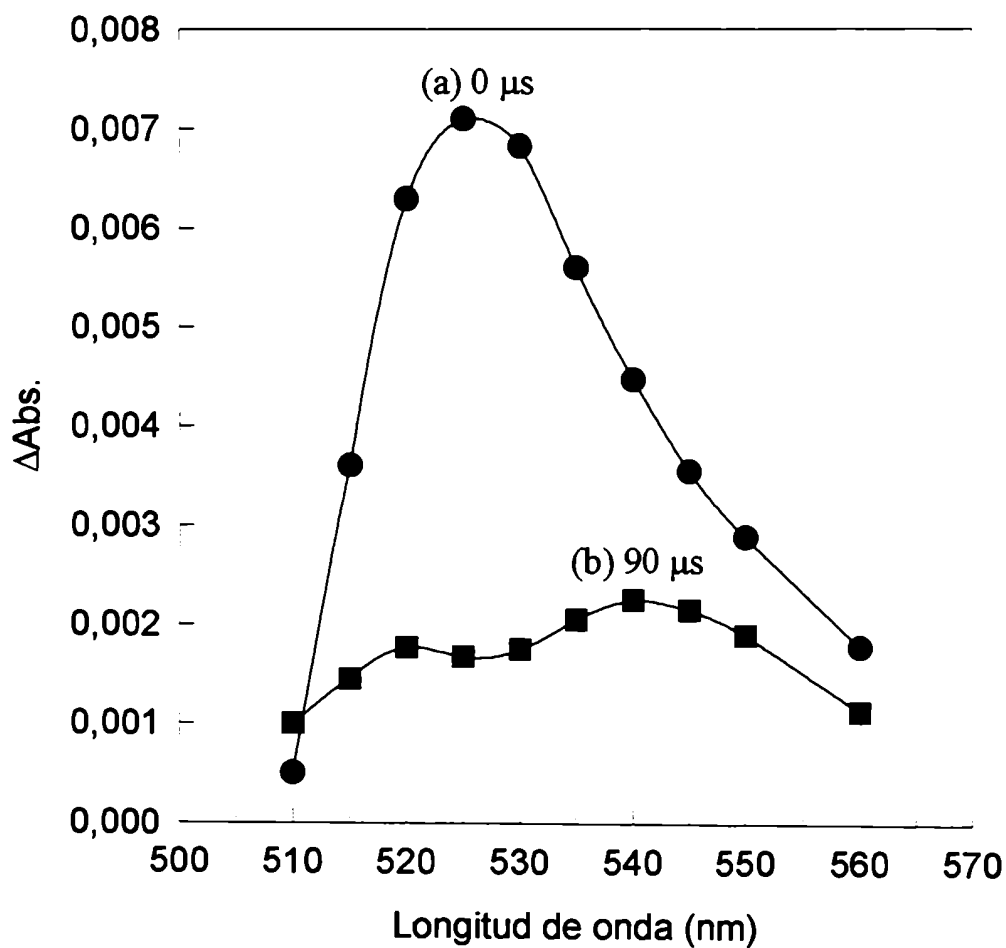


Figura 2. Espectros de absorción de las especies transientes generadas por un pulso de radiación láser de 355 nm y 5 ns de duración en una solución de benzofenona. (a) Inmediatamente después del pulso láser, (b) 90 μs después del pulso láser. Solvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 2/1 (v/v).

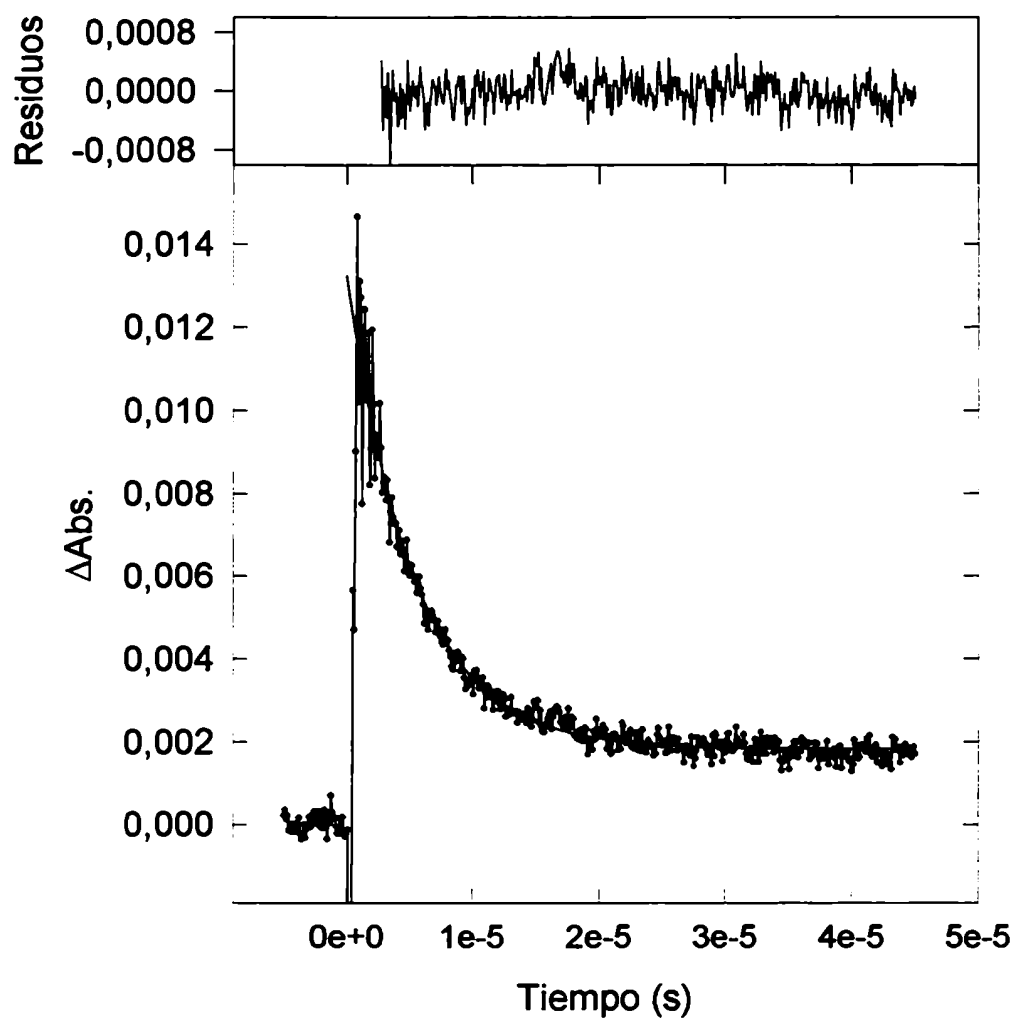


Figura 3 : Decaimiento a 520 nm y su ajuste con una función monoexponencial para una solución 5×10^{-3} mol dm^{-3} de benzofenona en $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ 2:1 (v/v), conteniendo $1,1 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} de teofilina. $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm. Atmósfera : Ar.

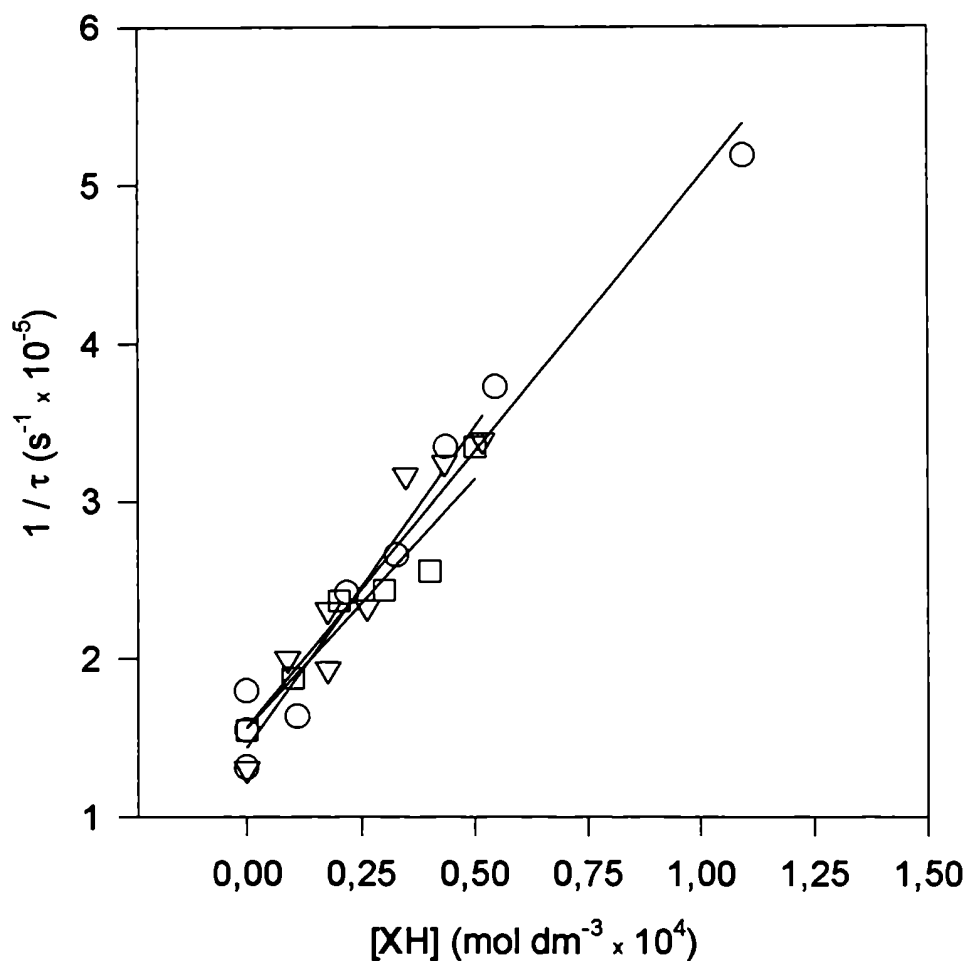


Figura 4. Inversa del tiempo de vida del estado triplete de la benzofenona en función de la concentración de las xantinas (XH). (o) XH=CF; (∇) XH=TB; (□) XH=TF. Solvente: $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ 2:1 (v/v). $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$. Atmósfera: N_2 .

Por otra parte, es posible cuantificar la cantidad de radical difenilcarbinólico generado luego del pulso láser midiendo la absorbancia a tiempos largos (ΔA_{rad}), cuando el triplete ha decaído completamente. Con estos datos es posible plantear la siguiente ecuación:

$${}^0\Phi_{\text{rad}} / {}^{\text{XH}}\Phi_{\text{rad}} = {}^0(\Delta A_{\text{rad}} / \Delta A_0) / {}^{\text{XH}}(\Delta A_{\text{rad}} / \Delta A_0) \quad (5)$$

donde ${}^0\Phi_{\text{rad}}$ y ${}^{\text{XH}}\Phi_{\text{rad}}$ representan los rendimientos cuánticos de formación de radical difenilcarbinólico para experimentos realizados en ausencia y en presencia de xantinas, respectivamente. ΔA_0 representa la absorción del transiente a tiempo cero luego del pulso láser, y se utiliza para normalizar la absorción del radical difenilcarbinólico con el objeto de evitar variaciones debidas a fluctuaciones en la energía del pulso láser. De todos modos, ΔA_0 resultó constante durante las mediciones, e independiente de la concentración de las xantinas, demostrando que la desactivación del estado triplete de la BZ es un proceso dinámico.

Tabla 2. Reacciones de xantinas (XH) en H₂O/CH₃CN (2/1; v/v) fotosensibilizadas por benzofenona. Medidas resueltas en tiempo: constantes de velocidad k_Q , k_5 y k_6 obtenidas a partir de los datos experimentales presentados en las figuras 3 y 4.

XH	k_Q ($\times 10^{-9}$) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	k_5 ($\times 10^{-9}$) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	k_6 ($\times 10^{-9}$) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
CF	3,48	3,48	< 0,01
TB	4,06	3,04	1,02
TF	3,16	< 0,01	3,16

De acuerdo al mecanismo propuesto (esquema 5) es posible escribir la siguiente ecuación:

$${}^0\Phi_{\text{rad}} / {}^{\text{XH}}\Phi_{\text{rad}} = {}^0\Phi_{\text{rad}} [(k_3+k_4+(k_5+k_6)[\text{XH}]) / (k_4+k_6[\text{XH}])] \quad (6)$$

Ajustando los valores experimentales del cociente ${}^0\Phi_{\text{rad}} / {}^{\text{XH}}\Phi_{\text{rad}}$ en función de la concentración de las diferentes xantinas [XH] con la ecuación 6, utilizando ${}^0\Phi_{\text{rad}}$ y k_6 como parámetros, pueden obtenerse k_5 y k_6 (ver figura 5 y tabla 2). A partir de estos ajustes se obtiene además ${}^0\Phi_{\text{rad}} = 0,83$, en discordancia con Bensasson y col.²⁷, quienes informaron un valor de 0,45 para la benzofenona en solución acuosa.

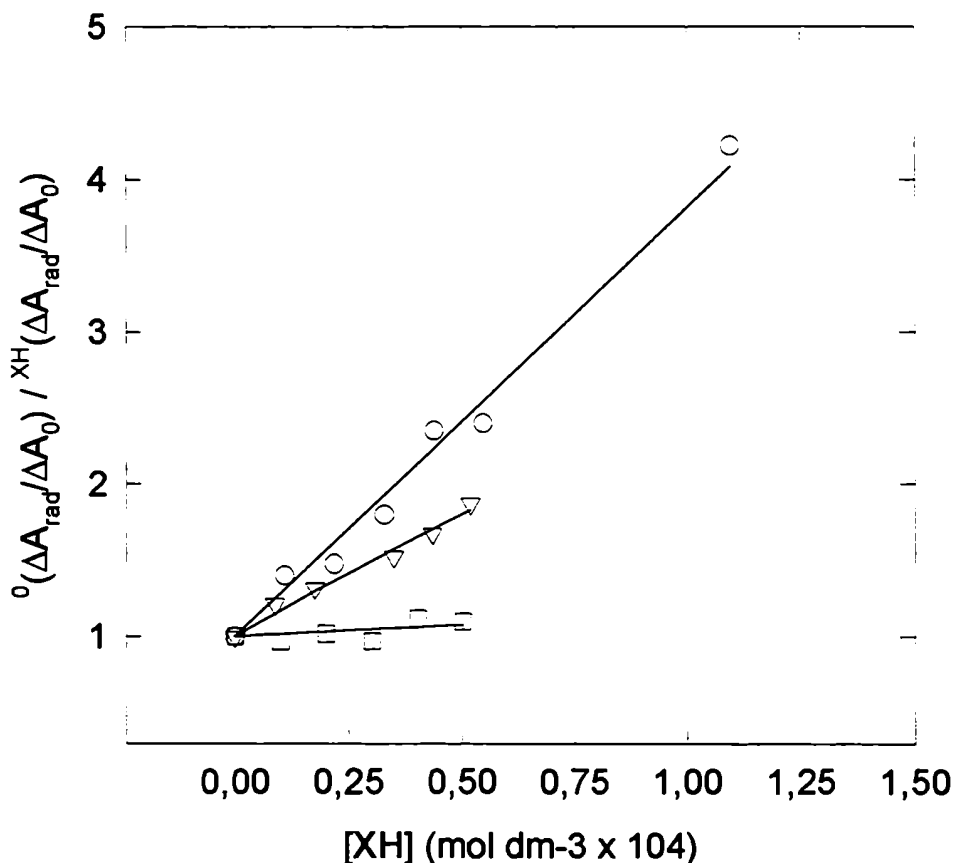


Figura 5. Rendimiento cuántico de formación de radical difenilcarbinólico en ausencia de xantinas dividido por el rendimiento cuántico de formación de radical difenilcarbinólico en presencia de xantinas (XH), en función de la concentración de XH. (○) XH=CF; (▽) XH=TB; (□) XH=TF. Solvente: H₂O / CH₃CN 2:1 (v / v). $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm.

Como puede verse en las tablas 1 y 2, los valores de k_5 y k_6 obtenidos por láser flash fotólisis en $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ coinciden, dentro del error experimental, con aquéllos obtenidos por fotólisis en estado estacionario en etanol. Estos resultados confirman que en el caso de la cafeína el mecanismo de desactivación del estado triplete de la benzofenona es esencialmente físico (esquema 5, paso 5), mientras que para la teofilina la vía principal es la abstracción de hidrógeno (esquema 5, paso 6). En el caso de la teobromina ambos mecanismos resultan operativos.

3.2.2 Transferencia de energía triplete-triplete.

La transferencia de energía de la benzofenona excitada en su estado triplete hacia las xantinas puede ser descartada como responsable de la desactivación física. Teniendo en cuenta que los niveles de energía de los estados triplete involucrados son 24200 cm^{-1} para la benzofenona³², y aproximadamente 25500 cm^{-1} para las xantinas (ver sección 3.4.8), dicha transferencia de energía resulta energéticamente desfavorable. La constante de desactivación mediante el proceso de transferencia de energía (k_Q) puede estimarse a partir de la siguiente ecuación.³³

$$k_Q / k_d = (1 + e^{-\Delta E / RT})^{-1} \quad (7)$$

donde k_d es la constante de velocidad difusional y ΔE es la diferencia de energía entre los estados triplete del donador (en este caso benzofenona) y del aceptor (en este caso las xantinas). Usando esta ecuación se obtiene un valor de k_Q de

aproximadamente $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ para las tres xantinas, mientras que el valor experimental es aproximadamente $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ (ver tabla 2).

En concordancia con esta predicción, el estado triplete de la cafeína, descrito con un máximo de absorción a 28500 cm^{-1} y una constante de decaimiento de $2,2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, no fue detectado en nuestros experimentos de láser flash fotólisis.

3.2.3 Modelado molecular y otras evidencias mecanísticas.

Las diferencias antes mencionadas en la capacidad donora de hidrógeno de las distintas xantinas pueden explicarse analizando sus estructuras. Los rendimientos cuánticos relativos de formación de radical difenilcarbinólico medidos por láser flash fotólisis deberían depender críticamente de las energías de los enlaces N-H y C₈-H de la cafeína, teofilina y teobromina. Para analizar esto calculamos mediante métodos semiempíricos de modelado molecular (AM1 y PM3)³⁴ las entalpías de reacción para las transferencias de hidrógeno desde la cafeína (C₈-H, no contiene grupo N-H), la teobromina (C₈-H y N-H) y la teofilina (C₈-H y N-H) a la benzofenona en su estado triplete.

En el caso de la cafeína, el hidrógeno unido al C-8 es el único que podría ser abstraído por el triplete de la benzofenona. Como puede verse en la tabla 3 (entrada 6^a), la entalpía de reacción para este proceso es ligeramente favorable, aunque no existe ninguna evidencia experimental que haga suponer su existencia. Similares resultados se obtienen para la abstracción de los hidrógenos de C-8 de la teobromina y la teofilina. Sin embargo, tanto la teobromina como la teofilina

difieren de la cafeína en el hecho de poseer grupos N-H en distintas posiciones (posiciones 1 y 3 respectivamente). Cuando se realizan cálculos para modelar la abstracción de esos átomos de hidrógeno por parte del triplete de la BZ, los resultados obtenidos (ver tabla 3, entrada 6^b) indican que esos procesos son energéticamente más favorables que la abstracción de los hidrógenos de las posiciones C-8 respectivas.

Tabla 3. Calor de reacción (KJ mol⁻¹) calculado por el método PM3.

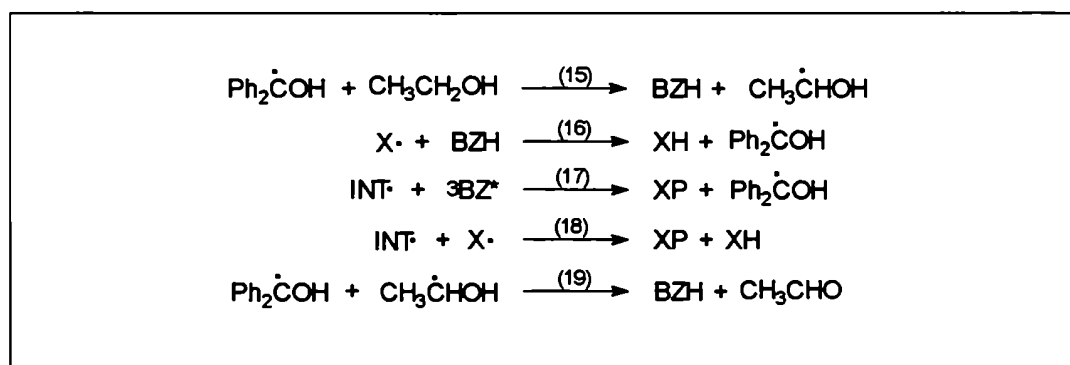
Reacción	XH		
	CF	TB	TF
6 ^a	-11,17	-9,92	-8,58
6 ^b	---	-54,68	-143,34
7	-69,83	-69,83	-69,83
8	-144,31	-144,31	-144,31
11	---	-153,72	-65,05
12	-28,24	-28,66	-36,53
13	-162,13	-161,63	-154,43
14	-166,65	-166,15	-158,95
15	111,29	111,29	111,29
16	---	-149,20	-60,54
17	-370,53	-370,03	-464,30
18	---	-315,35	-219,49
19	-142,84	-142,84	-142,84

^a Abstracción del hidrógeno unido al C-8.

^b Abstracción del hidrogeno del grupo N-H.

Por otra parte, estos cálculos predicen que la abstracción del hidrógeno del grupo N-H resulta más favorable para la teofilina que para la teobromina. Esta tendencia observada con los cálculos semiempíricos es consistente con nuestras observaciones experimentales tanto en los estudios realizados en estado estacionario como en aquéllos con resolución temporal, y explicaría el diferente comportamiento observado para las tres xantinas.

Además de las reacciones incluidas en el mecanismo anteriormente propuesto (esquema 5), existen otros procesos que deben ser analizados antes de descartarlos (ver esquema 8).



Esquema 8

En los casos de la teofilina y la teobromina, el radical $\text{X}\cdot$ podría abstraer un átomo de hidrógeno del solvente (esquema 5, paso 11). Como se muestra en la tabla 3, este proceso resulta energéticamente favorable para ambas xantinas, y cabría esperar que ocurra dentro de la caja del solvente donde el triplete de la benzofenona es desactivado. Esto excluye a la reacción 16 (esquema 8). En otras

palabras, la colisión de una molécula de benzofenona excitada en su estado triplete con una molécula de xantina conduce a una desactivación física (paso 5) o bien a una desactivación química dando los radicales difenilcarbinol y metilcarbinol como productos finales (pasos 6+11).

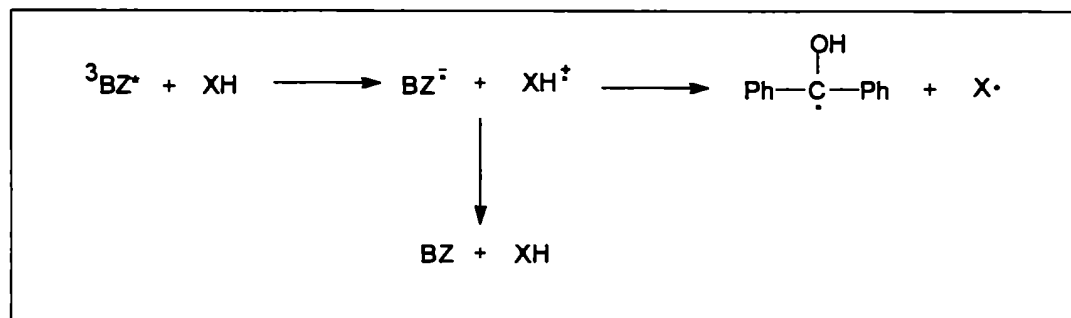
Por esta razón, el radical $X\cdot$ no parece estar involucrado en la formación del producto XP. Este producto podría generarse mediante la reacción de las xantinas con el radical metilcarbinólico para dar un radical intermediario (INT \cdot) (esquema 5, paso 12), el cual puede reaccionar con otro radical metilcarbinólico o con la benzofenona excitada o con el radical $X\cdot$ para dar el producto final XP (esquema 5, pasos 13 y 14; esquema 8, pasos 17 y 18). Como puede verse en la tabla 3, las reacciones 13, 14, 17 y 18 son energéticamente posibles. Sin embargo, la reacción 17 no puede ser importante debido a que si lo fuera conduciría a un incremento en la degradación de la benzofenona, el cual resulta incompatible con la disminución observada en el rendimiento cuántico de consumo de esta al aumentar la concentración de las xantinas. Por otra parte, la reacción 18 es claramente despreciable (desde un punto de vista cinético) frente a las reacciones 11, 13 y 14.

Existen otras evidencias experimentales que avalan el mecanismo propuesto. Cuando la benzofenona es irradiada en ausencia de xantinas, se observa una cantidad importante de 1,1-difenil-1,2-propanodiol, mientras que prácticamente no se detecta difenilcarbinol como producto usando CLAR como técnica analítica. Esto indica que la reacción 8 es mucho más rápida que las reacciones 15 y 19, las cuales pueden ser excluidas del mecanismo. Además, la reacción 15 resulta energéticamente desfavorable (ver tabla 3). Por otra parte, cuando las irradiaciones

se realizan en presencia de cantidades crecientes de xantinas, la concentración de difenilcarbinol aumenta mientras que la concentración de 1,1-difenil-1,2-propanodiol disminuye. Estos hechos indican que las reacciones 12 y 14 son responsables de la formación del difenilcarbinol y que la reacción 12 compite efectivamente con la reacción 8. Además, cuando las irradiaciones se realizan con exceso de xantinas, el rendimiento cuántico de consumo de benzofenona en presencia de estas (${}^{\text{XH}}\Phi_{\text{BZ}}$) es aproximadamente igual al rendimiento cuántico de consumo de las xantinas (Φ_{XH}) para los tres casos estudiados.

3.2.4 Abstracción de hidrógeno vs. transferencia electrónica.

Como es sabido, una transferencia de hidrógeno total puede ser formalmente representada como una transferencia electrónica seguida de una transferencia de protón. Por lo tanto la reacción 6 (esquema 5) podría escribirse de la siguiente forma:



Esquema 9

La factibilidad termodinámica para un proceso de transferencia electrónica puede estimarse a partir de la ecuación de Rehm-Weller.¹³

$$\Delta G^0 \text{ (KJ mol}^{-1}\text{)} = 96,48 (E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) - E_{\text{T}} \quad (8)$$

donde E_{red} y E_{ox} son los potenciales de media onda en voltios para la reducción monoeléctrica de la benzofenona y para la oxidación de las xantinas, respectivamente. E_{T} es la energía del estado triplete de la benzofenona. Los valores de E_{ox} fueron estimados por voltametría cíclica (C. V.).

Como puede verse en las figuras 6 a 8, la oxidación electroquímica de las xantinas es un proceso irreversible. Por lo tanto nosotros tomamos el valor de E_{p} del primer pico de oxidación como un límite superior para el valor de E_{ox} . Naturalmente si E_{ox} fuera menor, también ΔG_0 disminuiría, por lo tanto los valores calculados de ΔG_0 pueden interpretarse como una cota superior.

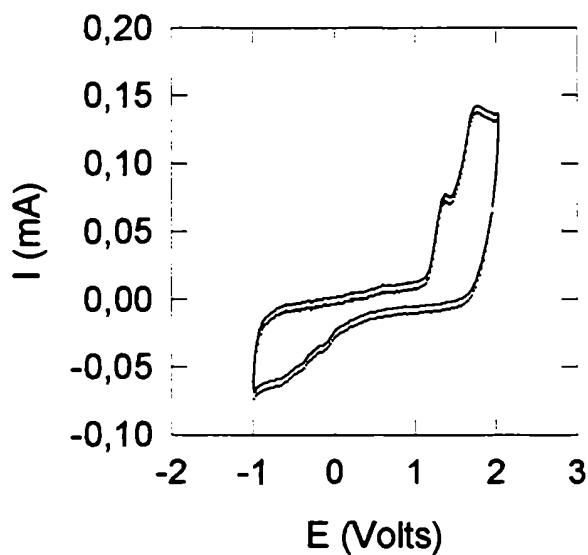


Figura 6. Voltametría cíclica de una solución $1,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} de cafeína en CH_3CN . Electrodo de referencia: $\text{Ag} / \text{AgNO}_3$ en CH_3CN . Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

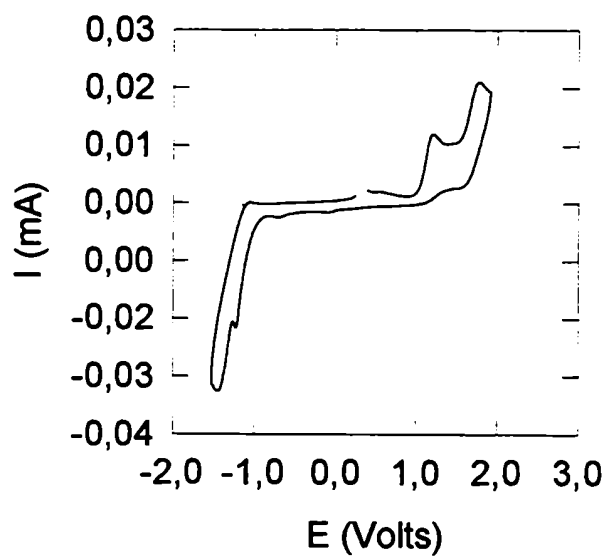


Figura 7. Voltametría cíclica de una solución $1,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} de teofilina en CH_3CN . Electrodo de referencia: Ag/AgNO_3 en CH_3CN . Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

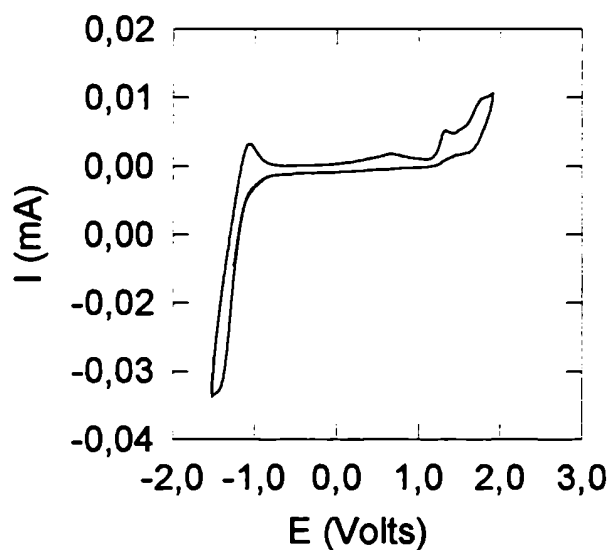


Figura 8. Voltametría cíclica de una solución $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de teobromina en CH_3CN . Electrodo de referencia: Ag/AgNO_3 en CH_3CN . Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Como puede verse en la tabla 4, en todos los casos el ΔG^0 tiene un valor positivo que se encuentra dentro de la denominada “*downhill region*” en el modelo propuesto por Kikuchi,³⁵ en la cual la transferencia electrónica es un proceso aún posible, pero la transferencia electrónica inversa puede ser un proceso mucho más rápido que el proceso directo.

Tabla 4. Potenciales de oxidación y reducción medidos por voltametría cíclica (C. V.) y valores de ΔG^0 calculados con la ecuación de Rehm Weller (ver texto).

Sustrato	E_p (Volts)	ΔG^0 (KJ mol ⁻¹)	k_Q mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹
CF	1,32 ^a	42,63	13,75
TB	1,34 ^a	44,60	15,91
TF	1,24 ^a	35,31	478,40
BZ	-2,12 ^b	---	-----

^a E_{ox} , medido en este trabajo. ^b E_{red} , tomado de la referencia 36.

La constante de desactivación del triplete de la benzofenona (k_Q) por transferencia electrónica puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$1 / k_Q = 1 / k_{dif} + Z^{-1} 10^{\Delta G^\# / 2,303RT} \quad (9)$$

donde k_{dif} es la constante difusional, Z es la frecuencia de colisiones y $\Delta G^\#$ es la energía libre de activación, la que puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\# = \Delta G^0 / 2 + [(\Delta G^0)^2 / 2 + ({}^0\Delta G^\#)^2]^{1/2} \quad (10)$$

donde ${}^0\Delta G^\ddagger$ es la barrera intrínseca, y representa la energía libre de activación cuando el proceso es isoenergético. De acuerdo a la teoría de Marcus^{14,15} ${}^0\Delta G^\ddagger$ está relacionada con la energía de reorganización por medio de la siguiente ecuación:

$${}^0\Delta G^\ddagger = (\lambda_i + \lambda_0) / 4 \quad (11)$$

donde λ_0 es la energía de reorganización de esfera externa. De acuerdo a la teoría de Marcus-Hush¹⁶⁻¹⁸ λ_0 puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$\lambda_0 \text{ (KJ mol}^{-1}\text{)} = 1401,6 [(1/2 a_D) + (1/2 a_A) - 1/(a_D + a_A)] (1/\eta^2 - 1/\epsilon) \quad (12)$$

donde a_D y a_A son los radios esféricos del aceptor y del donador respectivamente, η es el índice de refracción del solvente y ϵ es su constante dieléctrica. Los valores de a_D y de a_A fueron estimados utilizando el programa QSAR tal como está implementado en Hyperchem³⁴ utilizando geometrías previamente optimizadas por los métodos AM1 y PM3. La energía de reorganización de esfera interna (λ_i) puede ser estimada mediante la siguiente ecuación.¹⁹

$$\lambda_i = (\Delta H_f - \Delta H_{f(\text{opt})})_D + (\Delta H_f - \Delta H_{f(\text{opt})})_A \quad (13)$$

donde ΔH_f es el calor de formación del catión o anión radical, determinado mediante un cálculo puntual de tipo Hartree Fock restringido usando una geometría

previamente optimizada para las moléculas neutras por AM1 y PM3. $\Delta H_{f(opt)}$ representa la misma magnitud obtenida usando un cálculo puntual pero usando una geometría optimizada para el catión o anión radical como tal.

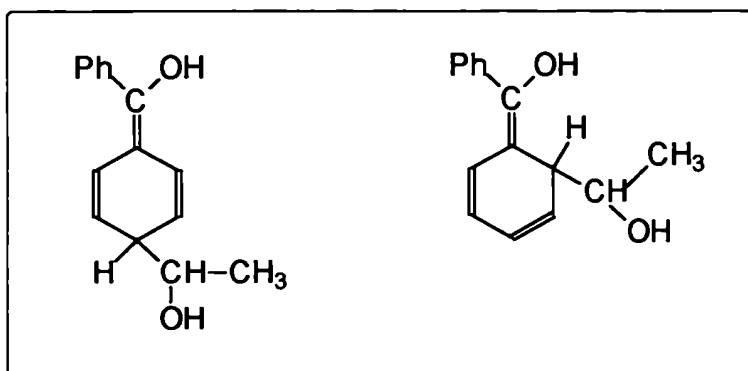
Como puede verse en la tabla 4, las constantes de desactivación del triplete de la benzofenona por parte de las diferentes xantinas mediante un proceso de transferencia electrónica, estimadas por este método, son absolutamente despreciables comparadas con los valores experimentales (tablas 1 y 2). Por lo tanto, puede descartarse a la transferencia electrónica como el mecanismo principal responsable de la reacción. Es importante señalar que las constantes de transferencia electrónica deben ser superiores a los valores informados en la tabla 4, ya que, como se explicó anteriormente, los valores de ΔG^0 utilizados son sólo una cota superior. De todos modos, las diferencias entre las constantes cinéticas de transferencia electrónica calculadas y las constantes de desactivación medidas experimentalmente por dos métodos independientes son suficientemente grandes (aproximadamente siete órdenes de magnitud) como para despreciar el error que se pudiera cometer en la estimación teórica.

3.2.5 Formación de especies transientes absorbentes (LAT).

Esta muy bien documentado en la literatura que cuando la benzofenona es irradiada en presencia de una especie donora de hidrógeno, como por ejemplo el etanol, la absorbancia en la zona del espectro correspondiente a la transición $n-\pi^*$ (entre 300 y 400 nm) aumenta en función del tiempo de irradiación. Este incremento de la absorbancia ha sido atribuido a la formación de especies

transientes de tiempos de vida largos y con altas absorptividades molares conocidas bajo el nombre de LAT (*light absorbing transient*).^{24, 37-41} Hasta el presente todos los intentos por elucidar la estructura de estos transientes resultaron infructuosos, aunque es aceptado en la literatura³⁷ que estas especies podrían ser el resultado de la reacción entre el radical difenilcarbinólico y el radical metilcarbinólico para dar un par de productos que son entre sí isómeros de posición. En el esquema 10 se muestran las estructuras de estos productos.

Tanto el isómero *orto* como el *para* presentan en su estructura el fenómeno de extensión de conjugación de dobles enlaces, conduciendo naturalmente esto a un corrimiento batocrómico de las señales en el espectro de absorción y a un incremento en los coeficientes de absorción respecto de la benzofenona.



Esquema 10. Estructuras propuestas para los transientes absorbentes (LAT).

Durante nuestras experiencias detectamos la formación de estas especies absorbentes y observamos, en concordancia con lo descrito en la literatura³⁷ que:

- (a) El rendimiento cuántico de formación de estos transientes depende de la intensidad de luz incidente (ver figura 9) y de la concentración de benzofenona, y resulta considerablemente menor que el rendimiento cuántico de consumo de benzofenona.
- (b) Estas especies son sensibles al oxígeno, y desaparecen totalmente cuando se permite la entrada de aire a las soluciones irradiadas y se las deja en la oscuridad durante varias horas (ver figura 10).

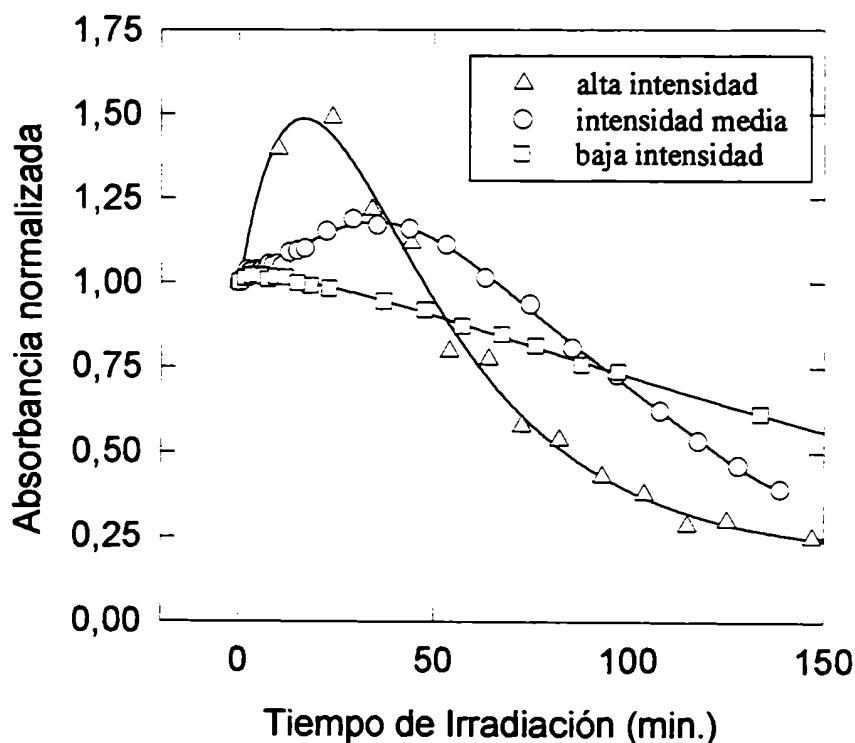


Figura 9. Absorbancia de una solución de BZ en ETOH (10^{-2} mol dm^{-3}) a 320 nm en función del tiempo de irradiación. Las distintas curvas corresponden a repeticiones del mismo experimento con intensidades de luz crecientes. Las curvas se normalizaron en absorbancia para que sean comparativas.

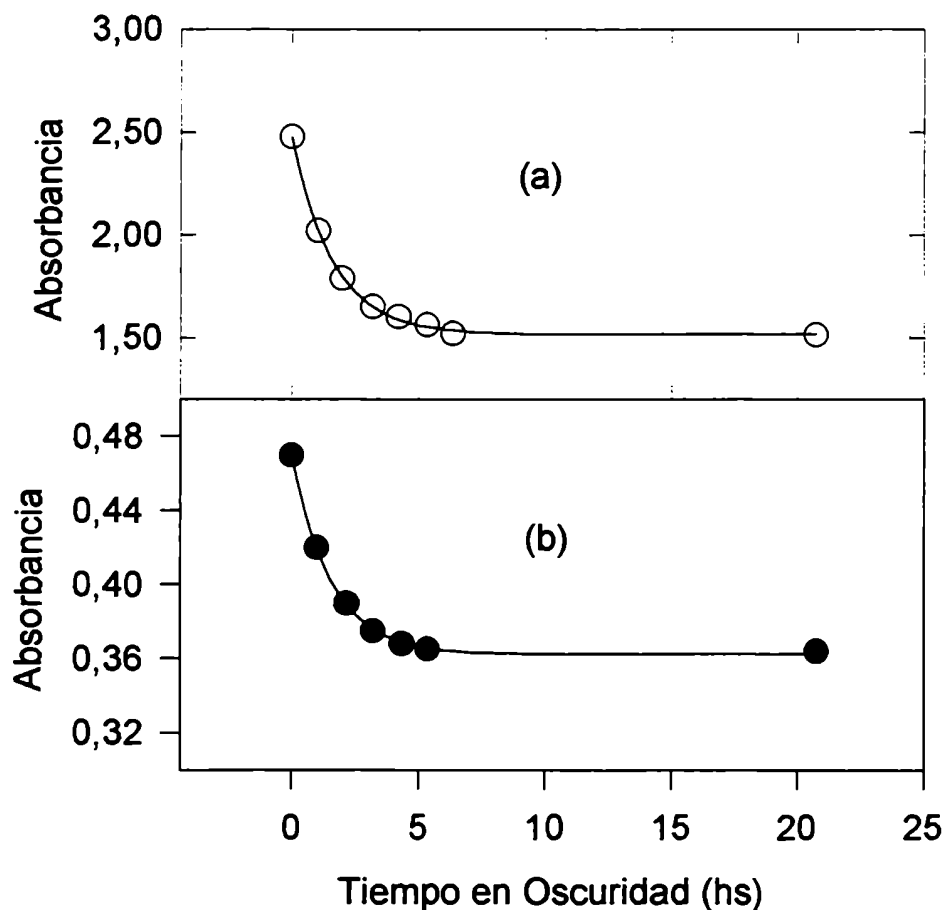


Figura 10. Decaimiento de la absorbancia a 332 nm en función del tiempo, manteniendo las muestras en la oscuridad y bajo atmósfera de aire. Las soluciones de benzofenona / cafeína (a) y de benzofenona (b) fueron previamente irradiadas durante distintos tiempos bajo atmósfera de nitrógeno. Solvente: etanol.

Como puede apreciarse en la figura 10, la velocidad de decaimiento de los transientes absorbentes es independiente de la presencia de xantinas, y además la posición del máximo de absorción es la misma. Estos resultados indican que las xantinas no tendrían ninguna participación en la formación de estas especies, y que por lo tanto los transientes absorbentes son los mismos en ausencia y en presencia de xantinas.

Cuando las reacciones se realizan en condiciones de máxima formación de estos transientes, y se analiza la mezcla de reacción por CLAR en función del tiempo en que la misma se mantiene en la oscuridad y bajo atmósfera de aire, no se observa ningún tipo de cambio en las concentraciones de reactivos y productos propios de la reacción estudiada a medida que la absorción a 332 nm decae. Estos resultados confirman que la formación de estas especies transientes corresponde a un proceso secundario de baja eficiencia y que no está involucrado en el mecanismo principal que conduce a la formación de los productos químicamente estables.

Es importante señalar que todos nuestros estudios fueron realizados en condiciones de intensidad de luz y de concentración de benzofenona que minimizan la formación de dichas especies transientes.

3.3 Resumen y conclusiones.

En el presente trabajo, se han estudiado las reacciones de la cafeína, la teofilina y la teobromina fotosensibilizadas por benzofenona. En los tres casos se aislaron y caracterizaron espectroscópicamente los cuatro productos principales de las reacciones: benzopinacol; difenilcarbinol; 1,1-difenil-1,2-propanodiol y 8-[1-(1-hidroxietil)] xantina.

Los diferentes estudios mecanísticos realizados muestran que las tres xantinas desactivan al estado triplete de la benzofenona, aunque lo hacen por diferentes mecanismos. Mientras que en el caso de la cafeína la desactivación ocurre mediante un cruce intersistemas inducido (es decir, desactivación física), la teofilina

actúa como donador de hidrógeno (desactivación química). Para el caso de la teobromina se detectan ambos procesos. Los cálculos de modelado molecular predicen adecuadamente esta tendencia observada.

Los procesos de transferencia de energía triplete-triplete y de transferencia electrónica pueden descartarse como procesos primarios de la interacción de la benzofenona excitada con las xantinas por ser éstos poco factibles tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético.

Los radicales generados por la abstracción de los hidrógenos de las posiciones 1 y 3 de la teobromina y de la teofilina respectivamente revierten rápidamente a la materia prima por abstracción de un hidrógeno carbinólico del solvente (etanol) generando un radical metilcarbinólico. Estos radicales etanólicos, junto con los generados por la abstracción de hidrógeno de la benzofenona excitada al solvente se unen rápidamente a los átomos de carbono de la posición C-8 de la cafeína, la teofilina y la teobromina generando un radical intermediario que finalmente conduce al producto principal de la reacción (8-[1-(1-hidroxietil)] xantina).

3.4 Sección Experimental.

3.4.1 Reactivos y solventes.

Las xantinas utilizadas (cafeína, teobromina y teofilina) son de alta pureza (Nacalai Tesque Inc. y Eastman Organic Chemicals), y fueron usadas sin purificación adicional. La benzofenona (Riedel-de Haën), fue recristalizada dos veces de etanol antes de su uso. El NaBH₄ y el 1,1-difenil-1,2-propanodiol (Aldrich

Chemical Co. Inc.) fueron usados tal como se los recibió. El perclorato de tetraetilamonio (Fluka Chemie) fue usado sin purificación previa. Los solventes metanol, etanol, acetonitrilo y ácido acético (J. T. Baker Inc. grado CLAR) fueron controlados por espectrofotometría y luego usados sin purificación adicional. El agua fue bidestilada y pasada por filtros Millipore antes de su uso.

3.4.2 Irradiaciones preparativas.

Se utilizaron reactores fotoquímicos equipados con lámparas de inmersión de mercurio de presión media (Hanau TQ150) con filtros Pyrex. Las soluciones etanólicas conteniendo aproximadamente 5×10^{-3} mol dm^{-3} de benzofenona y 1×10^{-3} mol dm^{-3} a 10×10^{-3} mol dm^{-3} de las diferentes xantinas, fueron irradiadas bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación permanente. Las reacciones fueron monitoreadas por CG-EM (TRIO-2 VG acoplado a un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 serie 2 y Shimadzu QP-5000 acoplado a un cromatógrafo Shimadzu 17-A), por CLAR (Shimadzu serie SCL-6 con detector UV-visible), por espectrofotometría UV-visible (espectrofotómetro con detector de arreglo de diodos Hewlett Packard 8451 A) y por cromatografía de adsorción en capa delgada (ccd).

3.4.3 Aislamiento y caracterización de los fotoproductos.

Los productos de reacción fueron aislados por cromatografía de adsorción en columna, y caracterizados por RMN- ^1H , RMN- ^{13}C (Bruker AC200), EM

(TRIO-2 VG y Shimadzu QP-5000) y punto de fusión (Fisher-Johns, valores no corregidos).

8-[1-(1-Hidroxietil)] cafeína (CFP): p. f. 180-181 °C.

RMN-¹H (Cl₃CD): δ(ppm) 1,64 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 3,38 (s, 3H); 3,51 (s, 3H); 4,01 (s, 3H); 4,98 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H); 5,56 (s, 1H)

RMN-¹³C (Cl₃CD): δ(ppm) 21,9; 27,9; 29,7; 32,1; 63,0; 108,0; 147,25; 151,6; 154,9; 155,4.

EM, m/z (%): 238 (100), 223 (52), 195 (22), 166 (26), 82 (36), 67 (77), 55 (14), 42 (26).

8-[1-(1-Hidroxietil)] teobromina (TBP): p. f. 252-254 °C.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ(ppm) 1,47 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 3,30 (s, 3H); 3,90 (s, 3H); 4,90 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H); 5,59 (s, 1H); 11,00 (s, 1H).

RMN-¹³C (DMSO-d₆): δ(ppm) 20,84; 28,41; 31,67; 60,99; 107,38; 148,39; 150,93; 155,03; 155,30.

EM, m/z (%): 224 (69), 209 (71), 194 (3), 181 (30), 166 (35), 149 (8), 138 (24), 105 (31), 95 (11), 82 (54), 67 (86), 55 (49), 43 (100).

8-[1-(1-Hidroxietil)] teofilina (TFP): p. f. 215-216 °C.

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ(ppm) 1,42 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 3,21 (s, 3H); 3,41 (s, 3H); 4,76 (c, *J* = 6,6 Hz, 1H); 5,55 (s, 1H); 13,17 (s, 1H).

RMN-¹³C (DMSO-d₆): δ(ppm) 22,31; 27,62; 29,62; 63,00; 106,06; 147,70; 151,16; 154,08; 157,11.

EM, m/z (%): 224 (58), 206 (81), 195 (2), 181 (15), 166 (5), 152 (12), 138 (3), 121 (74), 105 (9), 94 (14), 80 (10), 68 (100), 53 (48), 42 (45).

Difenilcarbinol (BZH): p. f. 68 °C.

RMN-¹H (Cl₃CD): δ(ppm) 2,25 (s, 1H); 5,82 (s, 1H); 7,35 (m, 10H).

RMN-¹³C (Cl₃CD): δ(ppm) 76,33; 126,66; 127,64; 128,58; 143,92.

EM, m/z (%): 184 (44), 165 (11), 152 (7), 105 (100).

Benzopinacol (BZP): p. f. 190,5 °C.

RMN-¹H (Cl₃CD): δ(ppm) 3,02 (s, 2H); 7,17 (m, 12H); 7,30 (m, 8H).

RMN-¹³C (Cl₃CD): δ(ppm) 83,14; 127,02; 127,37; 128,69; 144,29.

EM, m/z (%): 183 (100), 165 (4), 105 (87), 82 (2), 77 (65), 51 (18).

1,1-Difenil-1,2-propanodiol (PMX): p. f. 93-94 °C.

RMN-¹H (Cl₃CD): δ(ppm) 1,06 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H); 1,89 (s, 1H); 3,00 (s, 1H); 4,75 (c, *J* = 6,3 Hz, 1H); 7,22 (m, 6H); 7,48 (m, 4H).

RMN-¹³C (Cl₃CD): δ(ppm) 16,78; 71,71; 80,01; 125,69; 126,37; 126,85; 127,31; 128,21; 128,68; 144,05; 145,69.

EM, m/z (%): 183 (100), 165 (9), 105 (98), 82 (5), 77 (70), 51 (28).

Cuando las irradiaciones se realizaron en atmósfera de aire se pudieron identificar, para el caso de la cafeína, mediante CG-EM, los siguientes productos (similares resultados se obtienen para teobromina y teofilina):

CFP: EM, m/z (%): 238 (100), 223 (52), 195 (22), 166 (26), 82 (36), 67 (77), 55 (14), 42 (26).

8-Acetylcafeína: EM, m/z (%): 236 (100), 221 (6), 193 (12), 151 (30), 108 (8), 82 (13), 67 (64), 55 (9), 43 (21).

3.4.4 Síntesis de compuestos.

El difenilcarbinol fue obtenido por reducción de la benzofenona con exceso de NaBH₄ en isopropanol. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente hasta que no se detectó más benzofenona por ccd. (aproximadamente 2 hs.). El exceso de NaBH₄ fue destruido mediante agregado gota a gota de solución acuosa saturada de NH₄Cl. La solución resultante fue extraída con hexano. La identidad del producto fue confirmada por RMN-¹H, RMN-¹³C y EM.

El benzopinacol fue preparado por irradiación de una solución de benzofenona en isopropanol, utilizando una lámpara de mercurio de baja presión (Hareaus GmbH POH-EL; $\lambda = 254$ nm) como fuente de luz, bajo atmósfera de nitrógeno. El precipitado obtenido fue filtrado y lavado con porciones frescas de isopropanol y recristalizado de etanol. La identidad del producto fue confirmada por RMN-¹H, RMN-¹³C y EM.

3.4.5 Mediciones cinéticas en estado estacionario.

Teniendo en cuenta la formación de las especies absorbentes mencionadas en la sección 3.2.4, el consumo de benzofenona durante las irradiaciones realizadas en estado estacionario se determinó por espectrofotometría de absorción UV-visible. Los espectros de absorción se registraron antes de iniciar las irradiaciones y luego de finalizadas, tomando la precaución de dejar las soluciones irradiadas en la

oscuridad y bajo atmósfera de aire durante 24 horas antes de realizar las medidas espectrofotométricas para asegurar de esta manera el total decaimiento de estos transientes.

También se utilizó la técnica CLAR para monitorear a los reactivos y a los productos durante el transcurso de las irradiaciones. Para ello se utilizó una columna cromatográfica de fase reversa Supelcosil LC-18 de 4,6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partículas y 25 cm de largo. Las eluciones se realizaron por el método de gradiente binario de acuerdo al programa que se muestra en la figura 11.

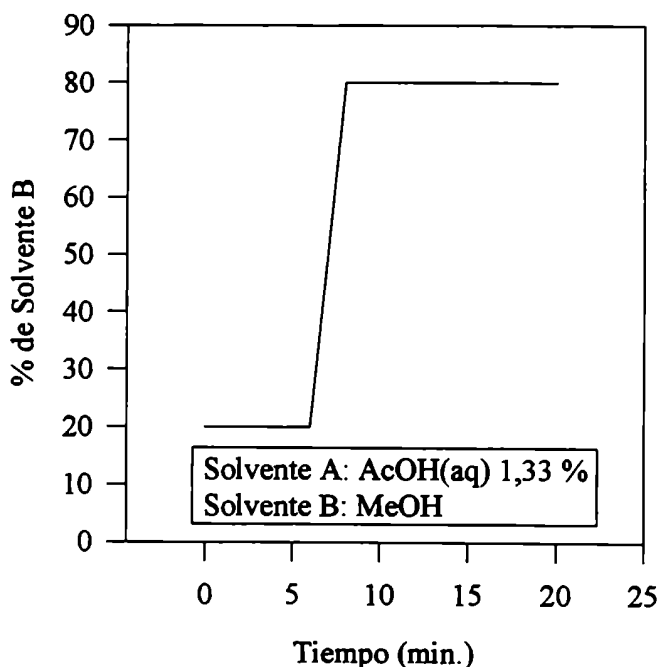


Figura 11. Condiciones experimentales utilizadas en las determinaciones por CLAR.

Para cuantificar a los reactivos y productos se utilizaron estándares internos de ácido benzoico, cafeína y teofilina. En todos los casos se construyeron curvas de

calibración utilizando concentraciones conocidas de los reactivos y productos y de los diferentes estándares empleados. En todos los casos la detección se realizó por absorción a 266 nm. En la figura 12 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos.

En algunos casos se analizaron las mezclas de reacción por cromatografía gaseosa utilizando un detector de ionización de llama o un espectrómetro de masas. Para estos análisis se utilizaron indistintamente diferentes columnas capilares de polaridades intermedias (HP-17, HP-5, SPB-20, U-2). Típicamente se utilizaron temperaturas variables para el calentamiento de las columnas con programas que comenzaban aproximadamente a 120 °C (1 min.), seguidos de una rampa de temperatura de 10 °C/min. hasta llegar a 290 °C. En la figura 13 se muestra un cromatograma típico obtenido en dichas condiciones experimentales.

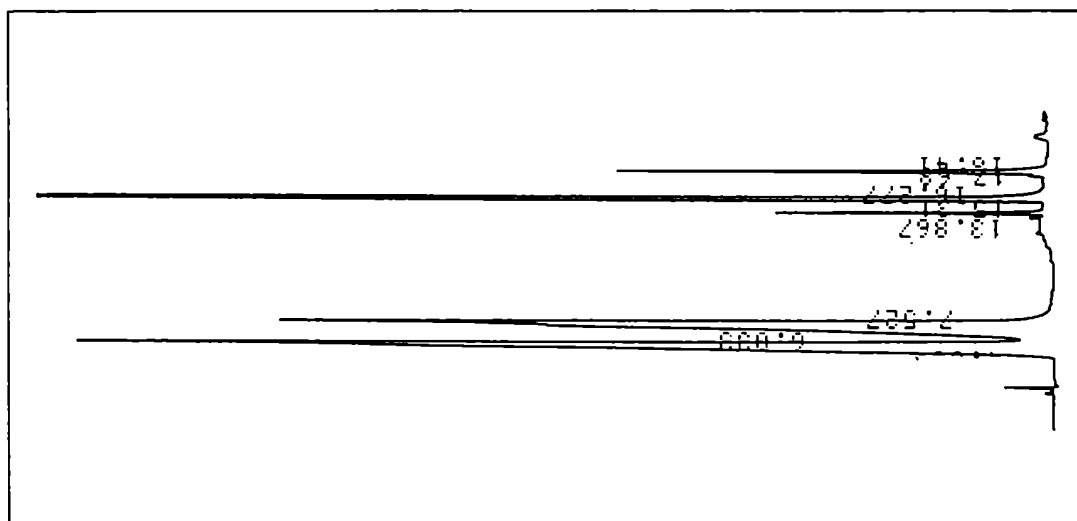


Figura 12. Cromatograma (CLAR) de una solución etanólica de cafeína/benzofenona luego de su irradiación.

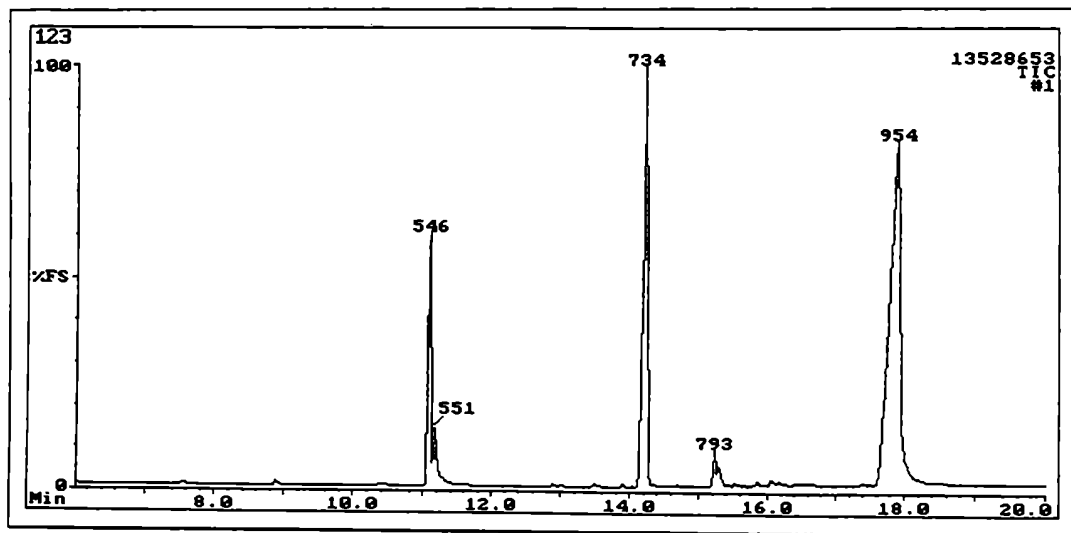


Figura 13. Cromatograma (CG) de una solución etanólica de cafeína/benzofenona luego de ser irradiada.

Es importante señalar que para este caso particular la utilidad de la cromatografía gaseosa resulta bastante limitada ya que, por un lado las polaridades tan diferentes de la benzofenona y sus productos de reacción respecto de las xantinas y sus productos hacen muy dificultoso encontrar una única columna cromatográfica que resulte realmente eficiente para todos los componentes de una mezcla de reacción típica. Por otro lado, uno de los productos principales de la fotorreducción de la benzofenona como es el benzopinacol resultó ser termolábil, descomponiéndose a benzofenona y benzohidrol dentro del mismo cromatógrafo gaseoso. Por estos motivos la técnica de CG sólo resultó útil para monitorear el consumo de las diferentes xantinas y la aparición de sus productos. En estas experiencias se utilizaron antraceno, cafeína y teofilina como estándares internos.

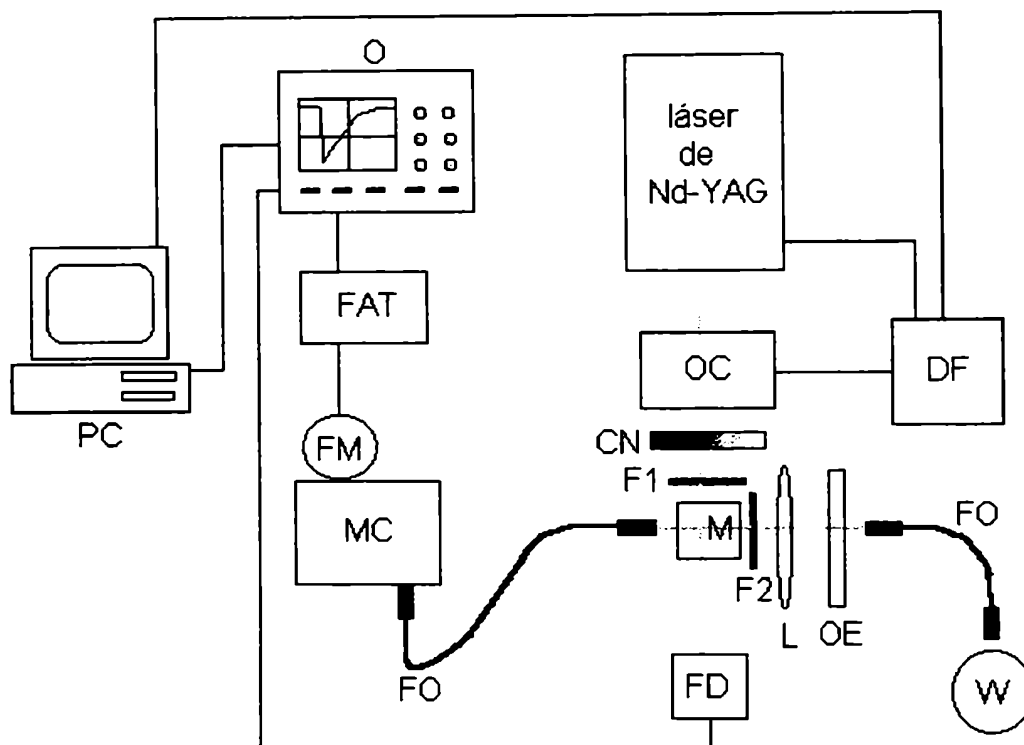
Las irradiaciones fueron realizadas en un banco óptico de fabricación casera equipado con una lámpara de mercurio de presión media (Hanau TQ-150) y un filtro óptico de línea de mercurio (Oriel 56531; $\lambda_{\text{max}} = 367$ nm; ancho de banda 10,3 nm). Las soluciones se colocaron en celdas espectrofotométricas de cuarzo provistas de tapas de teflon (Wilmad; 1x1 cm), y fueron burbujeadas con nitrógeno durante 15 minutos antes de la irradiación.

Los rendimientos cuánticos fueron determinados utilizando el actinómetro de Parker y Hatchard²³ para medir la intensidad de luz absorbida por la muestra. Para ello se utilizó un portaceldas de dos hileras paralelas, que permite colocar dos celdas alineadas una a continuación de la otra. El procedimiento entonces consistió en determinar en primer lugar la intensidad de luz incidente (I_0) colocando en el portaceldas sólo una celda conteniendo al actinómetro. En segundo lugar se determinó la intensidad de luz transmitida por la muestra (I_t). Para ello se interpuso entre la lámpara y la celda conteniendo al actinómetro, una segunda celda que contenía a la solución de interés. Finalmente, la intensidad absorbida por la muestra (I_a) se calcula como $I_a = I_0 - I_t$.

Los reactivos y productos fueron cuantificados por espectrofotometría UV-visible luego de mantener las soluciones durante 24 hs. en la oscuridad y bajo atmósfera de aire para asegurar el total decaimiento del intermediario absorbente (LAT), y también por CLAR utilizando, como ya se mencionó estándares internos.

3.4.6 Mediciones realizadas con resolución temporal.

El esquema del equipo de láser flash fotólisis utilizado se muestra a continuación:



Esquema 11. Esquema del equipo de láser flash fotólisis empleado para realizar las medidas cinéticas con resolución temporal.

El pulso de luz es generado por un láser de Nd:YAG operando en su tercer armónica (354 nm) (Spectron Lasers). Las soluciones conteniendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de benzofenona y cantidades variables de las diferentes xantinas en EtOH o CH_3CN o mezclas $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$, fueron colocadas en celdas de fluorescencia de cuarzo (M) de 1x1 cm provistas de tapa a rosca con septum de teflon-siliconas (Wilmad), y

burbujeadas durante 15 minutos con nitrógeno antes de las mediciones. La detección de la absorción utiliza una lámpara de tungsteno de 100 W (PTI) como fuente de luz (W). El haz de análisis se condujo por medio de fibras ópticas (FO) a un monocromador (MC), interponiendo entre la salida de la fibra óptica proveniente de la lámpara y la celda que contiene a la muestra, una lente (L) y un obturador electrónico (OE). A la salida del monocromador se encuentra un fotomultiplicador (FM) Hamamatsu R928 como detector, alimentado por una fuente de alta tensión (FAT) cuya señal es registrada y promediada en un osciloscopio digital (O) Hewlett Packard 54502 y luego almacenada en una computadora personal (PC). El disparo del osciloscopio se realiza en forma óptica por medio de un fotodiodo (FD). La repetición de los pulsos de excitación se controló mediante un obturador cerámico (OC) controlado mediante un divisor de frecuencias (DF) sincrónico con el láser. La energía de los pulsos del láser se varió por atenuación con una cuña de filtro neutro. Los haces de excitación y de análisis fueron filtrados con filtros de corte de 300 nm (F1) y de 400 nm (F2) respectivamente.

3.4.7 Potenciales de oxidación.

Los potenciales de oxidación de las xantinas fueron estimados por voltametría cíclica. Se utilizó un amplificador-potenciostato operacional EQMAT. Todos los potenciales fueron medidos contra un electrodo de Ag/AgNO₃ como referencia. Las velocidades de barrido fueron típicamente de 100 mV s⁻¹. Las soluciones conteniendo aproximadamente 1,5 × 10⁻³ mol dm⁻³ de las diferentes

xantinas y $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ de perclorato de tetraetilamonio como electrolito soporte fueron preparadas con CH_3CN previamente secado. Algunos de los voltagramas obtenidos se muestran en las figuras 6, 7 y 8 de la sección 3.2.4.

3.4.8 Determinaciones de energías de los estados triplete.

Las energías de los tripletes fueron estimadas a partir de los espectros de fosforescencia realizados a bajas temperaturas. Para ello se utilizó un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS5 equipado con un accesorio de fosforescencia refrigerado por nitrógeno líquido. Las soluciones etanólicas fueron colocadas en celdas cilíndricas (2 mm de diámetro interno) de cuarzo. Para la estimación de la energía se tomó el primer hombro de los espectros de fosforescencia: cafeína, $\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$; teofilina, $\lambda_{\text{max}} = 392 \text{ nm}$; teobromina, $\lambda_{\text{max}} = 392 \text{ nm}$. (Ver más detalles experimentales en el capítulo 1).

3.4.9 Cálculos semiempíricos.

Las geometrías moleculares fueron optimizadas mediante los métodos semiempíricos AM1 y PM3 tal como están implementados en el programa Hyperchem 5.0.³⁴ Los radicales fueron optimizados utilizando la aproximación de Hartree Fock no restringida, mientras que para las otras estructuras se utilizó la aproximación restringida. Para todos los cálculos se utilizó el método de optimización de Polack Riviere. Los calores de formación fueron obtenidos mediante cálculos puntuales utilizando la aproximación no restringida de Hartree Fock en todos los casos, incluidos los radicales.

3.5 Referencias.

- (1) Robinson, T. (1968) *The Biochemistry of Alkaloids*, Springer Verlag, N. Y.
- (2) Murgida, D. H., R. Erra-Balsells y G. M. Bilmes (1996) New photocalorimetric references for UV excitation. *Chem. Phys. Lett.* **250**, 198-202.
- (3) Murgida, D. H., G. M. Bilmes y R. Erra-Balsells (1996) A photophysical study of purines and theophylline by using laser – induced optoacoustic spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **64**, 777-784.
- (4) Cadet, J., M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, S. Raoul y J. R. Ravanat (1994) 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-erythro-pentafuranosyl)amino]-5-(2*H*)-oxazolone: A novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7403-7404.
- (5) Morin, B. y J. Cadet (1994) Benzophenone photosensitization of 2'-deoxyguanosine: characterization of the 2R and 2S diastereoisomers of 2-methoxy-4,5-imidazolidinedione. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA – protein crosslinks. *Photochem. Photobiol.* **60**, 102-109.
- (6) Armitage, B., Ch. Yu, Ch. Devadoss y G. B. Schuster (1994) Cationic anthraquinone derivatives as catalytic DNA photonucleases: mechanisms for DNA damage and quinone recycling. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9847-9859.

-
- (7) Görner, H. (1994) Photochemistry of DNA and related biomolecules: quantum yields and consequences of photoionization. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology* **26**, 117-139.
 - (8) Morin, B. y J. Cadet (1995) Chemical aspects of the benzophenone – photosensitized formation of two lysine-2'-deoxyguanosine cross links. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12408-12415.
 - (9) Bienvenu, C., J. R. Wagner y J. Cadet (1996) Photosensitized oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine by 2-methyl-1,4-naphtoquinone: characterization of 5-(hydroperoxymethyl)-2'-deoxycytidine and stable methyl group oxidation products. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11406-11411.
 - (10) Clennan E. L. (1991) Synthetic and mechanistic aspects of 1,3-diene photooxidations. *Tetrahedron* **47** 1343-1382.
 - (11) Charlier, M. y C. Hélène (1972) Photochemical reactions of aromatic ketones with nucleic acids and their components. I-Purine and pyrimidine bases and nucleosides. *Photochem. Photobiol.* **15**, 71-87.
 - (12) Kasama, K., A. Takematsu y S. Arai (1982) Photochemical reactions of triplet acetone with indole, purine and pyrimidine derivatives. *J. Phys. Chem.* **86**, 2420-2427.
 - (13) Rehm, D. y A. Weller (1970) Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer. *Isr. J. Chem.* **8**, 259-271.
 - (14) Marcus, R. A. (1963) On the theory of oxidation – reduction reactions involving electron transfer. V. Comparison and properties of electrochemical and chemical rate constants. *J. Phys. Chem.* **67**, 853-857.

-
- (15) Marcus, R. A. (1964) Chemical and electrochemical electron – transfer theory. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **15**, 155-196.
- (16) Marcus, R. A. (1956) Theoretical relations among rate constants, barriers and Brønsted slopes of chemical reactions. *J. Chem. Phys.* **24**, 966-978.
- (17) Hush, N. S. (1958) Adiabatic rate processes at electrodes. I. Energy charge relationships. *J. Chem. Phys.* **28**, 962-972.
- (18) Kojima, H. y A. Bard (1975) Determination of rate constants of the electroreduction of aromatic compounds and their correlation with homogeneous electron transfer rates. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6317-6324.
- (19) Fukuzumi, S., M. Fujita, J. Otera y Y. Fujita (1992) Electron – transfer oxidation of ketene silyl acetals and other organosilanes. The mechanistic insight into Lewis acid mediated electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10271-10278.
- (20) Turro, N. J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry*. The Benjamin / Cumming Publishing Co. New York. (b) Coyle, J. D. (1986) *Introduction to Organic Photochemistry*. John Wiley & Sons, G. B.
- (21) Solomon, J. y D. Elad (1973) Photochemical reactions of nucleic acids constituents. Peroxi – initiated reactions of purines with alcohols. *J. Org. Chem.* **38**, 3420-3421.
- (22) Erndt, A., A. Kostuch, A. Para y M. Fiedrowicz (1984) Photochemistry of purine systems, part III. Photoreactions of theophylline with alcohols in the presence of aliphatic ketones. *Monatsheft für Chemie* **115**, 383-390.

-
- (23) Hatchard, C. G. y C. A. Parker (1956) A new sensitive chemical actinometer. II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. *Proc. Roy. Soc. (A)* **235**, 518-536.
- (24) Beckett, A. y G. Porter (1963) Primary photochemical processes in aromatic molecules. Part 9. Photochemistry of benzophenone in solution. *Trans. Faraday Soc.* **59**, 2038-2050.
- (25) Carmichael, Y. y G. L. Hug (1986) Triplet – triplet absorption spectra of organic molecules in condensed phase. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **15**, 1-250.
- (26) Porter, G. y M. R. Topp (1970) Nanosecond flash photolysis. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **315**, 163-184.
- (27) Bensasson, R. V. y J. C. Gramain (1980) Benzophenone triplet properties in acetonitrile and water. Reduction by lactams. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **76**, 1801-1810.
- (28) Shizuka, H. y H. Obuchi (1982) Anion – induced triplet quenching of aromatic ketones by nanosecond laser photolysis. *J. Phys. Chem.* **86**, 1297-1302.
- (29) Adams, G. E. y R. L. Willson (1973) Ketyl radicals in aqueous solution. Pulse radiolysis study. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **69**, 719-729.
- (30) Redmond, R. W., J. C. Scaiano y L. J. Johnston (1990) Photochemistry of diphenylketyl radicals in polar solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 398-402.
- (31) Shida, T. (1988) *Electronic Absorption Spectra of Radical Ions*, Elsevier, New York.

-
- (32) Murov, S. L., Y. Carmichael y G. L. Hug (1993) *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, New York.
- (33) Sandros, K. y H. L. J. Backstrom (1962) Transfer of triplet state energy in fluid solutions. II. Further studies of the quenching of biacetyl phosphorescence in solution. *Acta Chem. Scand.* **16**, 958-968.
- (34) *HyperChem Release 5.0 for Windows*. Autodesk, Inc., Canada, (1996).
- (35) Kikuchi, K. (1992) A new aspect of photoinduced electron transfer in acetonitrile. *J. Photochem. Photobiol. A; Chem.* **65**, 149-156.
- (36) Wagner, P. J., R. J. Truman, A. E. Puchaski y R. J. Wake (1986) Extent of charge transfer in the photoreduction of phenyl ketones by alkylbenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7727-7738.
- (37) Viltres Costa, C., M. A. Grela y M. S. Churio (1996) On the yield of intermediates formed in the photoreduction of benzophenone. *J. Photochem. Photobiol. A; Chem.* **99**, 51-56.
- (38) Pitts, N. J., R. L. Letsinger, R. P. Taylor, J. M. Patterson, G. Recktenwald y R. B. Martin (1959) Photochemical reactions of benzophenone in alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1068-1077.
- (39) Filipescu, N y F. Minn (1968) On the photoreduction of benzophenone in isopropyl alcohol. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1544-1547.
- (40) Chilton, J., L. Giering y C. Steel (1976) The effect of transient photoproducts in benzophenone – hydrogen donor systems. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 1865-1870.

-
- (41) Rubin, M. B. (1982) New observations on the photopinacolization of benzophenone in aliphatic alcohols. *Tetrahedron Lett.* **23**, 4615-4618.

Capítulo 4

Reacciones de xantinas fotosensibilizadas con Rosa de Bengala

4.1 Introducción.

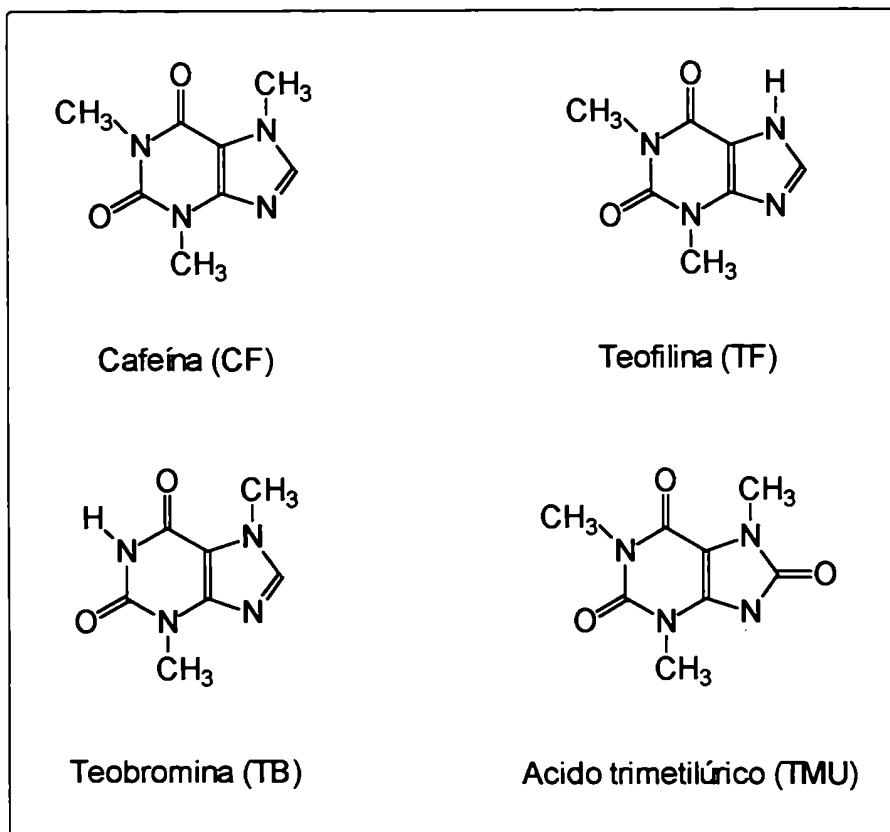
4.1.1 Aspectos generales.

Como ya se explicó en la introducción del capítulo 3, las reacciones de oxidación fotosensibilizadas pueden ocurrir mediante dos tipos de mecanismos denominados fotooxidaciones de tipo I y de tipo II.

En el capítulo 3 se mostraron ejemplos de fotooxidaciones de tipo I de xantinas, donde las interacciones entre el fotosensibilizador en su estado excitado y la teofilina o la teobromina conducen a la abstracción de un hidrógeno de las xantinas. En este capítulo se describen los resultados obtenidos en el estudio de reacciones de oxidación fotosensibilizadas con Rosa de Bengala de las mismas tres xantinas estudiadas en el capítulo 3 (cafeína, teofilina y teobromina) y de una cuarta oxopurina, el ácido trimetilúrico (ver esquema 1).

A lo largo de este capítulo se describen y discuten distintas evidencias experimentales obtenidas mediante técnicas de estado estacionario (actinometrías de fotólisis estacionarias) y con resolución temporal (láser flash fotólisis y fosforescencia infrarroja de oxígeno singulete resuelta en tiempo) que permiten proponer un mecanismo de reacción de tipo II.

Por otra parte, a partir de los resultados obtenidos al correlacionar las constantes de reacción en diferentes solventes con los parámetros que describen la polaridad y la capacidad donora de hidrógeno de esos solventes, se propone la formación de un exciplexo inicial entre las oxopurinas y el oxígeno singulete, que luego evoluciona hacia la formación de un zwitterión intermediario.

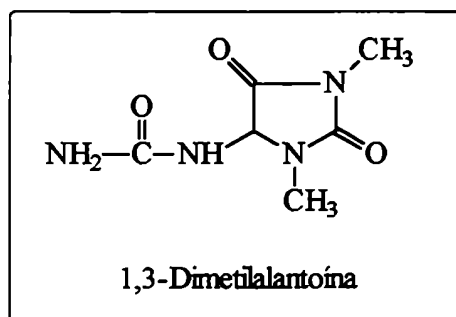


Esquema 1

4.1.2 Antecedentes sobre fotooxidaciones de purinas.

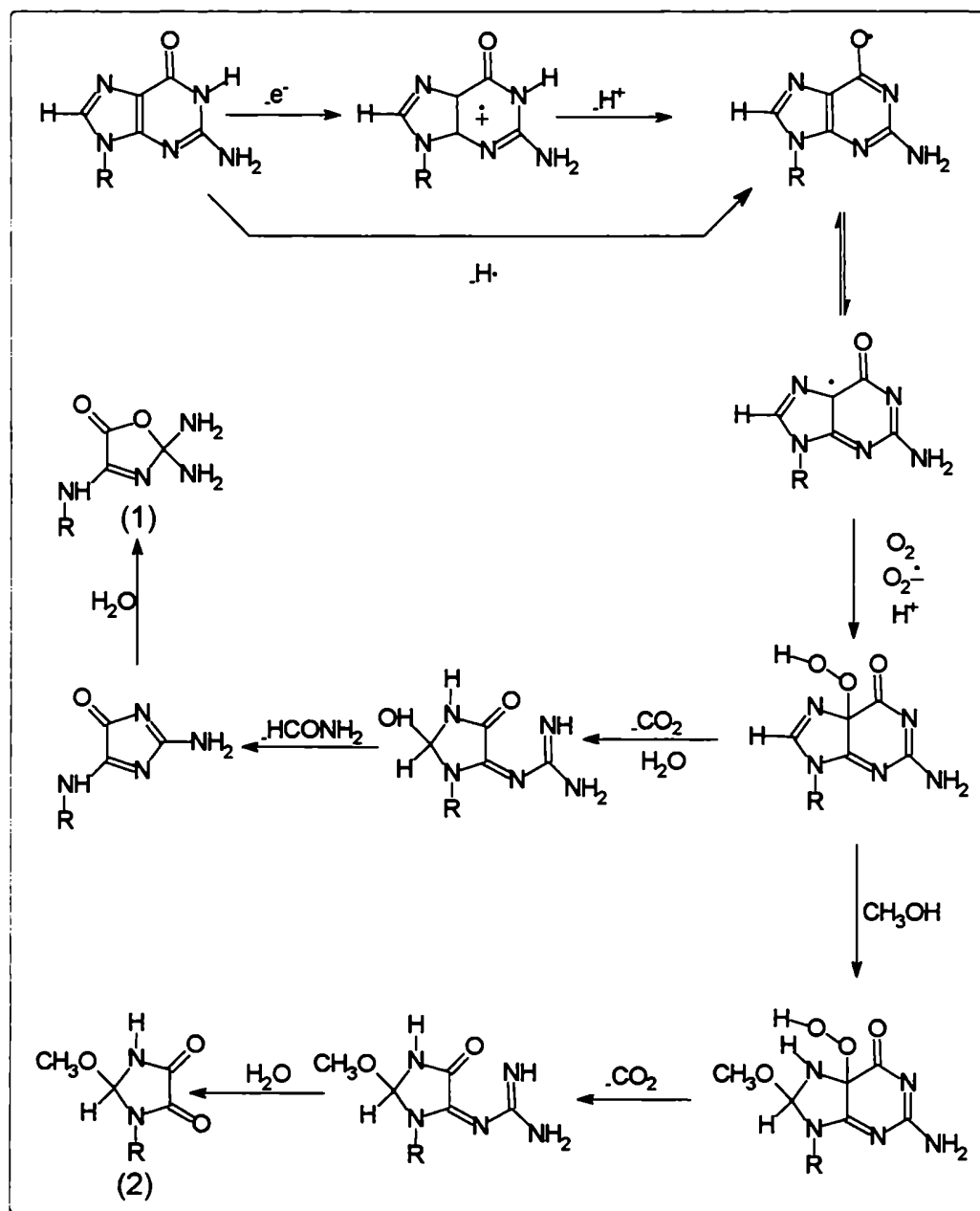
En 1964 Simon y col.¹ en un estudio realizado en medio acuoso y en presencia de buffers utilizando azul de metileno como sensibilizador, establecieron que el orden de reactividad de una serie de derivados purínicos frente a la fotooxidación es el siguiente: ácido úrico > xantosina > xantina > guanosina > teofilina > teobromina > cafeína. En este mismo trabajo determinaron además que la velocidad de reacción aumenta con el pH del medio. Sin embargo, los autores no

realizaron un estudio mecanístico detallado, y sólo se limitan a describir un producto aislado luego de irradiar una solución de teofilina y azul de metileno. Este producto fue identificado como 1,3-dimetilalantoína (ver esquema 2).



Esquema 2

En 1994 Morin y Cadet² estudiaron la fotooxidación de la 2'-deoxiguanosina utilizando benzofenona como sensibilizador. Las irradiaciones se realizaron en una mezcla de H₂O : MeOH (1:1) con flujo continuo de O₂. Los productos principales fueron aislados por CLAR e identificados por dicroísmo circular, RMN y EM (FAB). En base a la estructura de los productos obtenidos (1 y 2 del esquema 3) los autores propusieron el siguiente mecanismo de reacción:



Esquema 3

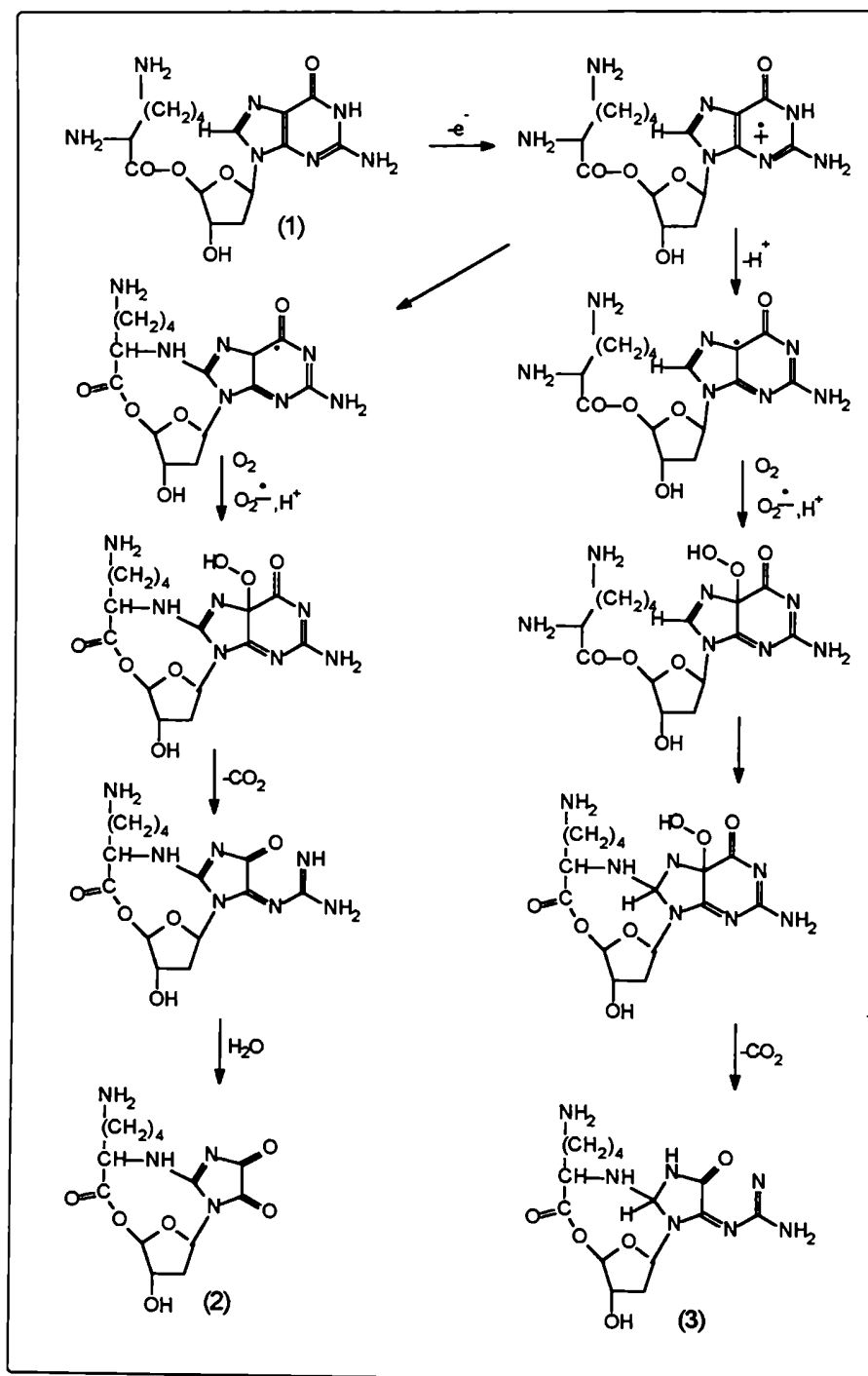
En 1995 Morin y Cadet³ sintetizaron el ester 5' de la 2'-deoxiguanosina con la L-lisina (1 del esquema 4) y estudiaron su oxidación en solución acuosa saturada permanentemente con O_2 , utilizando benzofenona como sensibilizador. Mediante la

técnica de CLAR lograron aislar los dos productos principales (2 y 3 del esquema 4) y los caracterizaron por RMN y EM (FAB). Teniendo en cuenta la estructura de los productos aislados los autores propusieron el mecanismo de reacción que se muestra en el esquema 4.

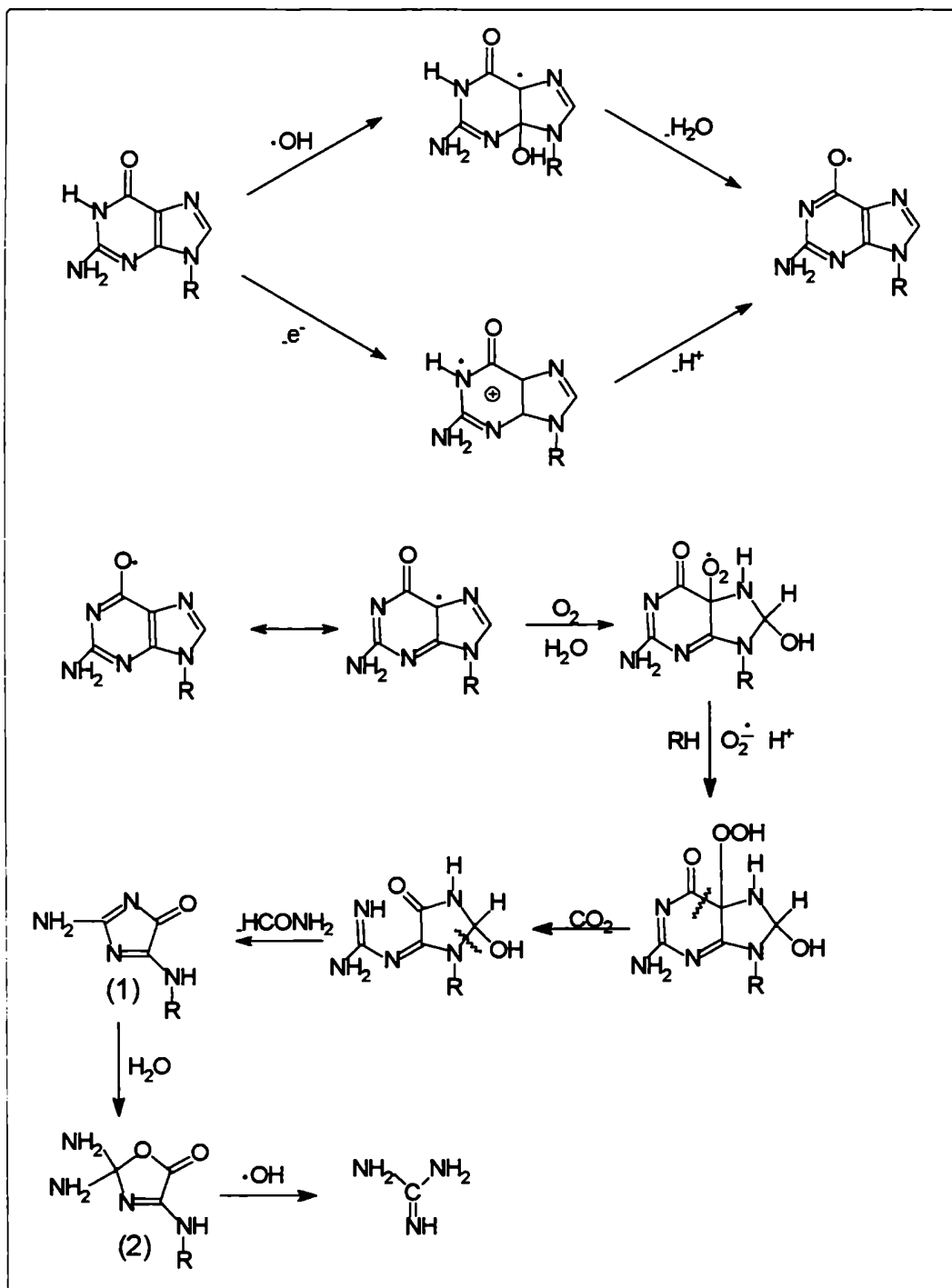
En 1994 Cadet y col.⁴ estudiaron la reactividad de la 3',5'-Di-O-acetil-2'-deoxiguanosina frente a radicales OH[•] generados por radiólisis pulsada en solución acuosa, y compararon estos resultados con la oxidación fotoquímica utilizando benzofenona como sensibilizador. En ambos casos aislaron los dos productos principales (1 y 2 del esquema 5) y en base a su estructura propusieron el mecanismo que se muestra en el esquema 5.

En 1992 Ravanat y col.⁵ estudiaron la fotooxidación de la 2'-deoxiguanosina en medio acuoso en dos condiciones distintas: (a) en condiciones de favorecer la reacción de tipo II (usando D₂O como solvente y ftalocianina o naftalocianina como sensibilizadores) y (b) en condiciones de favorecer la reacción de tipo I usando benzofenona como sensibilizador.

En todos los casos las irradiaciones se efectuaron bajo atmósfera de O₂. Los productos principales (1, 2 y 3 del esquema 6) fueron aislados por CLAR, y en base a su estructura, los autores proponen los dos tipos de mecanismos que se muestran en el esquema 6.

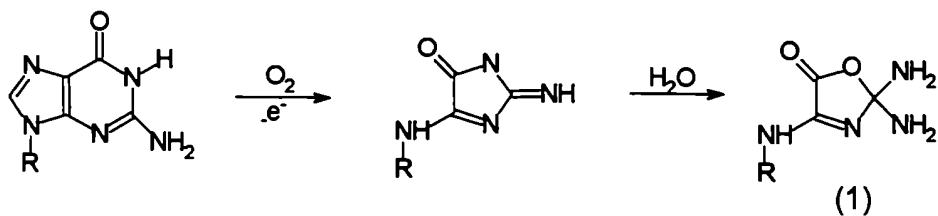


Esquema 4

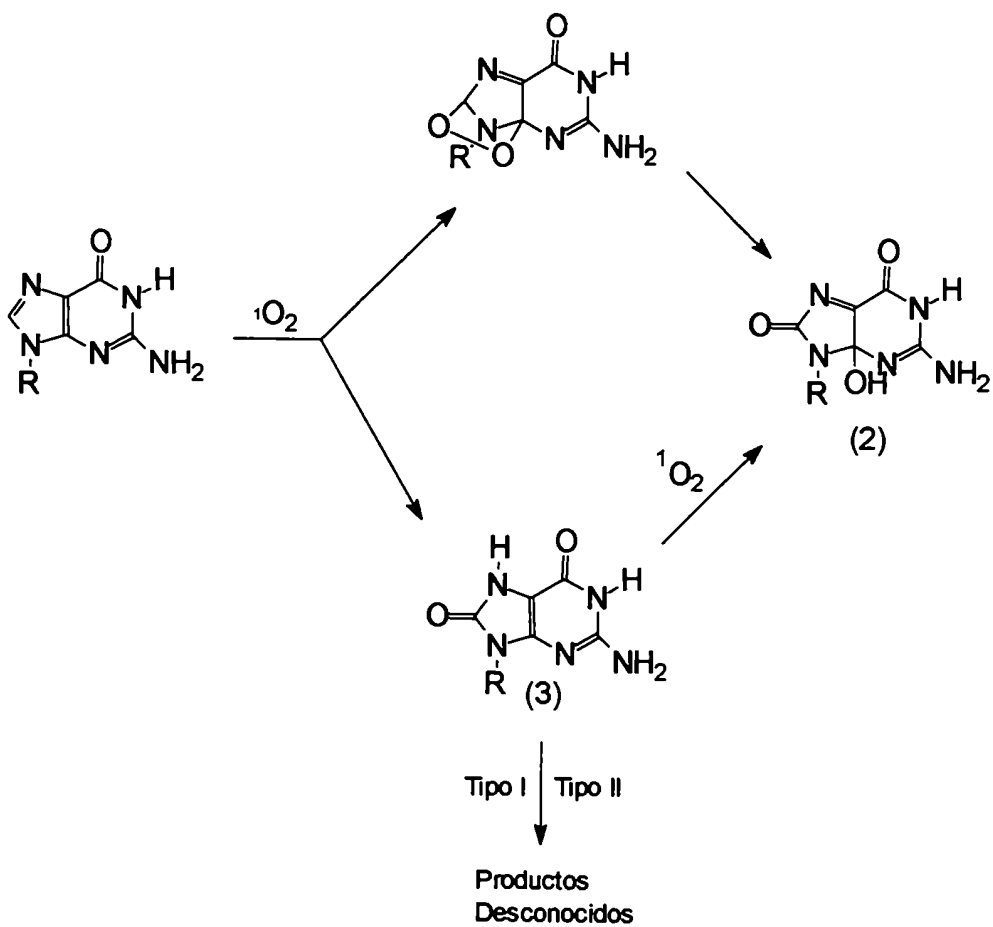


Esquema 5

(a) Fotooxidaciones de tipo I:



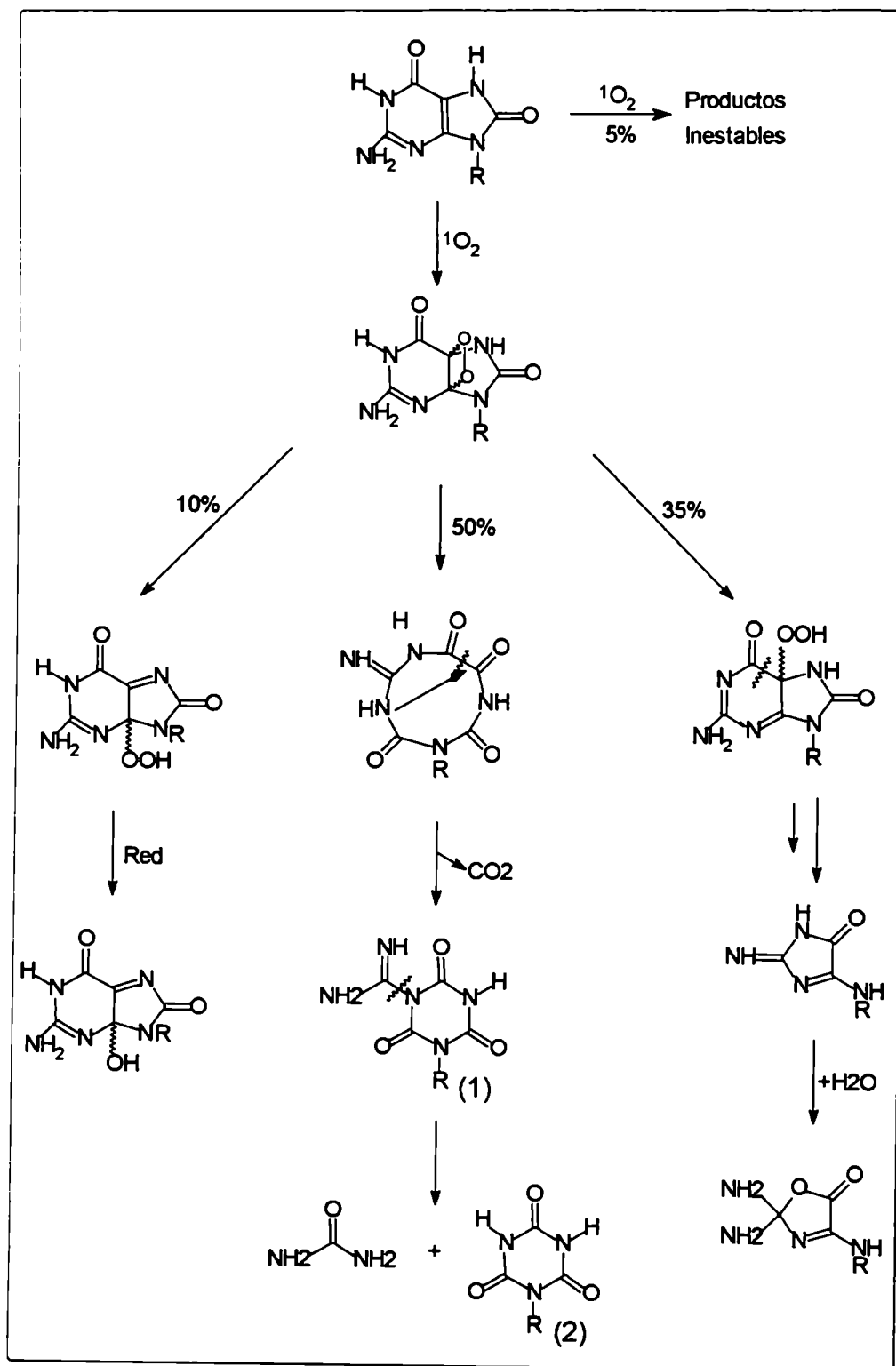
(b) Fotooxidaciones de tipo II:



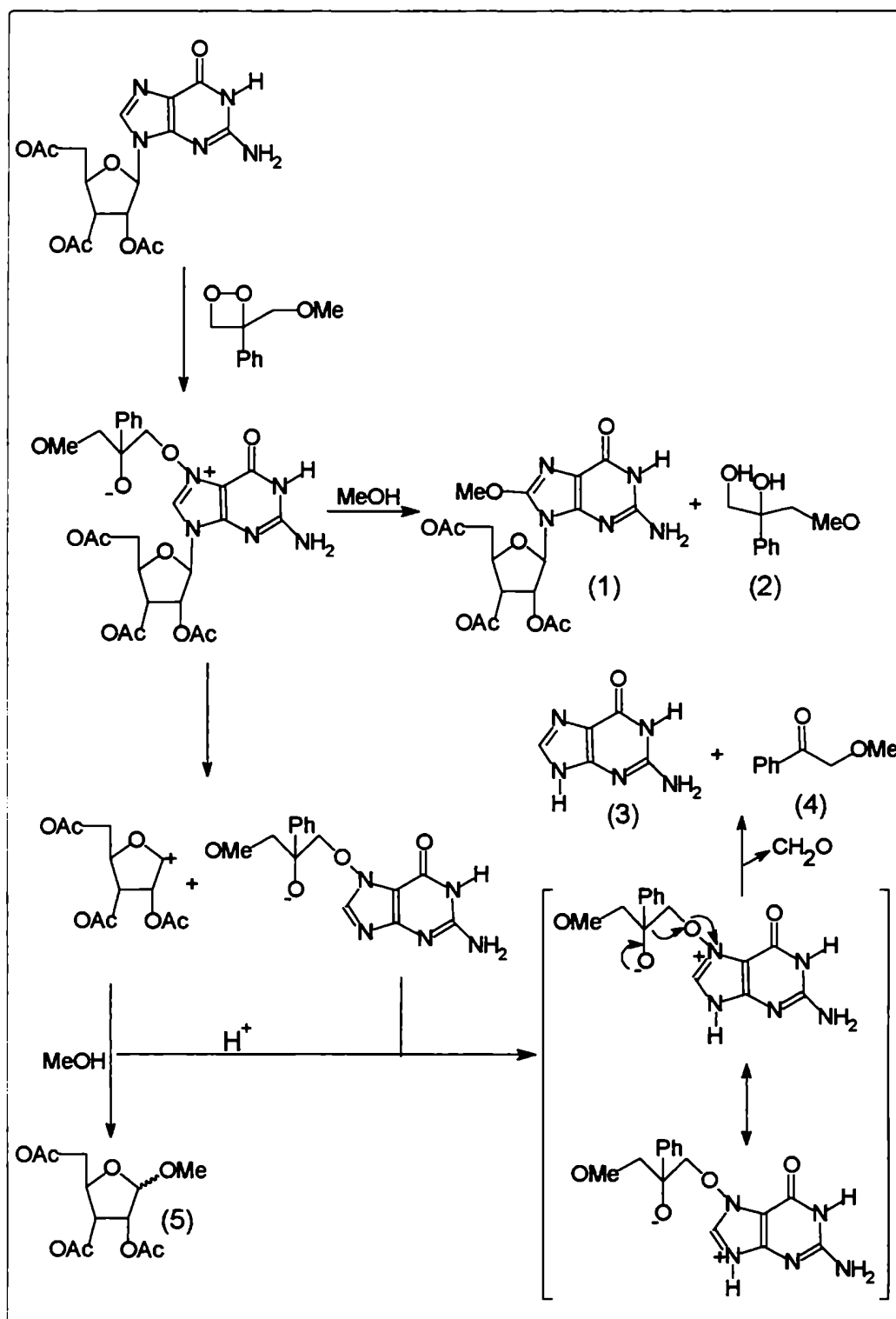
Esquema 6

En 1996 Raoul y Cadet⁶ estudiaron la oxidación de la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina en medio acuoso utilizando diferentes sensibilizadores (Rosa de Bengala, azul de metileno, etc.). Los productos principales (1 y 2 del esquema 7) fueron aislados por CLAR, y en base a sus estructuras los autores propusieron el mecanismo de reacción que se muestra en el esquema 7.

En 1995 Adam y Treiber⁷ estudiaron la oxidación de la guanosina acetilada usando un dioxetano como agente oxidante, mediante una sustitución nucleofílica bimolecular al enlace de un 1,2-dioxetano. Dado que las experiencias fueron realizadas a 0 °C, los autores descartaron la generación de cetonas excitadas por medio de una reacción retro-electrocíclica, y por lo tanto también descartaron la posibilidad de transferencia electrónica y de generación de $^1\text{O}_2$ a partir de dichas especies excitadas. En base a los productos de reacción aislados (1 al 5 del esquema 8), ellos proponen un mecanismo de reacción cuyo proceso primario consiste en una sustitución nucleofílica bimolecular de la guanosina al enlace dioxetano (ver esquema 8).



Esquema 7



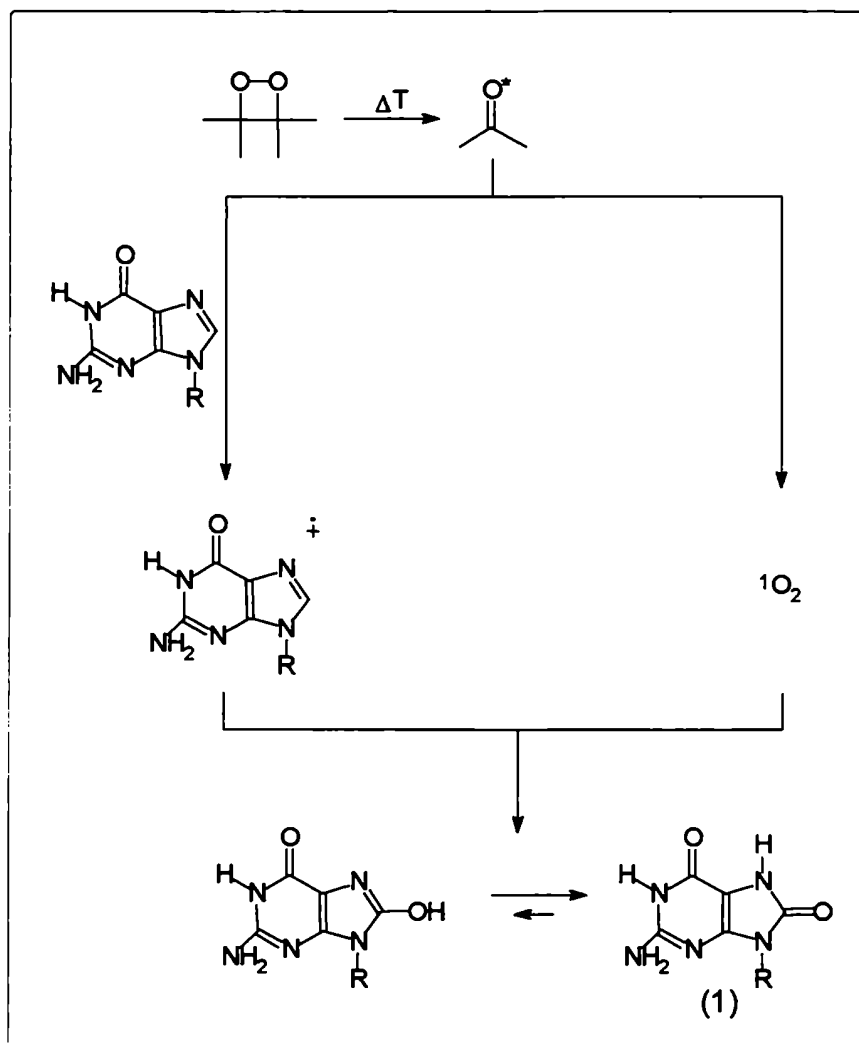
Esquema 8

En 1995 Adam y col.⁸ estudiaron la formación de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (1 en el esquema 9) a partir de ADN de timo de ternero inducida por 1,2-dioxetanos. En este caso las experiencias se realizaron en la oscuridad y a 37 °C. El curso de la reacción fue monitoreado por CLAR utilizando un detector electroquímico. En este estudio se compara la reactividad de diferentes dioxetanos y fotosensibilizadores clásicos tales como benzofenona y Rosa de Bengala. Como conclusión los autores proponen que la reacción ocurre principalmente por transferencia electrónica, aunque no descartan que pudiera ocurrir algo de fotooxidación de tipo II debido a la presencia de 9-(2-deoxi-β-D-*eritropentafuranosil*)-4,8-dihidro-4-hidroxi-8-oxoguanina (4-OH-8-oxodGuo) en la mezcla de reacción (ver esquema 10).

En 1997 los mismos autores⁹ repitieron este estudio comparativo utilizando 2'-deoxiguanosina como sustrato. En base a la distribución de productos obtenida y a los resultados de estudios cinéticos realizados utilizando H₂O y D₂O como solventes, los autores proponen que ambos mecanismos de oxidación (tipos I y II) resultan igualmente operativos al utilizar 3-(hidroximetil)-3,4,4-trimetil-1,2-dioxetano como agente oxidante.

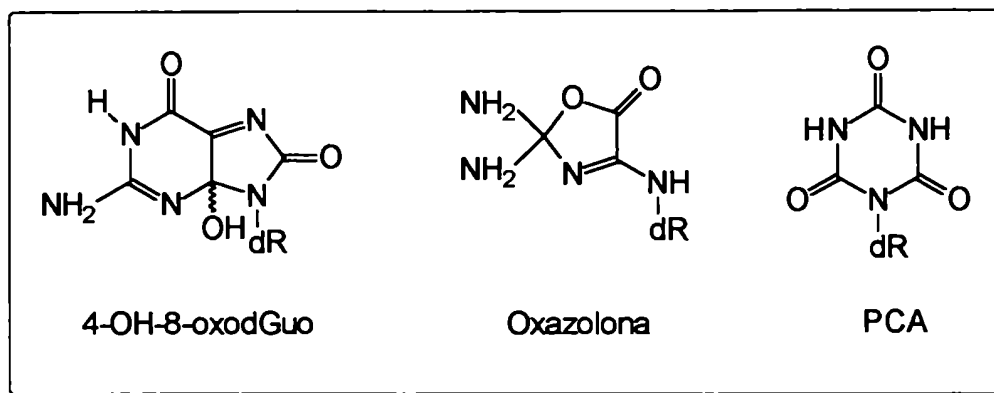
En 1996 Adam y col.¹⁰ estudiaron la fotooxidación de la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina utilizando benzofenona y Rosa de Bengala como sensibilizadores, y compararon estos resultados con los que se obtienen utilizando 3-(hidroximetil)-3,4,4-trimetil-1,2-dioxetano, que mediante una reacción térmica retro-electrocíclica genera las cetonas excitadas en estado triplete. Con los tres sensibilizadores los autores obtuvieron mezclas de dos productos principales, 4-

hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (4-OH-8-oxodGuo) y oxazolona (ver esquema 10) los que en el balance de masa dan cuenta del 70 % de la materia prima consumida. Es decir que en este caso solamente el 30 % de la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina consumida da productos desconocidos.



Esquema 9

Los autores sospechan que de estos productos desconocidos, el ácido-1-(2-deoxi- β -D-*eritro*-pentafuranosil) cianúrico (PCA) podría ser el principal. Es interesante destacar que la proporción de los dos productos principales obtenidos es independiente del sensibilizador utilizado.



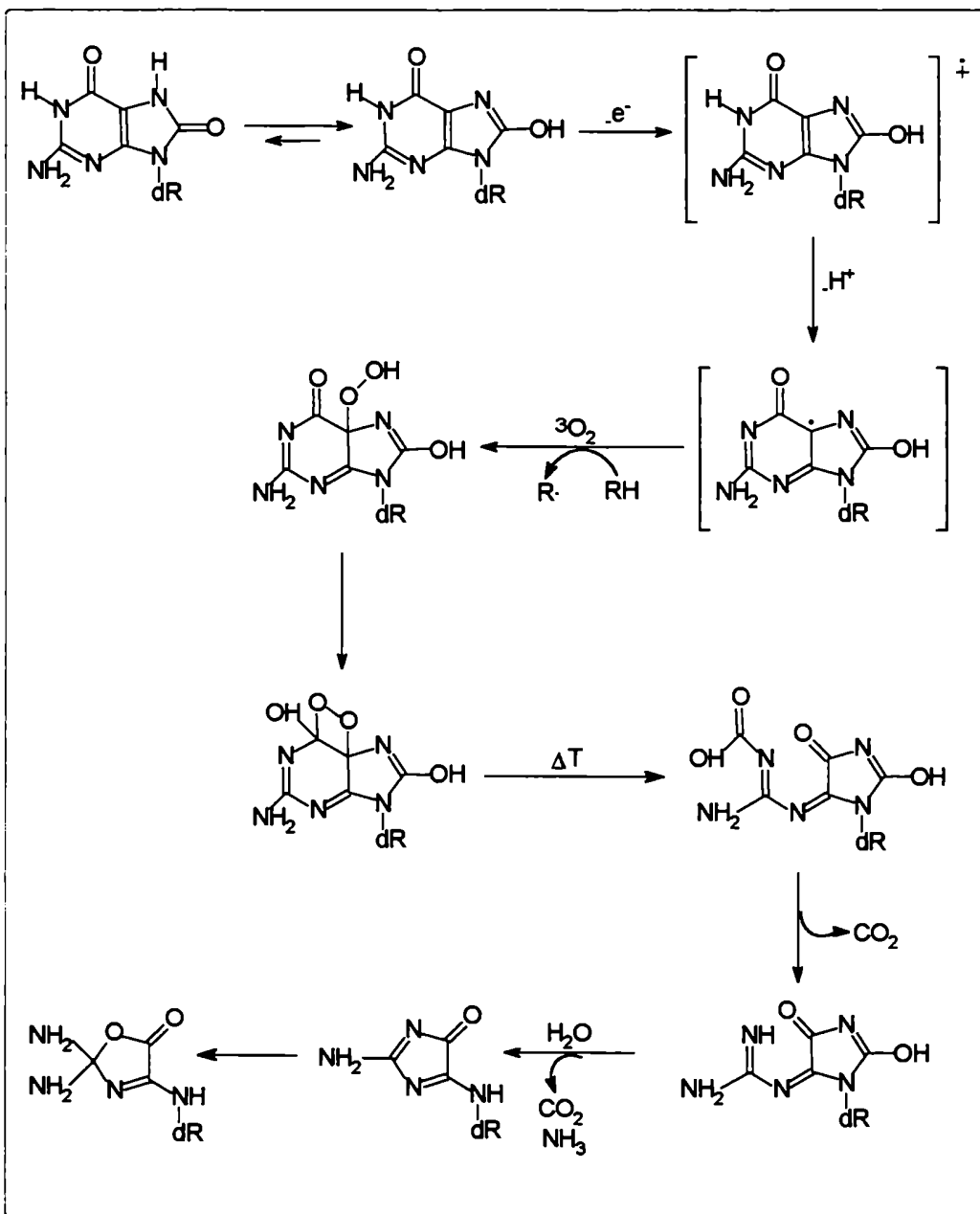
Esquema 10

Teniendo en cuenta los antecedentes que figuran en la literatura, los autores consideran que la 4-hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina es un producto típico de una fotooxidación de tipo II, mientras que la oxazolona es un lógico producto de una fotooxidación de tipo I. Sin embargo consideran a la benzofenona como un típico sensibilizador de tipo I y al Rosa de Bengala como un típico sensibilizador de tipo II. Para explicar esta aparente contradicción, los autores proponen que en los tres casos, la 4-hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina es efectivamente generada por reacción con $^1\text{O}_2$, mientras que la oxazolona es generada por un mecanismo que tiene como etapa primaria a una transferencia

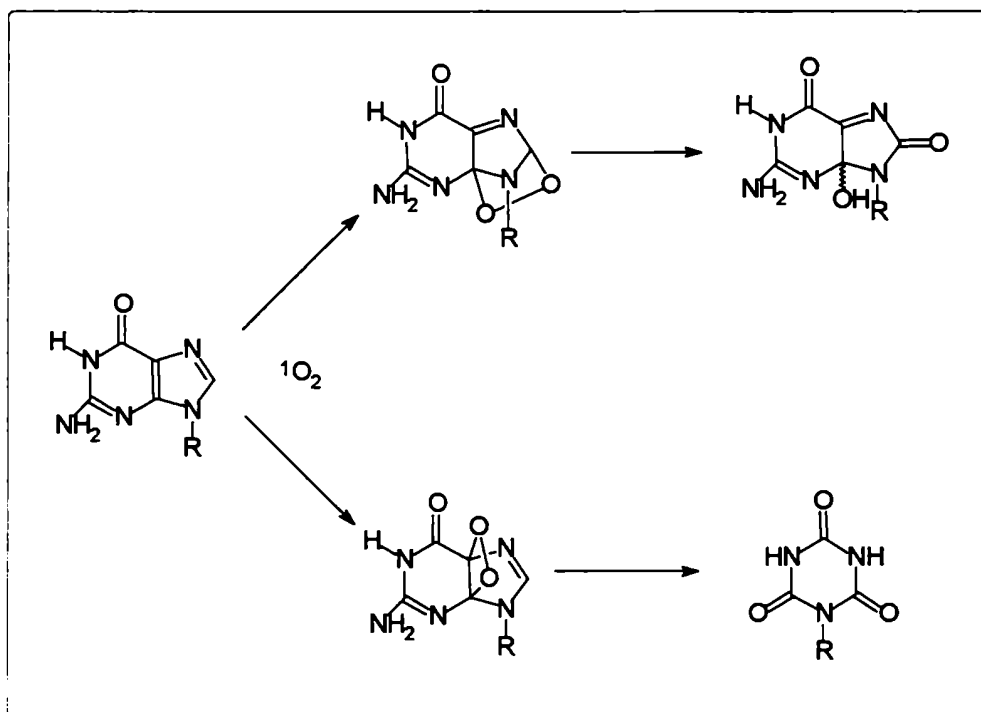
electrónica. En el caso particular del Rosa de Bengala proponen que lo que ocurre es una transferencia electrónica de la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina, a pesar de que esta reacción es claramente endergónica ($\Delta G \sim 10$ Kcal / mol). En el esquema 11 se muestra el mecanismo propuesto para la formación de la oxazolona.

En 1993 Sheu y Foote¹¹ estudiaron la fotooxidación de un derivado metilado de la guanosina. Según los autores, los antecedentes bibliográficos establecen que los dos productos principales en la fotooxidación de la 3',5'-di-O-acetil-2'-deoxiguanosina son la 4-hidroxi-3',5'-di-O-acetil-2'-deoxi-8-oxoguanosina y un derivado del ácido cianúrico, los que provendrían respectivamente de las cicloadiciones 1,4 y [2+2] del 1O_2 (ver esquema 12).

En este mismo trabajo se estudiaron las fotooxidaciones de varios derivados de la 3',5'-di-O-acetil-2'-deoxiguanosina, usando tetrafenilporfirina (TPP) como sensibilizador y trabajando a -78 °C. En estas condiciones los autores lograron detectar el endoperóxido por RMN y EM (FAB) realizados ambos a bajas temperaturas (ver esquema 13). De todos los derivados que estudiaron, el 8-metilado fue el único que generó un endoperóxido suficientemente estable como para caracterizarlo por RMN y EM (FAB) a bajas temperaturas. En estas condiciones experimentales, no fueron detectados productos de la cicloadición [2+2].

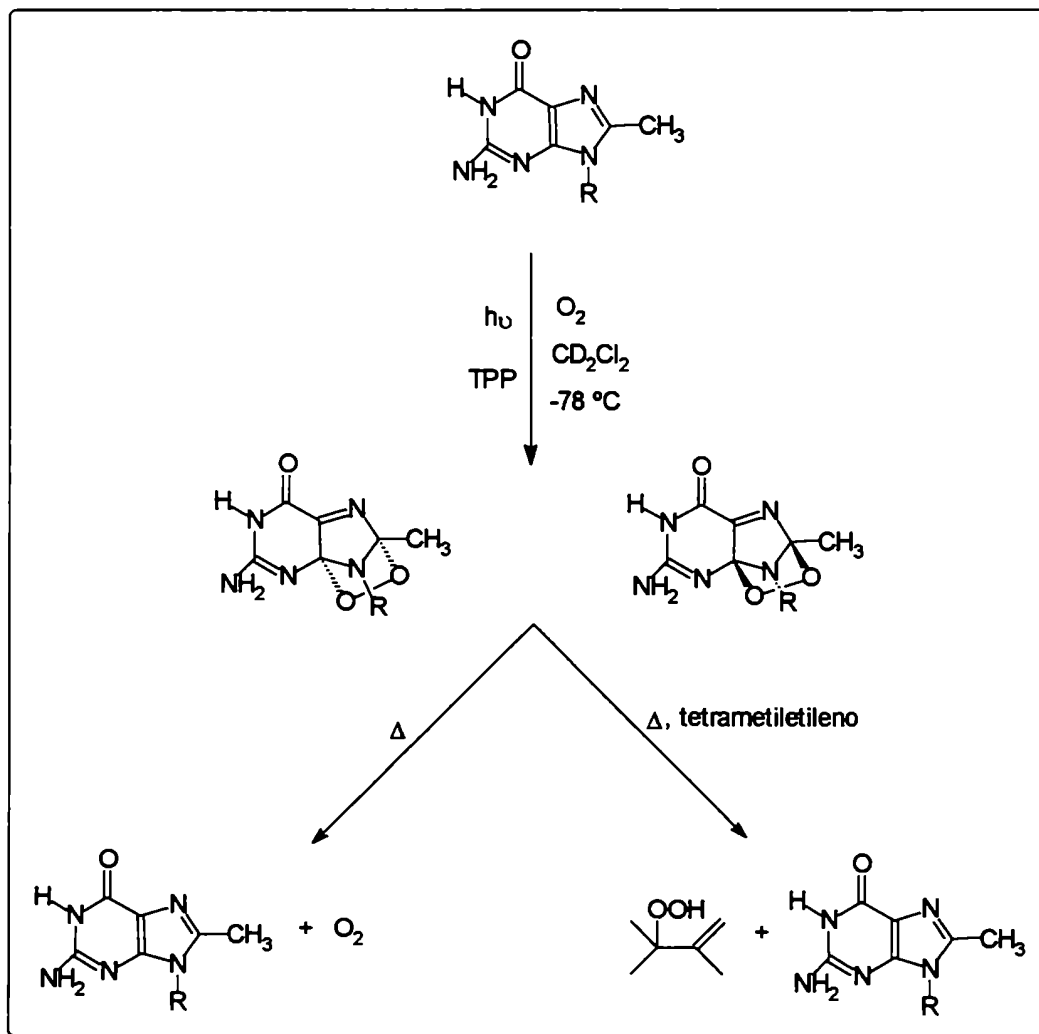


Esquema 11

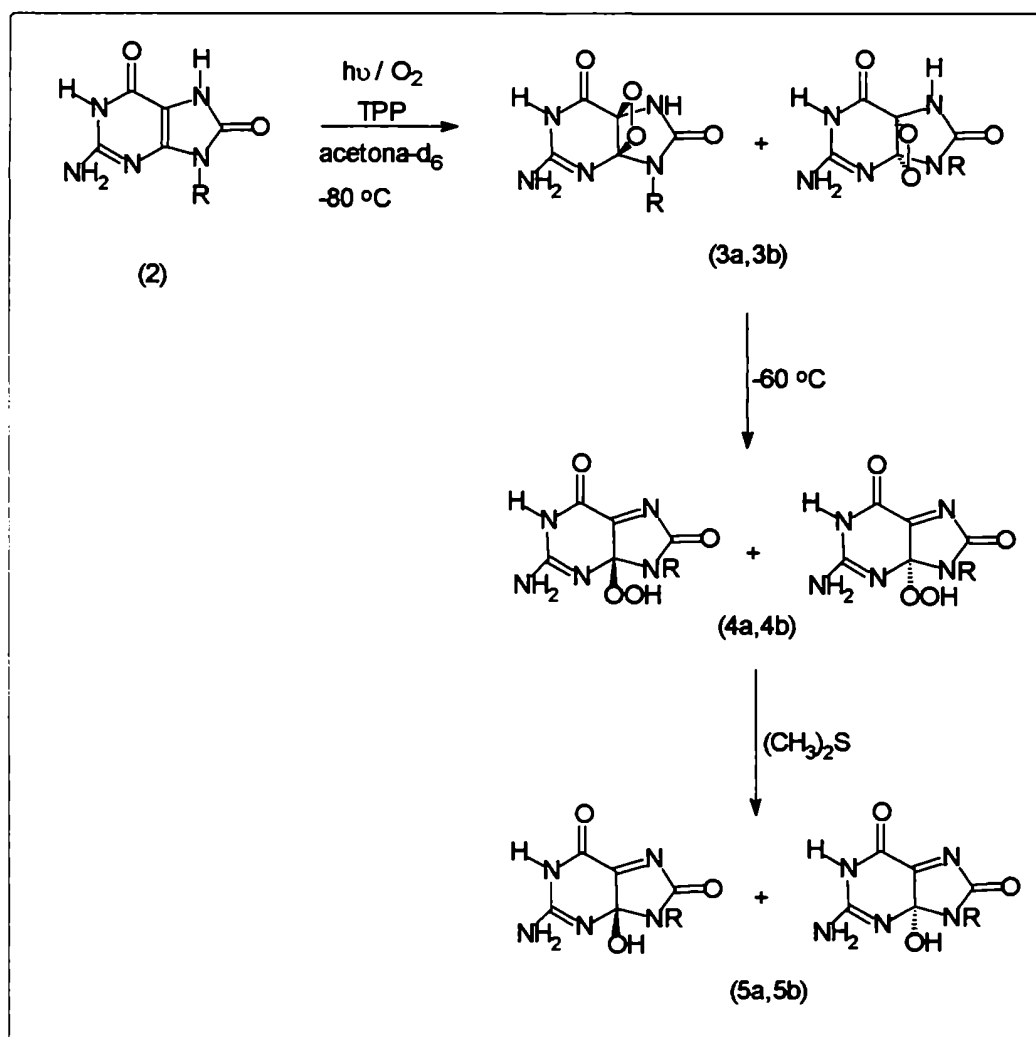


Esquema 12

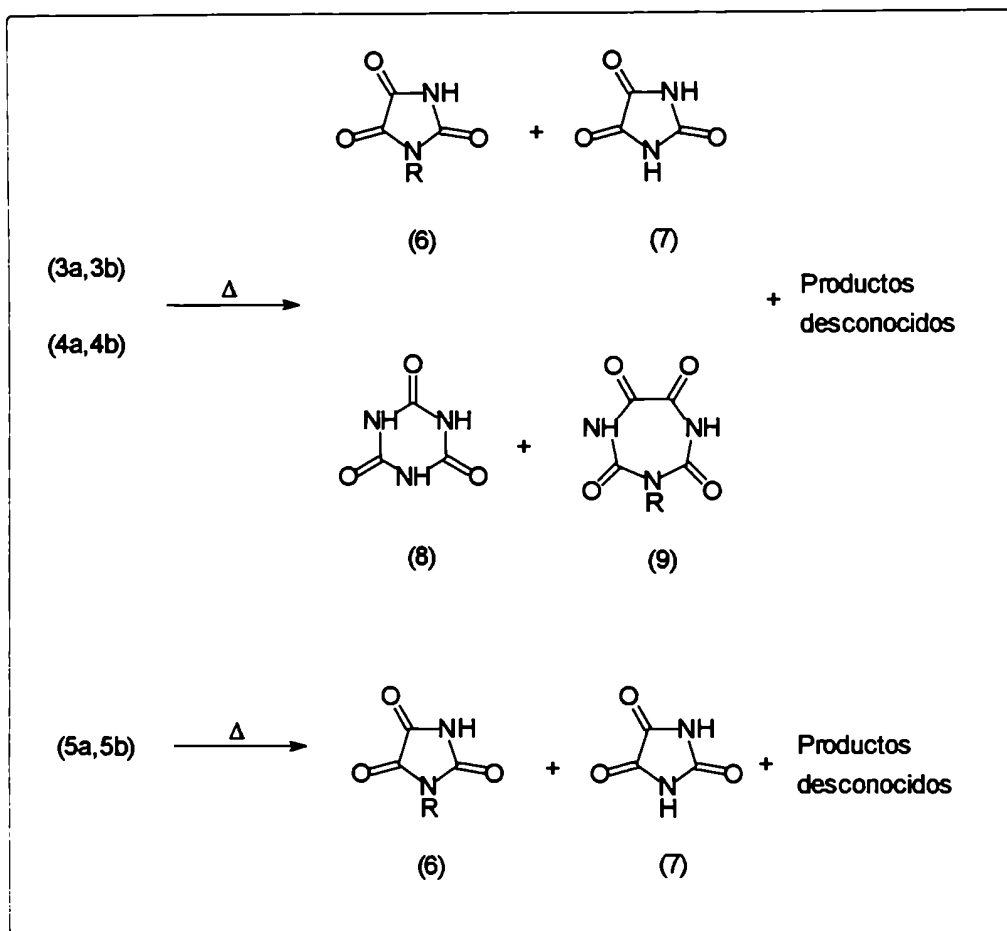
En 1995 Sheu y Foote¹² estudiaron la fotooxigenación de un derivado de la 7,8-dihidro-8-oxoguanosina. En este trabajo utilizaron Rosa de Bengala y tetrafenilporfirina como sensibilizadores y trabajando a bajas temperaturas lograron caracterizar a los endoperóxidos y a los hidroperóxidos por RMN y EM (FAB) (ver esquema 14). Los autores describen que los hidroperóxidos (4a,4b) se descomponen a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para dar una mezcla compleja, de la que por columna de sílica se logran aislar cuatro productos de degradación (ver esquema 15), los que dan cuenta de sólo el 30% del sustrato de partida consumido.



Esquema 13

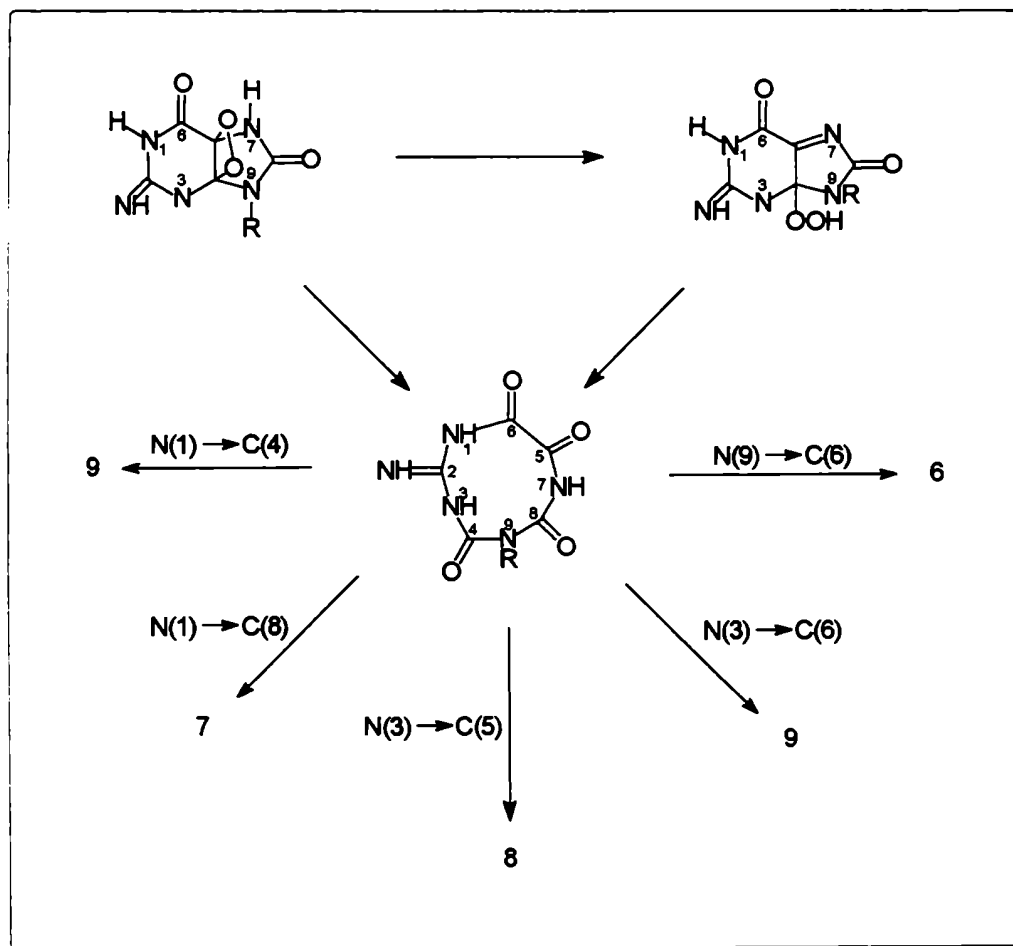


Esquema 14

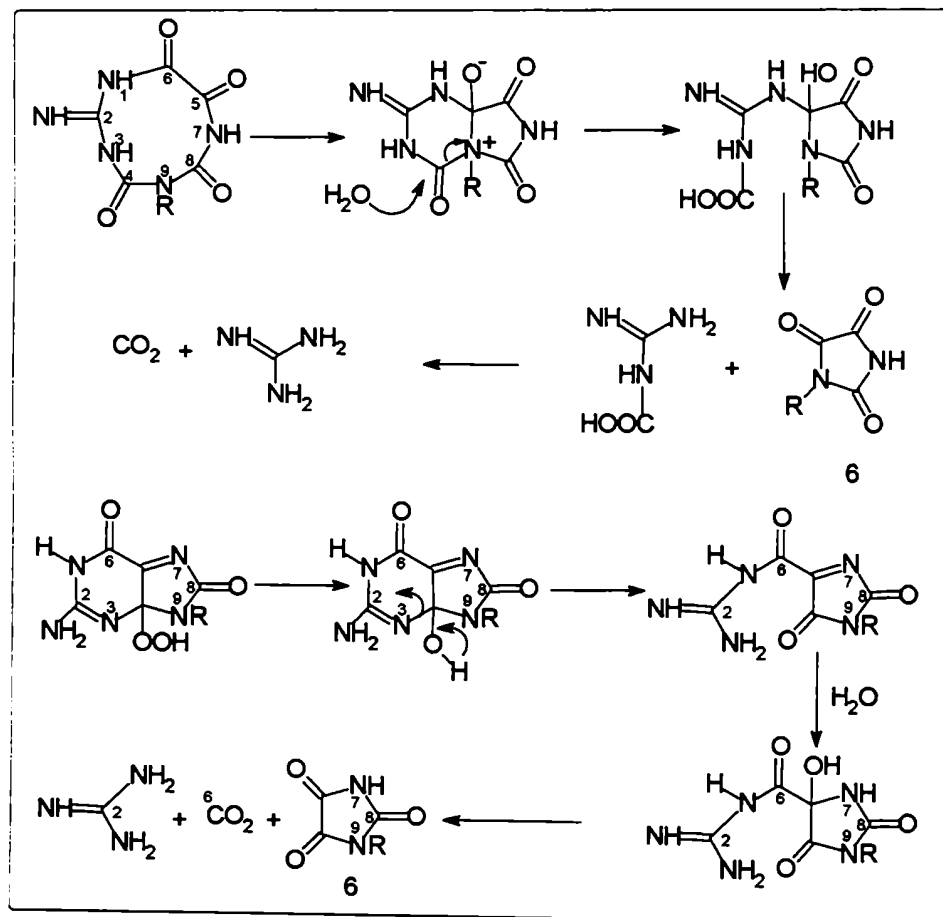


Esquema 15

Ante estas evidencias, los autores proponen el mecanismo de reacción para la formación de los productos de degradación que se muestra en el esquema 16. Además, mediante el esquema 17 muestra con más detalle el posible mecanismo de formación del producto denominado 6 en el esquema 16.



Esquema 16

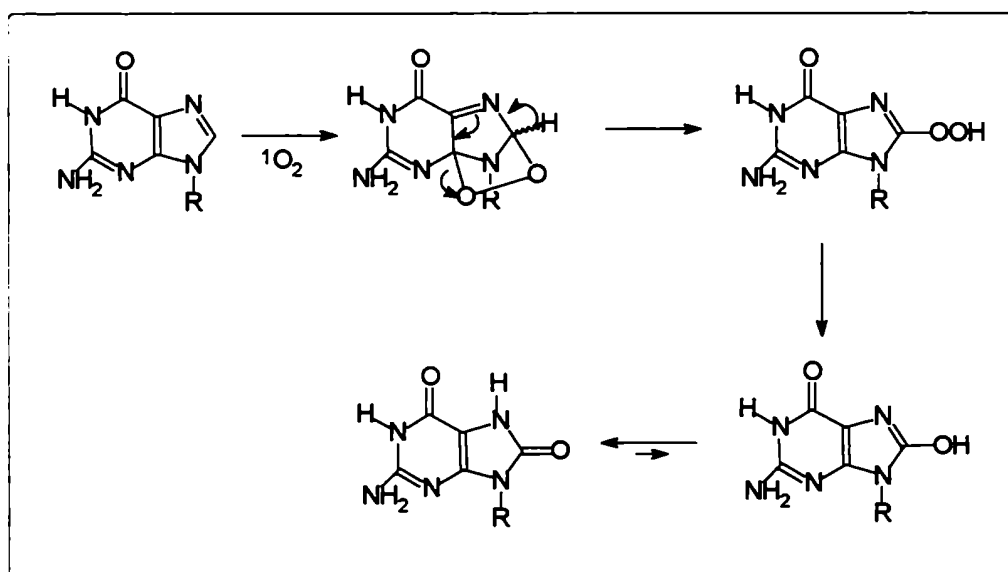


Esquema 17

En 1995 Sheu y Foote¹³ realizaron un estudio comparativo de las reactividades de la guanosina y la 8-oxoguanosina frente al ¹O₂. Para ello midieron las constantes totales de desactivación del ¹O₂ mediante la técnica de fosforescencia infrarroja resuelta en tiempo, y las constantes cinéticas de reacción por competencia de la desactivación del ¹O₂ con tetrametilileno (TME) y 2-metil-2-penteno (2M2P). En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos por estos autores:

Sustrato	(K_r+K_q) $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	K_r $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$K_r/(K_r+K_q) \times 10^0$	$E_{p/2}$ (V vs Ag/Ag ⁺)
Guanosina	$6,33 \times 10^6$	$1,36 \times 10^5$	2,1	1,28
8-Oxoguanosina	$5,54 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$	35	0,85
TME	$3,00 \times 10^7$	---	---	---
2M2P	$7,59 \times 10^5$	---	---	---

Finalmente, en este trabajo también se propone un mecanismo para la formación de la 8-oxoguanosina (ver esquema 18), el que está avalado por reacciones hechas con agentes miméticos del $^1\text{O}_2$. El conjunto de resultados obtenidos por estos autores constituyen fuertes argumentos en contra tanto del mecanismo propuesto por Devasagan¹⁴ como de la transferencia electrónica al $^1\text{O}_2$ propuesta por Boiteux y col.¹⁵



Esquema 18

4.2 Resultados y Discusión.

4.2.1 Fotooxidaciones de tipo II. Evidencias mecanísticas.

Cuando se irradia una solución etanólica de alguno de los derivados purínicos estudiados (cafeína, CF; teofilina, TF; teobromina, TB; y ácido trimetil úrico, TMU) en presencia de Rosa de Bengala (RB), en condiciones donde sólo absorbe el RB ($\lambda > 500$ nm), se observa el consumo de estas oxopurinas, ya sea que se monitoree la reacción por cromatografía gaseosa como por espectrofotometría UV-visible. En todos los casos, las gráficas de las concentraciones de las oxopurinas en función del tiempo de irradiación dan decaimientos monoexponenciales. En la figura 1 se ejemplifica este tipo de comportamiento para el caso de la teofilina cuando la reacción se monitorea por espectrofotometría.

Si bien las medidas de absorbancia, como se muestra en la figura 1, parecen adecuadas para describir en forma cualitativa el consumo de las oxopurinas, la realización de estudios cinéticos requiere en primer lugar asegurarse que la técnica tiene valor cuantitativo. Dado que no es posible descartar *a priori* la posibilidad de que uno o más productos de la reacción absorban radiación en la misma zona del espectro electromagnético que la materia prima, se decidió seguir en forma paralela el consumo de las oxopurinas utilizando las técnicas de espectrofotometría UV-visible y cromatografía gaseosa (CG) con agregado de una referencia interna. En ambos casos se construyeron curvas de calibración con soluciones de concentraciones conocidas de los sustratos. En la figura 2 se muestran a modo de

ejemplo los monitoreos paralelos por ambas técnicas para la irradiación de una solución etanólica de cafeína.

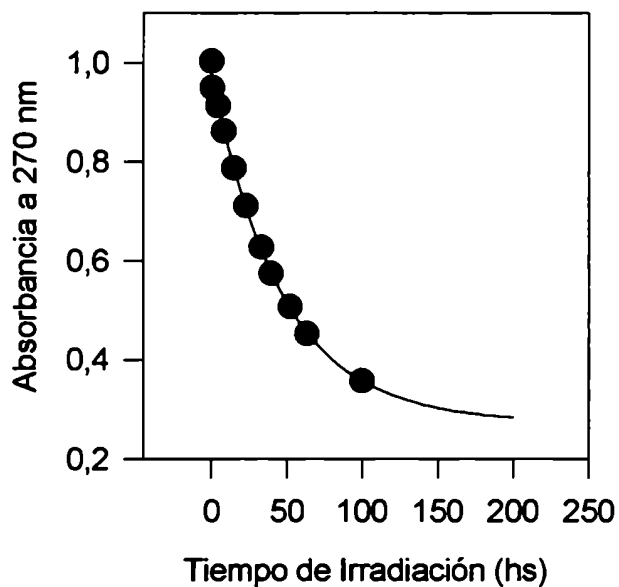


Figura 1. Absorbancia de teofilina a 270 nm en función del tiempo de irradiación. Sensibilizador: Rosa de Bengala. Solvente: Etanol.

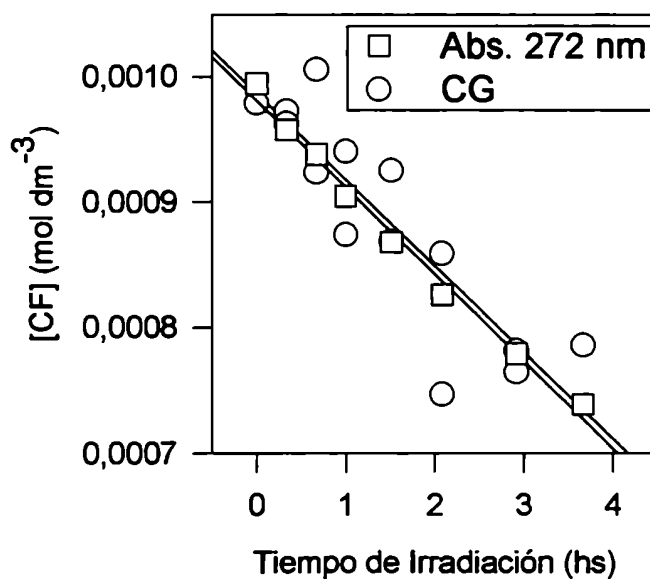


Figura 2. Irradiación de una solución etanólica de cafeína. Monitoreo de la reacción por espectrofotometría a 272 nm y por cromatografía gaseosa.

Como puede verse en la figura 2 los monitoreos de la reacción por CG y por espectrofotometría UV-visible muestran idénticos resultados, razón por la cual se decidió utilizar a la espectrofotometría como técnica de análisis para estudios cinéticos, por ser ésta más simple, rápida y precisa. Similares resultados se obtuvieron para el resto de los sustratos estudiados.

El consumo de las oxopurinas sólo se detecta cuando las soluciones son irradiadas. Cuando las soluciones conteniendo a las oxopurinas y al fotosensibilizador se conservan en la oscuridad no se detecta consumo de la materia prima aún después de transcurridos varios meses. Por otra parte, cuando las soluciones son irradiadas bajo atmósfera inerte (N_2 o Ar) el consumo de las oxopurinas resulta nulo o mucho menor que cuando las irradiaciones se realizan bajo atmósfera de aire.

Como puede verse en la figura 3, cuando se utiliza agua como solvente, la reacción es inhibida totalmente al pasar de atmósfera de aire a atmósfera de nitrógeno. Cuando se utiliza un solvente orgánico como por ejemplo etanol (figura 4), bajo atmósfera de nitrógeno la velocidad de la reacción disminuye notablemente, pero sigue observándose consumo de la materia prima. Esta diferencia puede atribuirse al hecho de que la solubilidad del oxígeno en solventes orgánicos es un orden de magnitud superior a su valor en agua,¹⁶ por lo tanto la eliminación del mismo del medio de reacción por burbujeo de nitrógeno resulta mucho menos eficiente en dichos solventes.

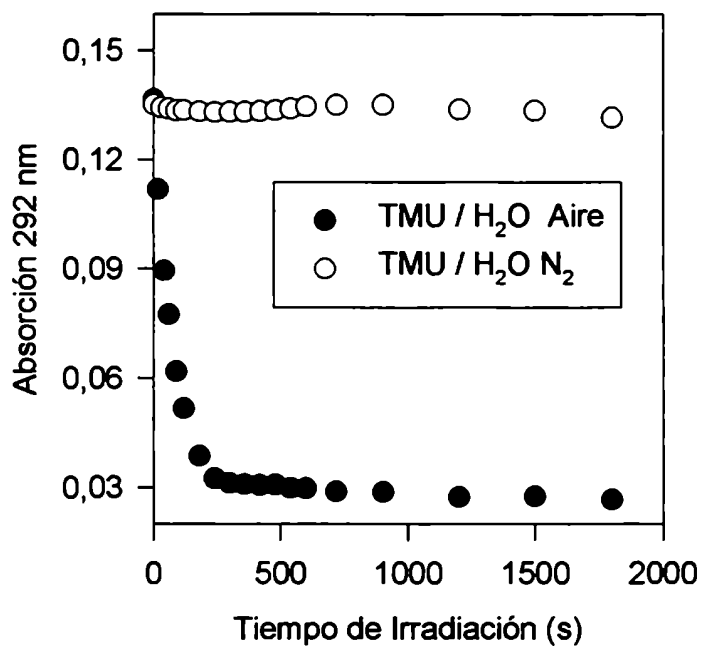


Figura 3. Consumo de ácido trimetilúrico en función del tiempo de irradiación para reacciones realizadas bajo atmósferas diferentes (N₂ y aire). Solvente: H₂O.

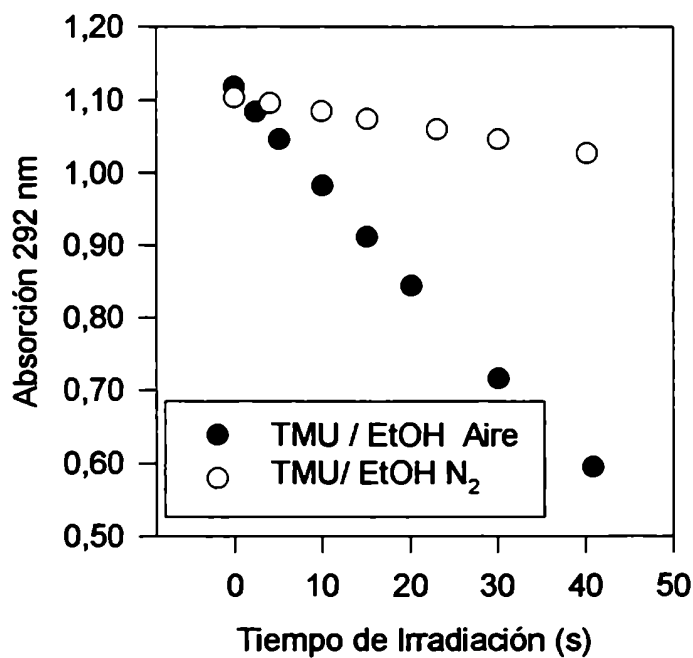


Figura 4. Consumo de ácido trimetilúrico en función del tiempo de irradiación para reacciones realizadas bajo atmósferas diferentes (N₂ y aire). Solvente: EtOH.

Este efecto, ejemplificado con las figuras 3 y 4 para el caso del ácido trimetilúrico, también se observó para el resto de los sustratos estudiados.

Como se mencionó en la introducción del capítulo 3, las reacciones de fotooxidación pueden clasificarse en reacciones de tipo I y reacciones de tipo II. En el primer caso, el proceso primario consiste o bien en una transferencia electrónica o bien en una abstracción de hidrógeno entre el fotosensibilizador (en nuestro caso el Rosa de Bengala) y el sustrato (en nuestro caso las oxopurinas). Por otro lado, las fotooxidaciones de tipo II tienen como proceso primario a la interacción entre el fotosensibilizador y el oxígeno. Esta interacción puede resultar tanto en la transferencia de un electrón como en la transferencia de energía del sensibilizador al oxígeno para generar el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y oxígeno molecular excitado singulete (1O_2) respectivamente. Estas formas altamente reactivas del oxígeno son las responsables de la posterior oxidación del sustrato.

El hecho de que no se produzca consumo de las oxopurinas al ser irradiadas en atmósfera de nitrógeno, y que además no se detecte el fotoblanqueo del Rosa de Bengala constituyen fuertes evidencias, aunque no concluyentes, de que en este caso el mecanismo involucrado sería de tipo II.

Con el objeto de obtener evidencias más concluyentes de que es posible descartar un mecanismo de tipo I, se decidió realizar estudios de láser flash fotólisis para los sistemas oxopurina-Rosa de Bengala en etanol. En la figura 5 se muestra el espectro de absorción del Rosa de Bengala obtenido por esta técnica por extrapolación a tiempo cero respecto del disparo del láser, bajo atmósfera de nitrógeno.

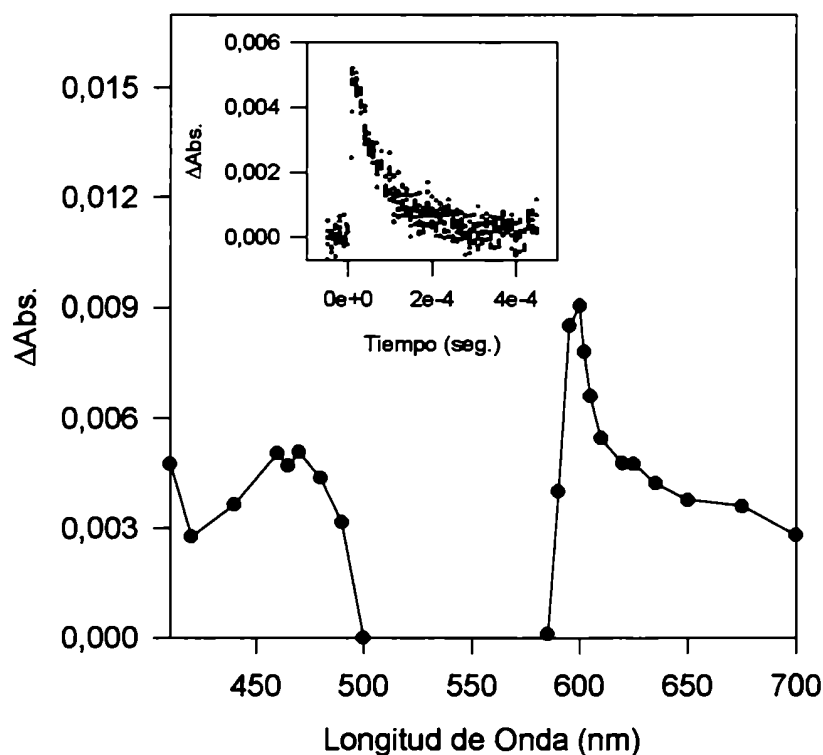


Figura 5. Espectro de absorción de una solución de Rosa de Bengala en EtOH obtenido por láser flash fotólisis por extrapolación a tiempo cero luego del pulso láser. Inserto: decaimiento registrado a 610 nm.

Los máximos del espectro que se muestra en la figura 5 coinciden con los descriptos en la literatura¹⁷⁻²⁰ para la absorción del estado excitado triplete del Rosa de Bengala. Cuando a las soluciones de Rosa de Bengala se les agrega cantidades variables de las diferentes oxopurinas, se observa una disminución del tiempo de vida del triplete del Rosa de Bengala, sin que se detecte la aparición de nuevas bandas, ni tampoco una disminución de las absorbancias iniciales obtenidas por extrapolación a tiempo cero. Estos resultados indican que las oxopurinas desactivan al estado triplete del Rosa de Bengala, siendo este un proceso de tipo dinámico. Si

el proceso de desactivación fuera estático debería observarse una disminución de las absorbancias iniciales. Este resultado coincide con el hecho de que no se detectó ningún cambio en los espectros de absorción y emisión del Rosa de Bengala medidos en estado estacionario a medida que se agregan cantidades variables de las diferentes oxopurinas. Esto permite, en principio, descartar interacciones de las oxopurinas con el Rosa de Bengala en su estado fundamental y en su estado excitado singulete.

Ajustando los decaimientos del triplete del Rosa de Bengala con monoexponenciales (ver inserto en figura 5) para diferentes concentraciones de las oxopurinas, y aplicando una ecuación de tipo Stern Volmer:

$$1/\tau_T = 1/\tau_T^0 + {}^T K_q [XH] \quad (1)$$

donde τ_T es el tiempo de vida del estado triplete en presencia de las oxopurinas, τ_T^0 representa ese mismo tiempo pero en ausencia de desactivantes y $[XH]$ es la concentración de las oxopurinas, se obtuvieron constantes de desactivación (${}^T K_q$) de $2,65 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ para el ácido trimetilúrico y de aproximadamente $9,9 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ para las xantinas (tabla 1). Teniendo en cuenta que la concentración de oxígeno en una solución de etanol en atmósfera de aire y a $25 \text{ }^\circ\text{C}^{16}$ es $2,65 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ y que su constante de desactivación del estado triplete del Rosa de Bengala²⁰ es $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, resulta claro que en atmósfera de aire la desactivación del triplete del Rosa de Bengala por parte de las oxopurinas es un proceso absolutamente minoritario y despreciable.

Este proceso de desactivación del estado triplete del Rosa de Bengala no podría ocurrir mediante transferencia de energía triplete-triplete, ya que como se observa en la tabla 1 los estados triplete de las xantinas son mucho más energéticos que el del Rosa de Bengala. En la misma tabla se muestran los potenciales de oxidación estimados por voltametría cíclica (ver capítulo 3), y el valor del ΔG^0 para los procesos de transferencia electrónica desde las xantinas al RB excitado y al oxígeno singulete, estimados a partir de la ecuación de Rehm Weller.²¹ Como puede apreciarse ambos procesos resultan claramente endergónicos.

Tabla 1. Constantes de desactivación del triplete del Rosa de Bengala (1K_q) y valores calculados de ΔG^0 para la transferencia de un electrón de las oxopurinas al Rosa de Bengala y al oxígeno singulete.

Sustrato	1K_q mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	E_p (Volts) (vs. Ag/Ag ⁺)	aE_T (KJ / mol)	ΔG^0 (XH→RB) (KJ / mol)	ΔG^0 (XH→ ¹ O ₂) (KJ / mol)
TMU	2,65x10 ⁷	---	---	---	---
CF	9,9x10 ⁵	^b 1,32	^b 302,08	88,62	118,16
TF	9,9x10 ⁵	^b 1,24	^b 305,18	80,88	110,50
TB	9,9x10 ⁵	^b 1,34	^b 305,18	90,54	120,08
RB	---	^c -1,33	^c 167,07	---	---
O ₂	2x10 ⁹	^d -0,88	^e 94,10	---	---

^a En el caso del O₂ E_T se refiere a la energía del estado excitado ¹Δ_g. En el resto de los casos se refiere al estado triplete de más baja energía.

^b Ver capítulo 3. ^c Referencia 22. ^d Referencia 23. ^e Referencia 24.

Los resultados hasta aquí descriptos permiten descartar que el proceso primario de la degradación de las oxopurinas sea una fotooxidación de tipo I, por el contrario, todas las evidencias señalan como más probable a un proceso de tipo II. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un proceso de tipo II puede implicar como proceso primario tanto una transferencia electrónica como transferencia de energía por parte del fotosensibilizador al oxígeno.

Si bien el Rosa de Bengala es un fotosensibilizador conocido desde hace muchos años, y ha sido objeto de numerosas investigaciones acerca de su fotoquímica y fotofísica,^{17-20,22,25-30} existen muchas discrepancias en la literatura moderna sobre su capacidad de generación de anión superóxido, aunque si está bien establecida su alta capacidad de generación de oxígeno singulete. Estas discrepancias surgen fundamentalmente como consecuencia de los métodos químicos no específicos utilizados para evaluar la generación de esta especie.²⁰ Recién en 1996 Lambert y Kochevar²⁰ demostraron en un trabajo muy detallado, que el Rosa de Bengala no genera anión superóxido en cantidades detectables y que los anteriores reportes de generación de esta especie se debían en realidad a *artifacts* propios de los métodos utilizados.

Estos resultados publicados por Lambert y Kochevar,²⁰ junto con nuestros propios resultados anteriormente descriptos, reducen el universo de posibilidades mecánicas para nuestras reacciones a un proceso de fotooxidación de tipo II *via* generación de oxígeno singulete.

Como es sabido el tiempo de vida del oxígeno singulete es considerablemente mayor en solventes deuterados³¹ debido a que en este tipo de

medios su acoplamiento vibracional con el solvente es menor, y por lo tanto la desactivación de esta especie por transferencia de la energía electrónica al solvente como energía vibracional resulta menos eficiente.³² Por lo tanto, si el oxígeno singlete estuviera involucrado en la reacción, debería observarse un incremento de la velocidad de consumo de las oxopurinas al pasar de H₂O a D₂O. En la figura 6 se muestra el efecto isotópico del solvente observado para la teobromina y el ácido trimetilúrico (la cafeína y la teofilina mostraron un comportamiento similar al de la teobromina). La tabla 2 muestra los cocientes de las velocidades de consumo de las oxopurinas en H₂O y en D₂O.

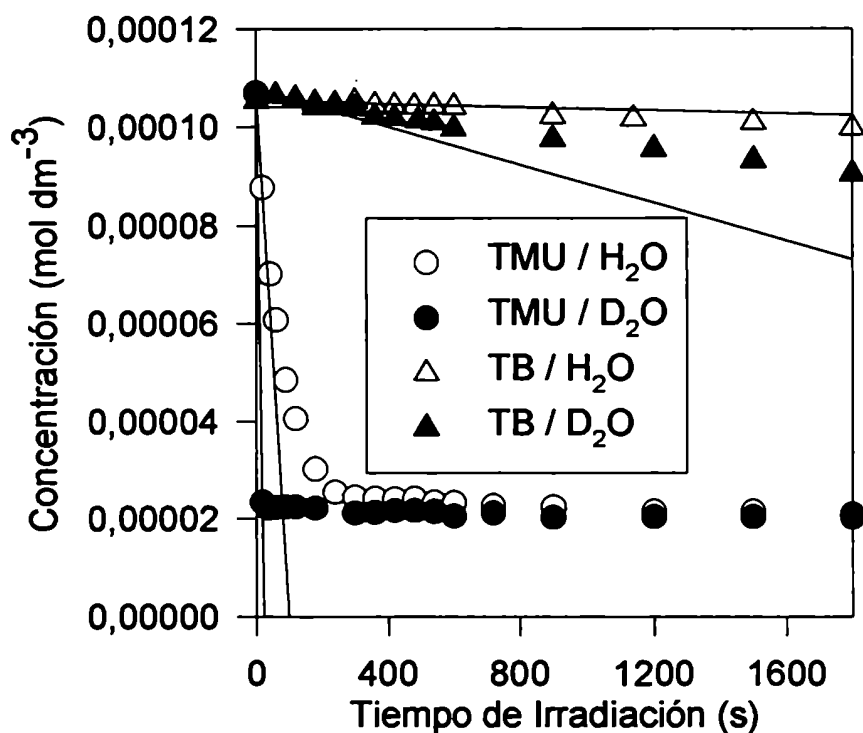


Figura 6. Efecto isotópico del solvente sobre las velocidades de consumo de teobromina (TB) y ácido trimetilúrico (TMU) en reacciones fotosensibilizadas por Rosa de Bengala. Los símbolos representan los valores de concentración medidos espectrofotométricamente. Las líneas representan las velocidades iniciales.

Tabla 2. Reacciones de oxopurinas fotosensibilizadas por Rosa de Bengala. Cocientes de velocidades de consumo de las oxopurinas en D₂O y en H₂O. Las velocidades fueron determinadas por el método de las pendientes iniciales.

Sustrato	$r_{ox}^{(D_2O)} / r_{ox}^{(H_2O)}$
CF	10
TF	11
TB	11
TMU	4,3

Como puede apreciarse en la figura 6 y en la tabla 2, la velocidad de consumo de todas las oxopurinas estudiadas resultó ser mayor en D₂O que en H₂O. Este efecto resulta mayor para las xantinas (CF, TF y TB) que para el ácido trimetilúrico. Esto es consistente con nuestra observación experimental de que este último es mucho más reactivo que las xantinas. Finalmente, el efecto isotópico cinético observado, junto con los resultados descriptos anteriormente, constituyen fuertes evidencias de que las oxopurinas se oxidan por un mecanismo de tipo II que involucra al oxígeno singlete como agente oxidante.

4.2.2 Mecanismo de reacción y determinación de constantes cinéticas.

Teniendo en cuenta las evidencias experimentales mencionadas en la sección 4.2.1, se decidió observar en forma directa la desactivación del oxígeno singlete por parte de las oxopurinas, midiendo para ello la fosforescencia infrarroja resuelta

en el tiempo del oxígeno singlete ($\lambda_{em} = 1270$ nm), utilizando un láser pulsado como fuente de excitación. Sin embargo, debido a que el tiempo de vida del oxígeno singlete en etanol es muy bajo ($13 \mu s$) como para ser observado con el detector de germanio disponible (ver parte experimental) se decidió utilizar acetonitrilo como solvente, ya que en este medio el tiempo de vida de esta especie es cinco veces mayor.³¹ Se midieron entonces los decaimientos temporales de la fosforescencia del oxígeno singlete en función de las concentración de las diferentes oxopurinas, obteniéndose en todos los casos decaimientos monoexponenciales.

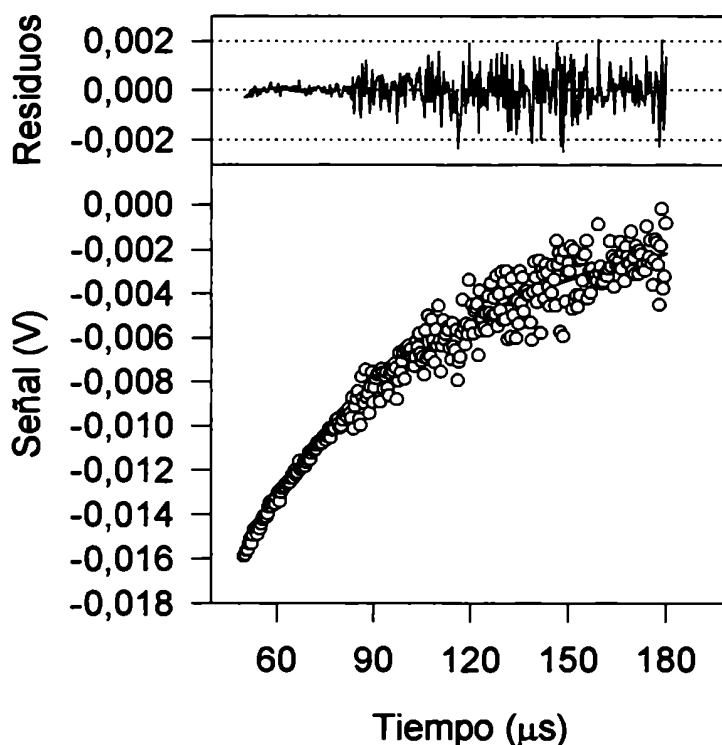


Figura 7. Decaimiento de la fosforescencia del 1O_2 (1270 nm) y su ajuste con una función monoexponencial, para una solución de Rosa de Bengala en CH_3CN conteniendo 9×10^{-4} mol dm^{-3} de cafeína.

Los tiempos de vida del oxígeno singlete así obtenidos fueron tratados mediante una ecuación de tipo Stern-Volmer:

$$1/\tau_{\Delta} = 1/\tau_{\Delta}^0 + K_q [\text{XH}] \quad (2)$$

donde τ_{Δ} es el tiempo de vida del oxígeno singlete en presencia de las oxopurinas y τ_{Δ}^0 representa a este mismo parámetro pero en ausencia de desactivantes. En la figura 8 se muestran los resultados experimentales obtenidos para las cuatro oxopurinas, y su ajuste con la ecuación 2.

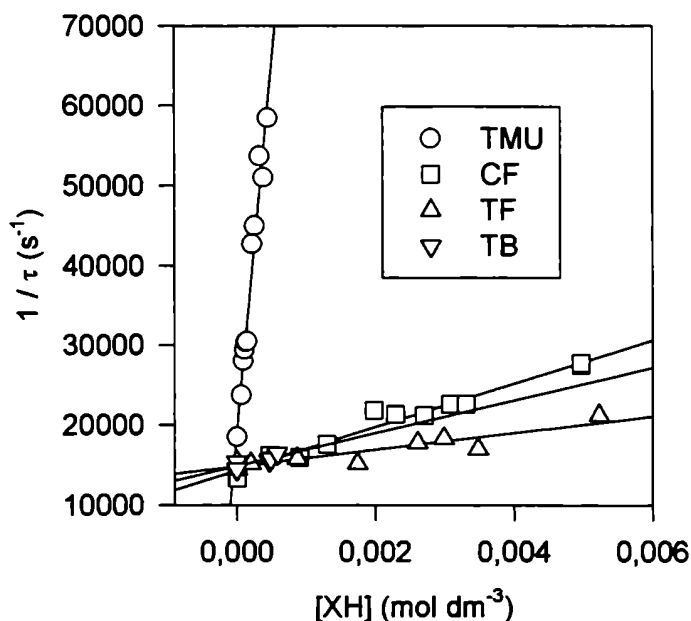


Figura 8. Inversa de los tiempos de vida del $^1\text{O}_2$ medidos para distintas concentraciones de las oxopurinas por la técnica de fosforescencia infrarroja resuelta en tiempo, en función de dichas concentraciones. Solvente: CH_3CN . Los símbolos corresponden a los valores experimentales de $1/\tau$, las rectas son el resultado de ajustar dichos valores con una ecuación de tipo Stern-Volmer.

En la tabla 3 se muestran las constantes de desactivación (K_q) de las diferentes oxopurinas obtenidas por este método. Estas constantes corresponden a la desactivación total del oxígeno singulete, e incluyen tanto a la desactivación química o reactiva como a la desactivación física.

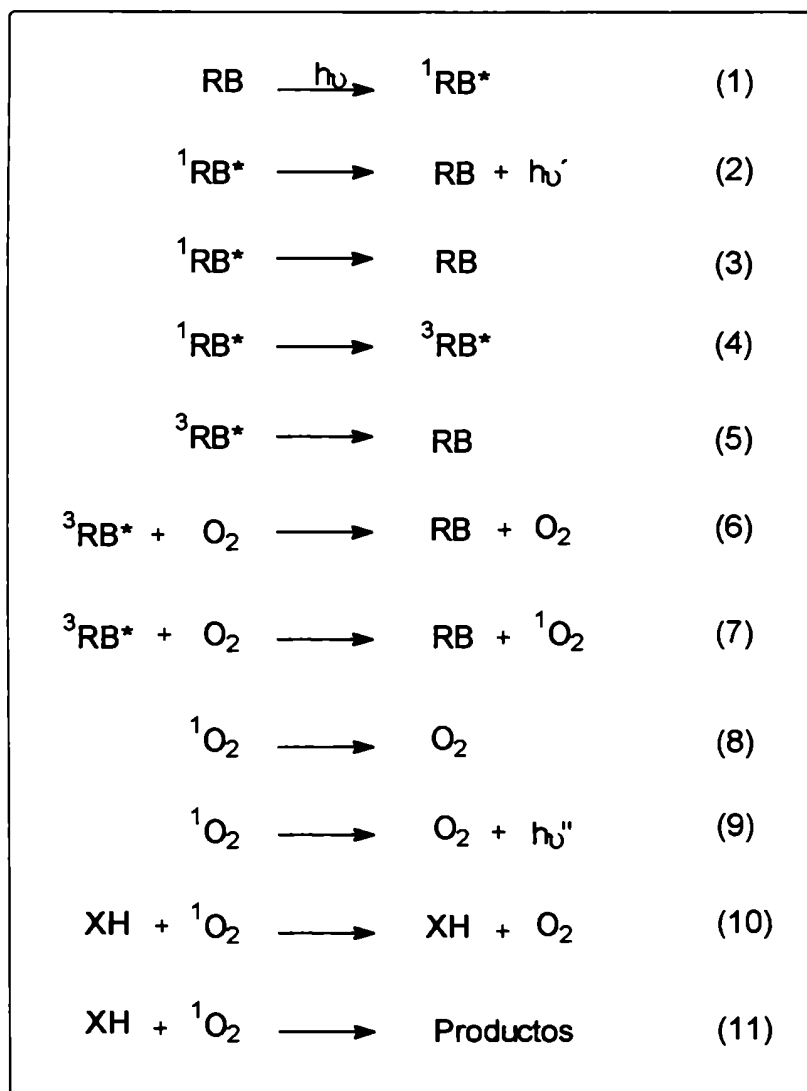
Tabla 3. Constantes de desactivación totales (K_q) medidas en CH_3CN y en EtOH y constantes de reacción (K_r) medidas en EtOH . Las medidas en CH_3CN fueron realizadas por fosforescencia de $^1\text{O}_2$ resuelta en tiempo. Las medidas en EtOH se realizaron por actinometría en estado estacionario.

Sustrato	$K_q (\text{CH}_3\text{CN})$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$K_q (\text{EtOH})$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$K_r (\text{EtOH})$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
CF	$2,7 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
TF	$1,05 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^3$
TB	$2,05 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$
TMU	$9,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$

Los voltajes iniciales obtenidos por extrapolación a tiempo cero de los decaimientos de la fosforescencia del oxígeno singulete, resultaron independientes de las concentraciones de las diferentes oxopurinas, dentro del error experimental debido a las fluctuaciones en la energía del láser y la inestabilidad del detector. Este resultado indica que dicha desactivación es un proceso exclusivamente dinámico, es decir, que las oxopurinas no interactúan con el sensibilizador (Rosa de Bengala) en su estado fundamental para formar algún tipo de complejo que inhiba la formación

del oxígeno singlete, ni tampoco desactivan al estado excitado triplete del sensibilizador. Las posibilidades de interacción de las oxopurinas con el estado excitado singlete del sensibilizador quedan descartadas debido al corto tiempo de vida de este estado ($\tau_f^{\text{MeOH}} = 543 \text{ ps}$).²⁵

Estos resultados están totalmente de acuerdo con las experiencias de espectroscopía de absorción convencional, espectroscopía de emisión de fluorescencia, espectroscopía de absorción triplete-triplete (láser flash fotólisis) y también con las evidencias cinéticas y termodinámicas descritas en la sección 4.2.1. En base a todos estos resultados, se propone el siguiente esquema de reacción:



Esquema 19

En base a este esquema de reacción se puede deducir que el rendimiento cuántico de consumo de las oxopurinas (Φ_{ox}) seguiría la siguiente expresión:

$$\Phi_{\text{ox}} = \Phi_{\Delta} K_r [\text{XH}] / (K_d + K_q [\text{XH}]) \quad (3)$$

donde Φ_{Δ} representa el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete y K_d es su constante de decaimiento en ausencia de desactivantes.

Si el mecanismo de reacción propuesto fuera correcto, los valores experimentales de Φ_{ox} en función de las concentraciones de las oxopurinas, deberían poder ajustarse en forma no lineal con la ecuación 3. Este ajuste, además de confirmar la bondad del mecanismo propuesto, permitiría obtener el valor de la constante K_r dado el valor de K_q y viceversa. Por otra parte, este tipo de tratamiento permite obtener a ambas constante K_r y K_q en forma simultánea si el ajuste matemático iterativo se comienza con valores de K_r y de K_q muy cercanos a los reales.

Con el objeto de realizar este tipo de estudio, se midieron las velocidades iniciales de consumo de las cuatro xantinas en función de sus concentraciones en etanol, por espectrofotometría UV-visible. En las figuras 9 y 10 se muestran a modo de ejemplo los consumos de cafeína y de ácido trimetilúrico respectivamente en función de los tiempos de irradiación para distintas concentraciones iniciales de sustrato. En los casos de la teofilina y la teobromina se obtienen resultados análogos a los de la cafeína.

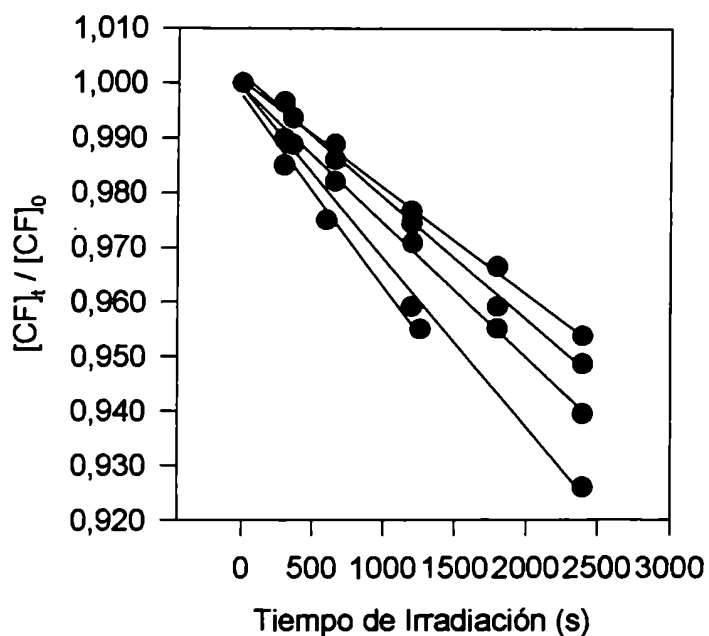


Figura 9. Concentración de cafeína normalizada por su concentración inicial en función del tiempo de irradiación. Solvente: EtOH.

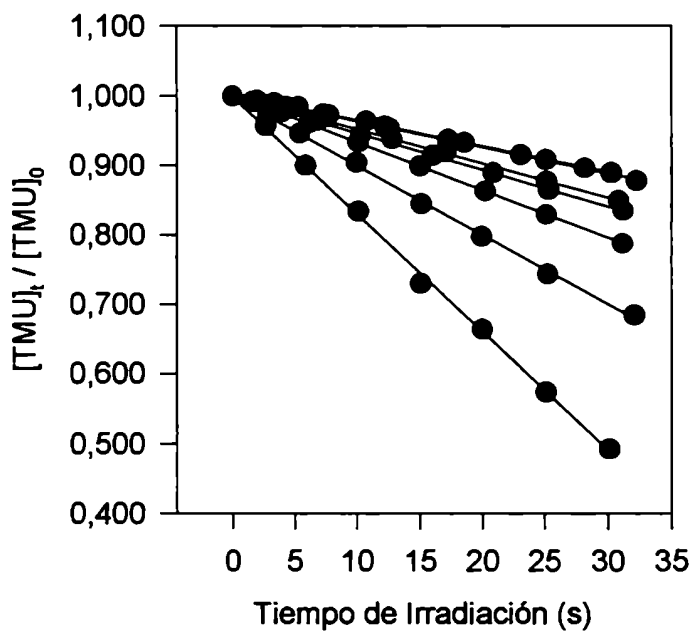


Figura 10. Concentración de ácido trimetilúrico normalizada por su concentración inicial en función del tiempo de irradiación. Solvente: EtOH.

Para cada una de las determinaciones cinéticas antes mencionadas, se midió la intensidad de luz absorbida por la muestra. Para eso se utilizó como actinómetro una solución de *meso*-difenilheliantreno (ver parte experimental), con el cual se pudieron obtener los rendimientos cuánticos de consumo de las cuatro oxopurinas en función de sus concentraciones. En las figuras 11 y 12 se muestran los valores experimentales obtenidos de Φ_{ox} vs. $[XH]$, y el ajuste no lineal de los mismos a la ecuación 3, para los casos del ácido trimetilúrico y de la cafeína respectivamente. El resto de las xantinas dan resultados similares a los obtenidos para la cafeína.

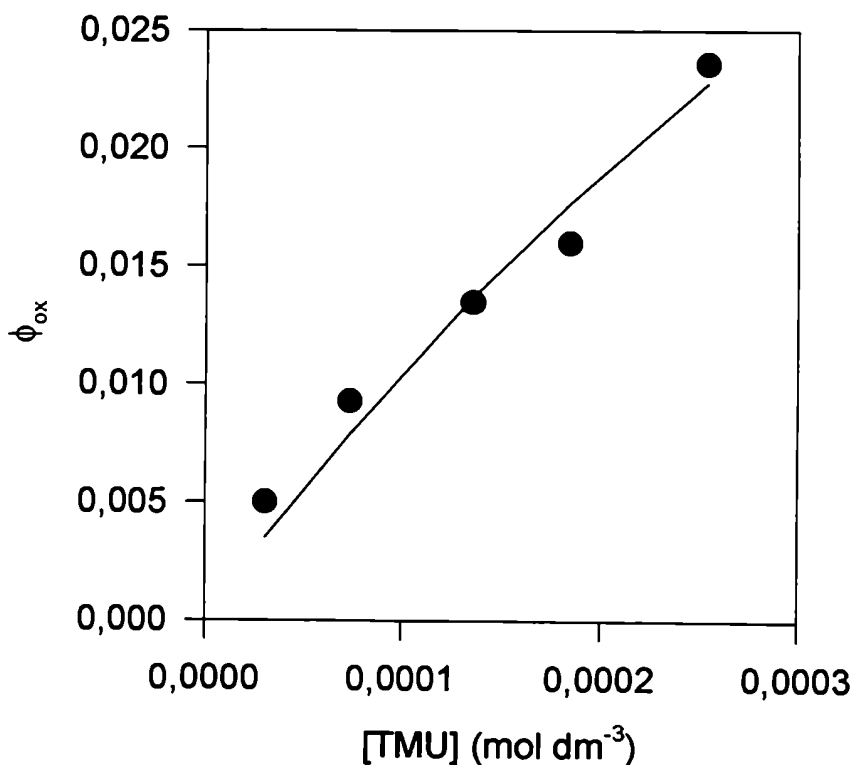


Figura 11. Rendimiento cuántico de consumo del ácido trimetilúrico en función de su concentración inicial. Los símbolos representan los valores experimentales. La línea representa el ajuste de los mismos a la ecuación 3. Solvente: EtOH.

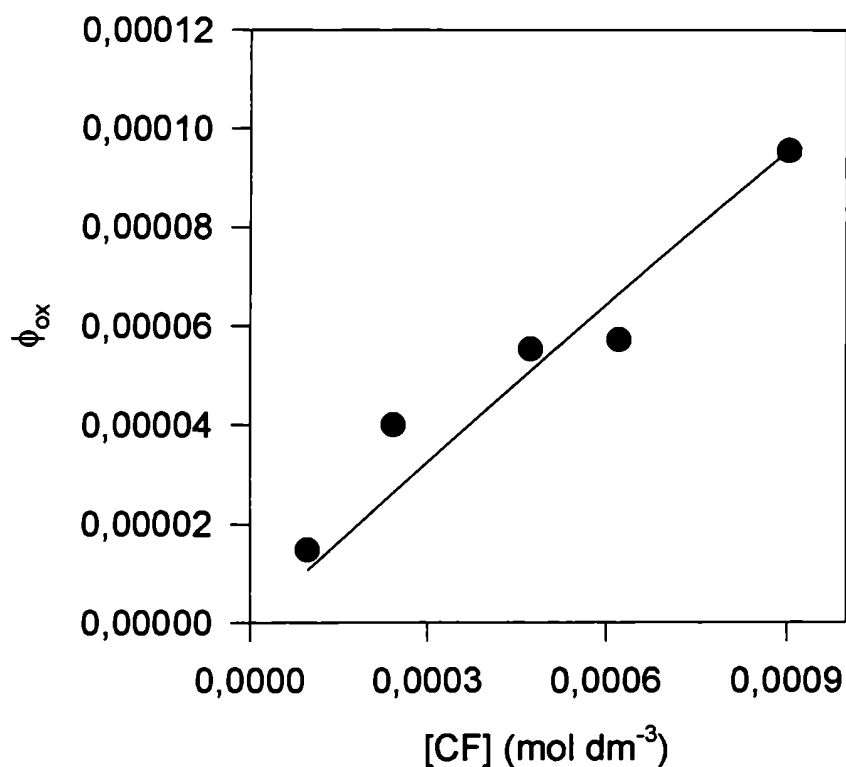


Figura 12. Rendimiento cuántico de consumo de la cafeína en función de su concentración inicial. Los símbolos representan los valores experimentales. La línea representa el ajuste de los mismos a la ecuación 3. Solvente: EtOH.

Como puede verse en las figuras 11 y 12, los valores empíricos de Φ_{ox} vs. $[XH]$ se ajustan razonablemente a la ecuación 3 dentro del error experimental, lo que constituye una evidencia adicional del mecanismo de reacción propuesto. Los valores de K_r y K_q obtenidos para las cuatro oxopurinas se muestran en la tabla 3. Como puede verse en esta tabla, los valores de K_q obtenidos en estado estacionario en etanol, coinciden con los medidos en acetonitrilo utilizando resolución temporal.

4.2.3 Efectos del solvente y estados de transición.

Como se mostró en la sección 4.2.2, la constante de desactivación total del oxígeno singlete por parte de las oxopurinas resultó ser igual en acetonitrilo y en etanol. A la luz de estos resultados, se decidió entonces extender este estudio a otros solventes con diferentes propiedades tales como polaridad, capacidad donora de hidrógeno, etc. Sin embargo, este estudio debió limitarse a aquellos solventes donde el comportamiento del Rosa de Bengala ha sido bien estudiado, y donde los valores de rendimiento cuántico de formación del oxígeno singlete y de la constante de decaimiento del mismo son conocidos y figuran en la literatura. Esto limitó nuestro estudio a los solventes cuyas propiedades se muestran en la tabla 4 (acetonitrilo, etanol, metanol y agua).

En los casos del acetonitrilo y el etanol, ya se mostró en la sección 4.2.2 que las constantes totales de desactivación son iguales en ambos solventes para las cuatro oxopurinas, pero sólo se había determinado la constante reactiva (K_r) en etanol. En este caso, las constantes relativas de reacción para las cuatro oxopurinas en acetonitrilo, se determinaron monitoreando por espectrofotometría UV-visible el consumo de reactivos en función del tiempo para así obtener las velocidades de reacción en acetonitrilo y en etanol bajo idénticas condiciones experimentales. Luego utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\Gamma_{\text{ox}}^{(\text{sv1})}}{\Gamma_{\text{ox}}^{(\text{sv2})}} = \frac{{}^2I_a {}^2\Phi_{\Delta} {}^2K_r {}^2[\text{XH}] ({}^1K_d + {}^1K_q {}^1[\text{XH}])}{{}^1I_a {}^1\Phi_{\Delta} {}^1K_r {}^1[\text{XH}] ({}^2K_d + {}^2K_q {}^2[\text{XH}])} \quad (4)$$

y teniendo en cuenta que: (a) la intensidad de luz absorbida es la misma en ambos casos ya que se igualaron las absorbancias del Rosa de Bengala y los experimentos se realizaron en idénticas condiciones, (b) K_q es la misma en ambos solventes (ver tabla 3) y (c) los valores de Φ_Δ y K_d en ambos solventes figuran en la literatura (ver tabla 4), se obtuvo entonces el valor de K_r en acetonitrilo (ver tabla 5).

Tabla 4. Valores de Φ_Δ del Rosa de Bengala y de K_d del oxígeno singulete en diferentes solventes^a y parámetros de esos mismos solventes.^b

	CH ₃ CN	EtOH	MeOH	H ₂ O
K_d (s ⁻¹)	1,5x10 ⁴	7,7x10 ⁴	1x10 ⁵	2,4x10 ⁵
Φ_Δ	0,685	0,77	0,80	0,76
$E_T(30)$ (Kcal mol ⁻¹)	46,0	51,90	55,5	63,1
α	0,19	0,83	0,93	1,17
β	0,31	0,77	0,62	0,18
AN	18,90	37,10	41,30	54,80
DN (Kcal mol ⁻¹)	14,10	31,50	25,70	33,00
ϵ	37,50	24,55	32,70	78,39
π^*	0,75	0,54	0,60	1,09

^a Referencias 24 y 31. ^b Referencias 33 a 37.

Para el agua y el metanol se repitieron los experimentos descritos en la sección 4.2.2 (figuras 9, 10, 11 y 12) utilizando nuevamente a la ecuación 3 para realizar los ajustes y tomando de la literatura^{24,31} los valores de Φ_Δ y K_d (ver tabla 4). Nuevamente en estos casos se obtuvieron, para cada una de las oxopurinas, valores de constantes de desactivación totales iguales a los obtenidos en

acetonitrilo y en etanol (tabla 3). Es decir que, dentro del error experimental, esta constante K_q es insensible al cambio del solvente para los cuatro sustratos estudiados. Sin embargo, los valores obtenidos para las constantes reactivas (K_r), tal como puede verse en la tabla 5, mostraron una fuerte dependencia del solvente. En todos los casos, esta constante aumenta aproximadamente cien veces al pasar de acetonitrilo a agua.

Tabla 5. Constantes de reacción (K_r) expresadas en $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ para las oxopurinas en diferentes solventes.

	CF	TF	TB	TMU
$K_{r(\text{CH}_3\text{CN})}$	$1,3 \times 10^3$	$8,8 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^6$
$K_{r(\text{EtOH})}$	$1,1 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$1,05 \times 10^7$
$K_{r(\text{MeOH})}$	$1,65 \times 10^4$	$1,71 \times 10^4$	$9,88 \times 10^4$	$1,4 \times 10^7$
$K_{r(\text{H}_2\text{O})}$	$1,2 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	1×10^8

Es interesante destacar que mientras que las tres xantinas (cafeína, teofilina y teobromina) tienen valores muy similares de K_r y de K_q en los diferentes solventes, en el caso del ácido trimetilúrico ambas constantes resultan superiores a las de las xantinas. En el caso de K_q , que como ya se indicó es insensible al cambio del solvente, el valor para el ácido trimetilúrico es aproximadamente dos órdenes de magnitud superior que para las xantinas. En el caso de K_r las diferencias son aún más notables y además hay una fuerte dependencia con el solvente. Por ejemplo,

cuando se utiliza a la cafeína como desactivante, el porcentaje de moléculas de oxígeno electrónicamente excitadas que son desactivadas por una *vía* reactiva varían aproximadamente entre el 0,05 y el 4 % al pasar de acetonitrilo a agua. En el caso del ácido trimetilúrico estos porcentajes son aproximadamente 3 y 100 % respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con la observación de Sheu y Foote¹³ de que la 8-oxoguanosina desactiva al oxígeno singulete con una constante cinética global (K_d) mucho mayor que la guanosina, y que esta diferencia es aún más notoria para la parte reactiva de esta desactivación (K_r).

A la luz de estos resultados, se decidió entonces tratar de correlacionar a las velocidades de reacción con diferentes parámetros que miden distintas propiedades del solvente. En las figuras 13 a 24 se muestran estas dependencias ejemplificadas con el ácido trimetilúrico. Como puede verse en la tabla 5, las cuatro xantinas presentan exactamente el mismo comportamiento frente al cambio de solvente.

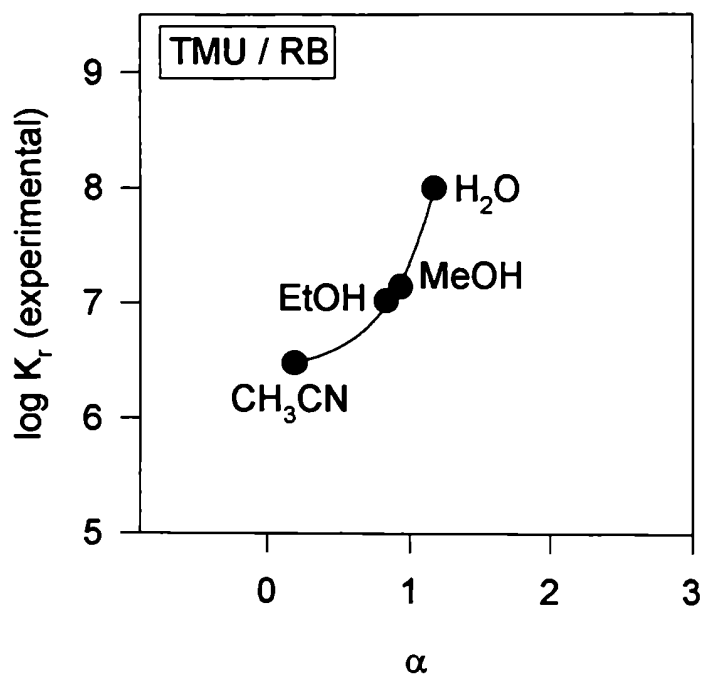


Figura 13. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la capacidad donora de unión hidrógeno del solvente (α).

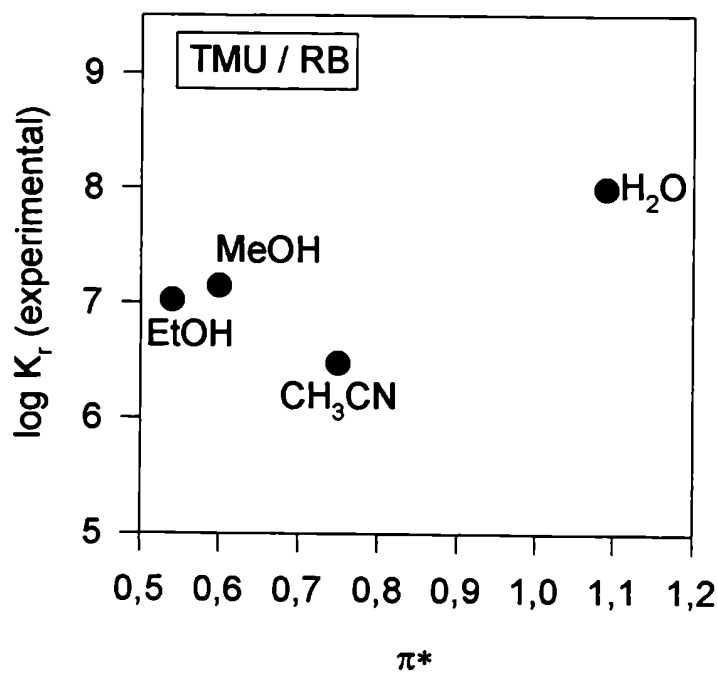


Figura 14. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la polaridad / polarizabilidad del solvente (π^*).

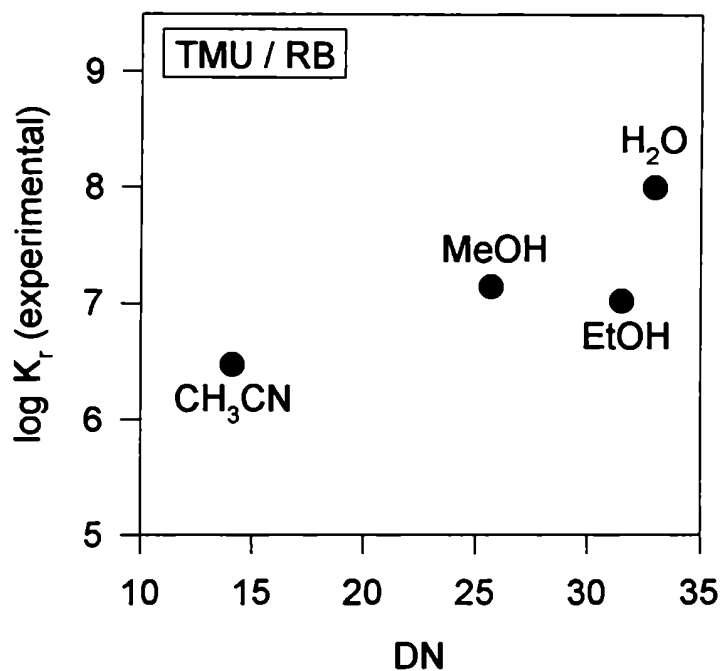


Figura 15. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función del número donador del solvente (DN) en Kcal mol^{-1} .

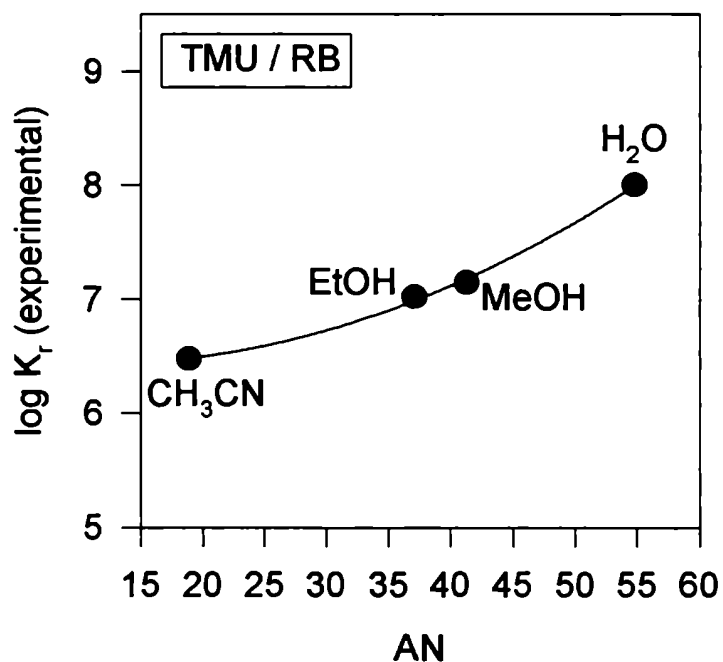


Figura 16. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función del número aceptor del solvente (AN).

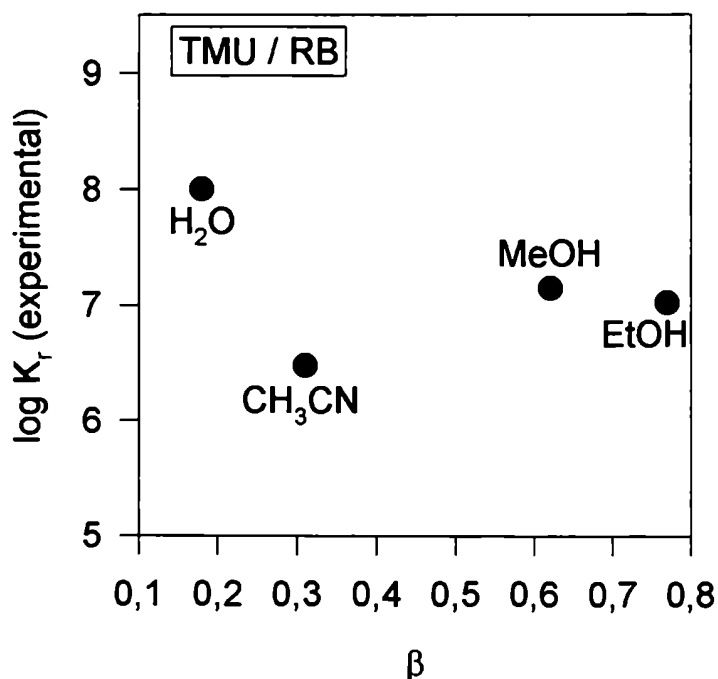


Figura 17. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la capacidad aceptora de unión hidrógeno del solvente (β).

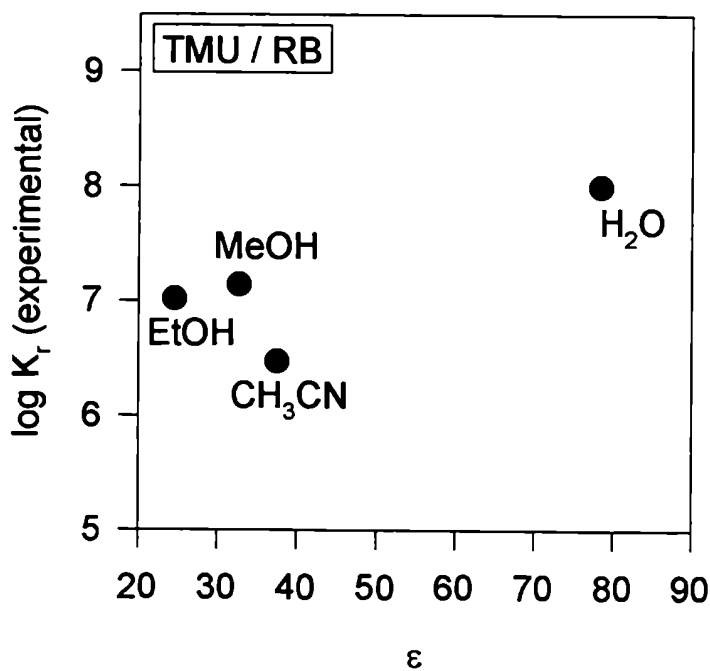


Figura 18. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la constante dieléctrica del solvente (ϵ).

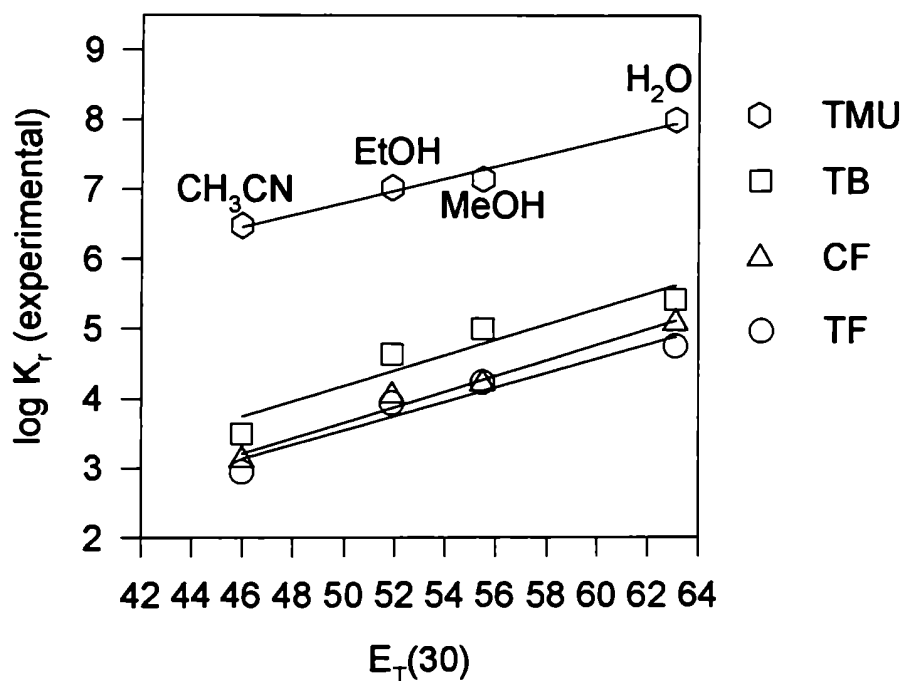


Figura 19. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la polaridad del solvente expresada como $E_T(30)$ en Kcal mol^{-1} .

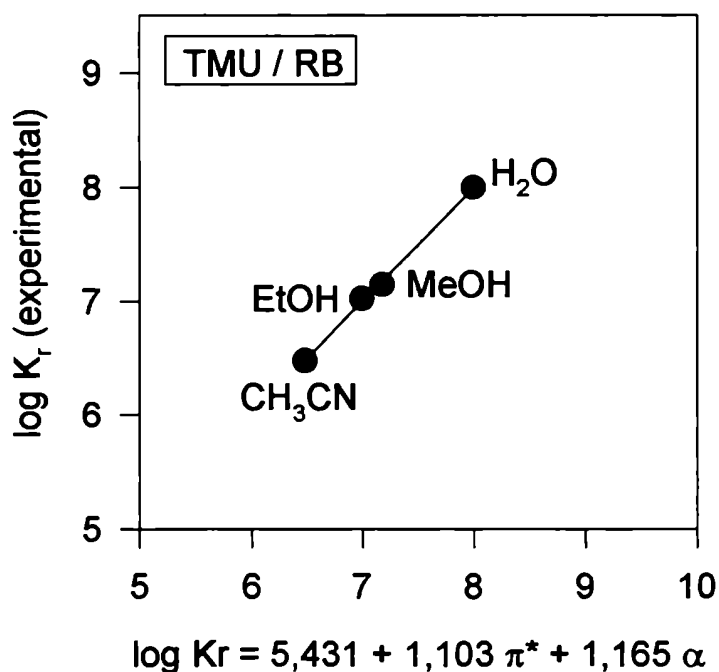


Figura 20. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la ecuación multiparamétrica que contiene los parámetros π^* y α .

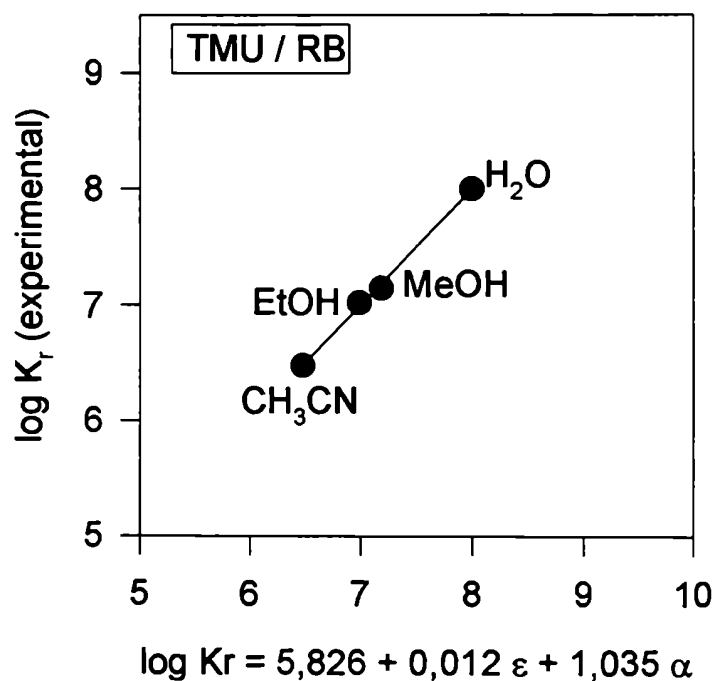


Figura 21. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la ecuación multiparamétrica que contiene los parámetros ε y α .

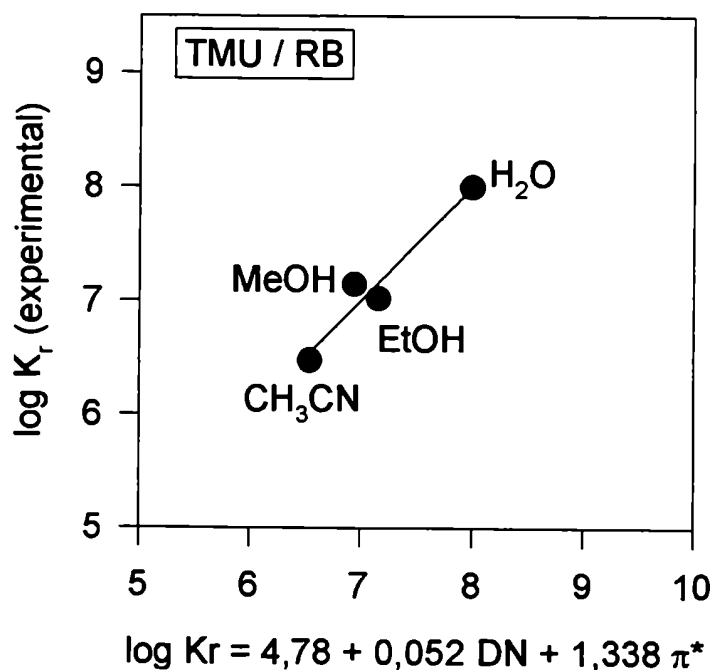


Figura 22. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la ecuación multiparamétrica que contiene los parámetros DN y π^* .

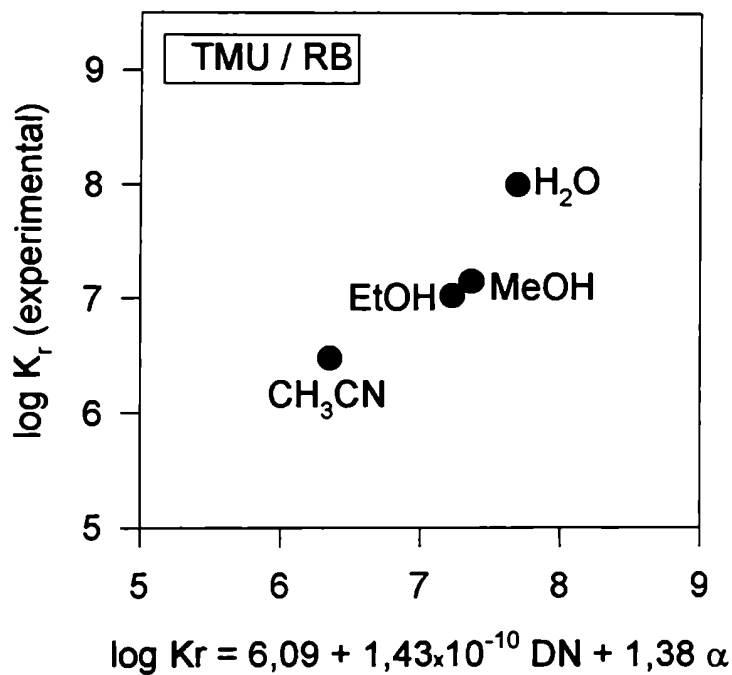


Figura 23. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la ecuación multiparamétrica que contiene los parámetros DN y α .

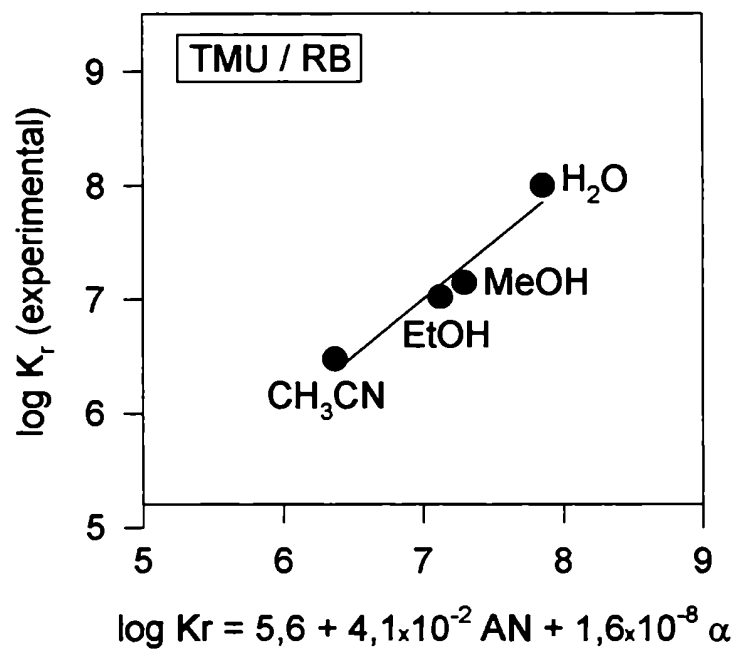


Figura 24. Logaritmo de la constante de velocidad de la reacción en función de la ecuación multiparamétrica que contiene los parámetros AN y α .

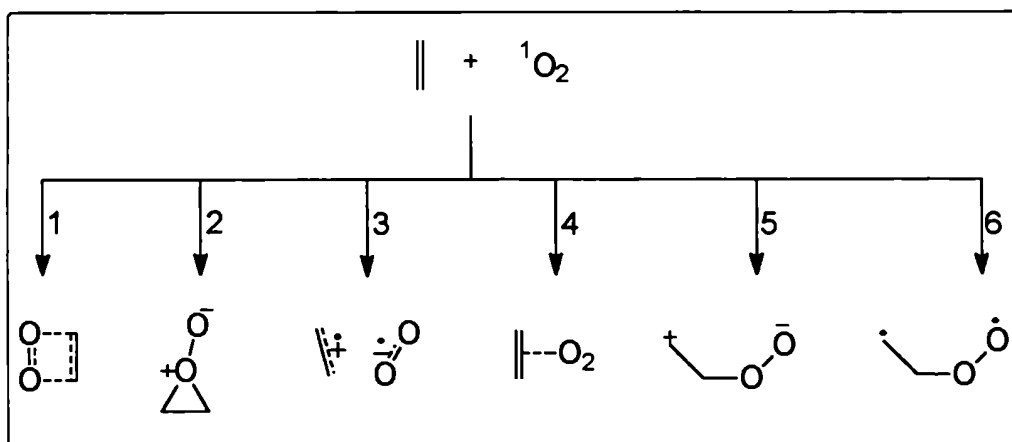
Como puede apreciarse en las figuras 13 a 24, de los parámetros utilizados, el único que permite obtener una buena correlación lineal con el logaritmo de la velocidad de reacción es el $E_T(30)$. Este parámetro, de acuerdo a la forma en que fue definido por Reichardt y col.³³ es una medida global de la polaridad del solvente y de las interacciones soluto-solvente. Además, es interesante destacar que las cuatro oxopurinas dan exactamente la misma pendiente.

Por otra parte, también se observan fuertes dependencias de K_r , con buenas correlaciones aunque no lineales, para los parámetros α y AN. Estos parámetros³³⁻³⁷ miden respectivamente la capacidad donora de unión hidrógeno del solvente y la capacidad de aceptar electrones o electrofilicidad del mismo. El resto de los parámetros³³⁻³⁷ (π^* , DN, ϵ y β) no dan buenas correlaciones, y sería necesario contar con una mayor cantidad de solventes para poder sacar alguna conclusión, aunque de todos modos se puede ver que en todos los casos la tendencia es un aumento de K_r con la polaridad del medio. También se obtienen buenas correlaciones lineales cuando se utilizan conjuntamente los parámetros α y π^* , que miden respectivamente la capacidad donora de unión hidrógeno del solvente y su polaridad-polarizabilidad, o cuando se utilizan conjuntamente el parámetro α y un parámetro macroscópico de polaridad como es la constante dieléctrica (ϵ).

Es interesante destacar que, si bien Sheu y Foote^{11,12} fueron capaces de detectar la formación de endoperóxidos como intermediarios en las fotooxidaciones sensibilizadas de derivados de la guanosina utilizando las técnicas de EM (FAB) y

RMN a bajas temperaturas (ver introducción), esto no implica que el proceso primario sea una cicloadición concertada [2+2] o [4+2].

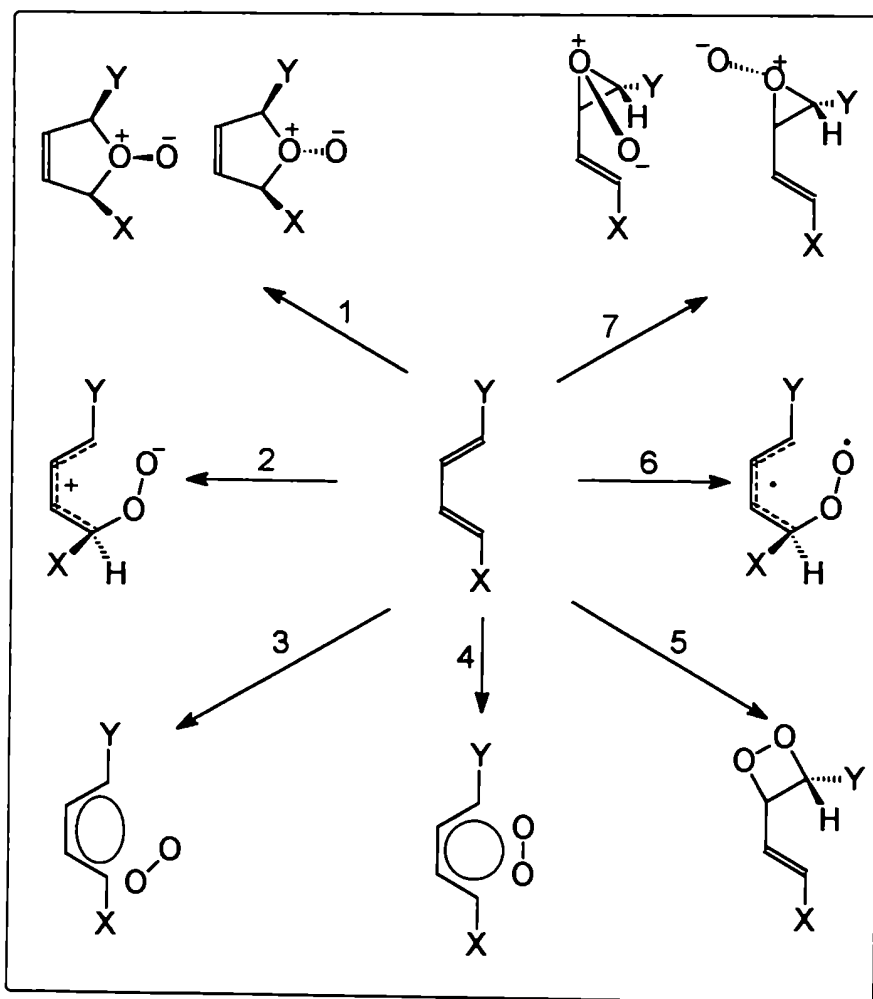
Los mecanismos de las cicloadiciones formales [2+2] de oxígeno singlete han sido muy discutidos en la literatura.³⁸⁻⁴² Se acepta la existencia de al menos seis mecanismos de reacción que pueden conducir a la formación del endoperóxido (ver esquema 20):



Esquema 20

El primer mecanismo, y uno de los considerados menos probable en la actualidad, es una cicloadición concertada [2s + 2a]. El segundo mecanismo, procede mediante un intermediario perezoso. El tercer mecanismo involucra la transferencia de un electrón del sustrato al oxígeno singlete. El cuarto implica la formación de un exciplexo. El quinto y el sexto proceden mediante la formación de un zwitterión y de un biradical respectivamente. Todos estos intermediarios pueden evolucionar luego hacia la formación del endoperóxido tipo [2+2].

Para el caso de las cicloadiciones [4+2] se han propuesto mecanismos similares³⁹ (ver esquema 21).



Esquema 21

Como puede verse en el esquema 21, el mecanismo 1 es una adición quelotrópica, los mecanismos 2 y 6 involucran la formación de intermediarios zwitteriónicos y biradicales respectivamente, los mecanismos 3 y 4 son reacciones concertadas que sólo difieren en el sincronismo de la formación de los dos enlaces

C-O, el mecanismo 5 implica la formación de un intermediario reactivo vinildioxetano, y finalmente, el mecanismo 7 propone la formación de perepóxidos intermediarios. También en este caso, estos intermediarios luego pueden evolucionar hacia la formación del endoperóxido tipo [4+2].

Por otra parte, se ha demostrado que las cicloadiciones del oxígeno singlete se caracterizan por poseer barreras de activación nulas o muy pequeñas.³⁹ Estas barreras de activación tan pequeñas han sido interpretadas por algunos autores^{39,41,42} como indicativas de la formación de un exciplexo reversible que precede a la formación de los intermediarios reactivos que se muestran en los esquemas 20 y 21.

Existen además varios ejemplos en la literatura de reacciones de oxígeno singlete con diversos sustratos, donde la constante global de desactivación (K_q) no depende de la polaridad del solvente, mientras que la constante de reacción (K_r) sí es dependiente.^{39,41,42} Por ejemplo, Foote y col.⁴¹⁻⁴³ propusieron que en las reacciones de fotooxidación de dienos y sulfuros de alquilo se forma un intermediario zwitteriónico. Los autores explican que la falta de dependencia de la constante global K_q con la polaridad del solvente se debe a la formación de un estado de transición poco polar que podría ser un exciplexo que precede la formación del zwitterión en un paso de baja o nula entalpía de reacción.

Este mismo argumento podría explicar la falta de dependencia con el solvente observada para la desactivación del oxígeno singlete por parte de las oxopurinas.

Si bien, como se explicó anteriormente, la transferencia de un electrón de las oxopurinas al oxígeno singlete puede ser descartada debido a que este proceso es claramente endergónico, no se puede descartar que el complejo de encuentro o exciplexo tenga cierto carácter parcial de transferencia de carga. Como se ha demostrado para numerosos sustratos, tales como aminas, fenoles, sulfuros de alquilo y algunas olefinas, la formación de estos complejos, aún cuando tengan bajo carácter de transferencia de carga, permiten relajar las restricciones de spin del proceso de cruce intersistemas conduciendo a una desactivación física del oxígeno electrónicamente excitado.^{41,44-46}

Por otra parte, las constantes de reacción de las oxopurinas estudiadas en esta tesis resultaron fuertemente dependientes de la polaridad del solvente medida mediante el parámetro $E_T(30)$ (figura 19). También se observó un importante incremento de K_r al aumentar la capacidad donora de unión hidrógeno del solvente (figura 13), sin que se detecte una clara dependencia de esta constante cinética con la capacidad aceptora de unión hidrógeno del solvente (figura 17). Además, K_r resultó fuertemente dependiente de la electrofilicidad del solvente (figura 16) y no mostró una clara correlación con la nucleofilicidad del mismo (figura 15). Estos resultados son claramente indicativos de la formación de un intermediario altamente polar, con la carga negativa mucho más localizada que la carga positiva. Como puede verse en los esquemas 23 y 24, un intermediario zwitteriónico cumpliría con estos requisitos, ya que tanto para el ácido trimetilúrico como para las xantinas, la carga positiva puede deslocalizarse sobre una mayor cantidad de átomos.

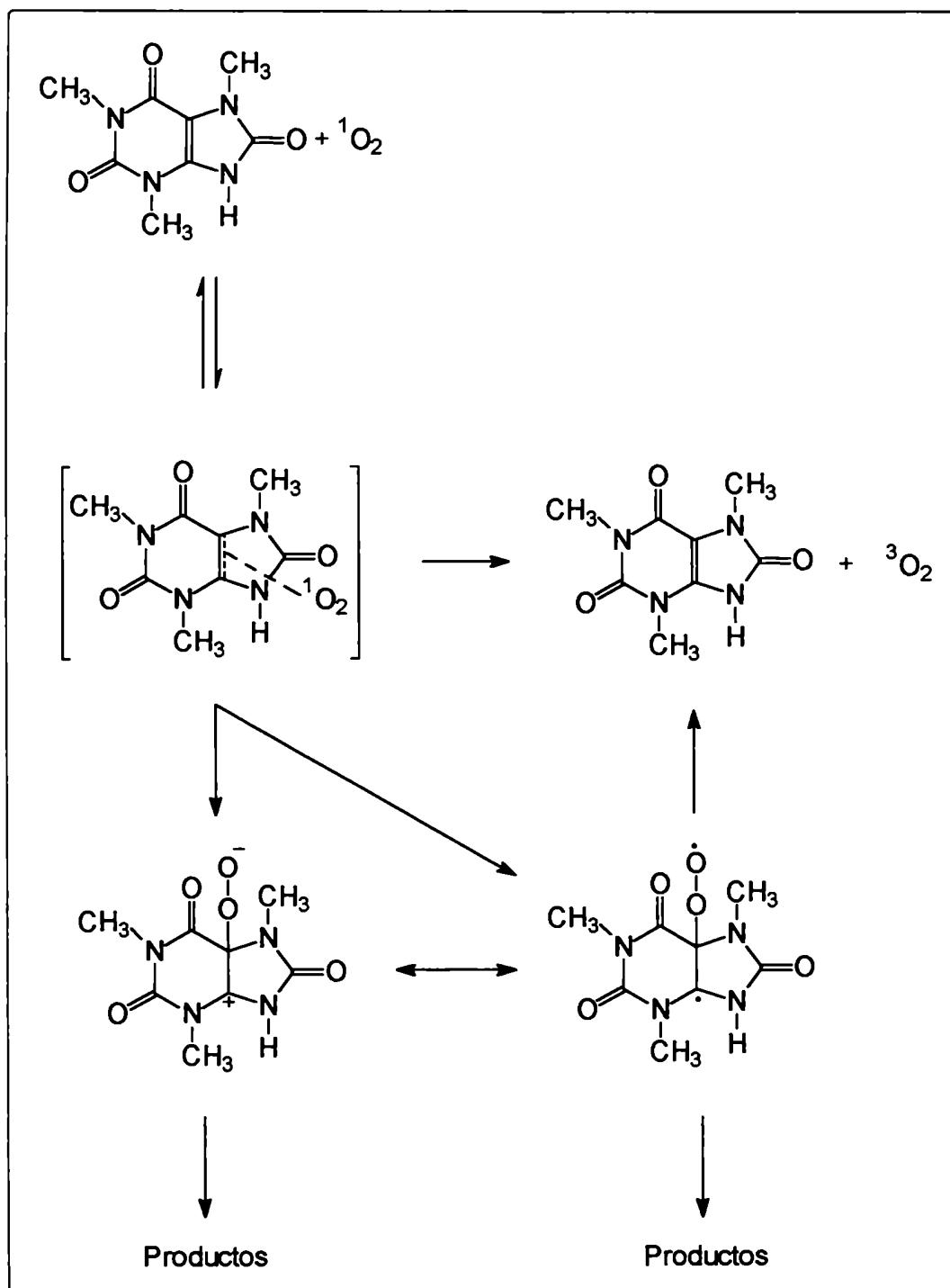
Una vez formado este zwitterión puede evolucionar para dar endoperóxidos u otros productos de reacción, o bien puede revertir produciendo una desactivación física. Este último proceso puede entenderse fácilmente si se tiene en cuenta que, como propusieron Foote y col.,⁴² un zwitterión y un biradical son sólo extremos de un continuo de distribución de densidades electrónicas. El biradical singlete puede fácilmente, mediante un cruce intersistemas, poblar el estado triplete y luego regenerar al sustrato de partida liberando oxígeno en su estado fundamental triplete, en un proceso permitido por spin. Este proceso no es posible desde el zwitterión. Esto explicaría la mayor reactividad de las oxopurinas en solventes de alta polaridad y alta capacidad donora de unión hidrógeno, que estabilizarían al zwitterión frente al biradical.

Una evidencia de la interconvertibilidad entre el zwitterión y el biradical, es el hecho de que cuando se optimizan las geometrías de ambas especies mediante métodos semiempíricos de modelado molecular (PM3 y AM1) en el vacío, es decir en ausencia de efectos de estabilización debidos al solvente, ambas especies poseen energías y distribuciones de carga similares. Es decir, que la formación del zwitterión reactivo estaría gobernada fundamentalmente por la capacidad del solvente para estabilizar el centro aniónico por interacciones electrostáticas y por formación de uniones hidrógeno.

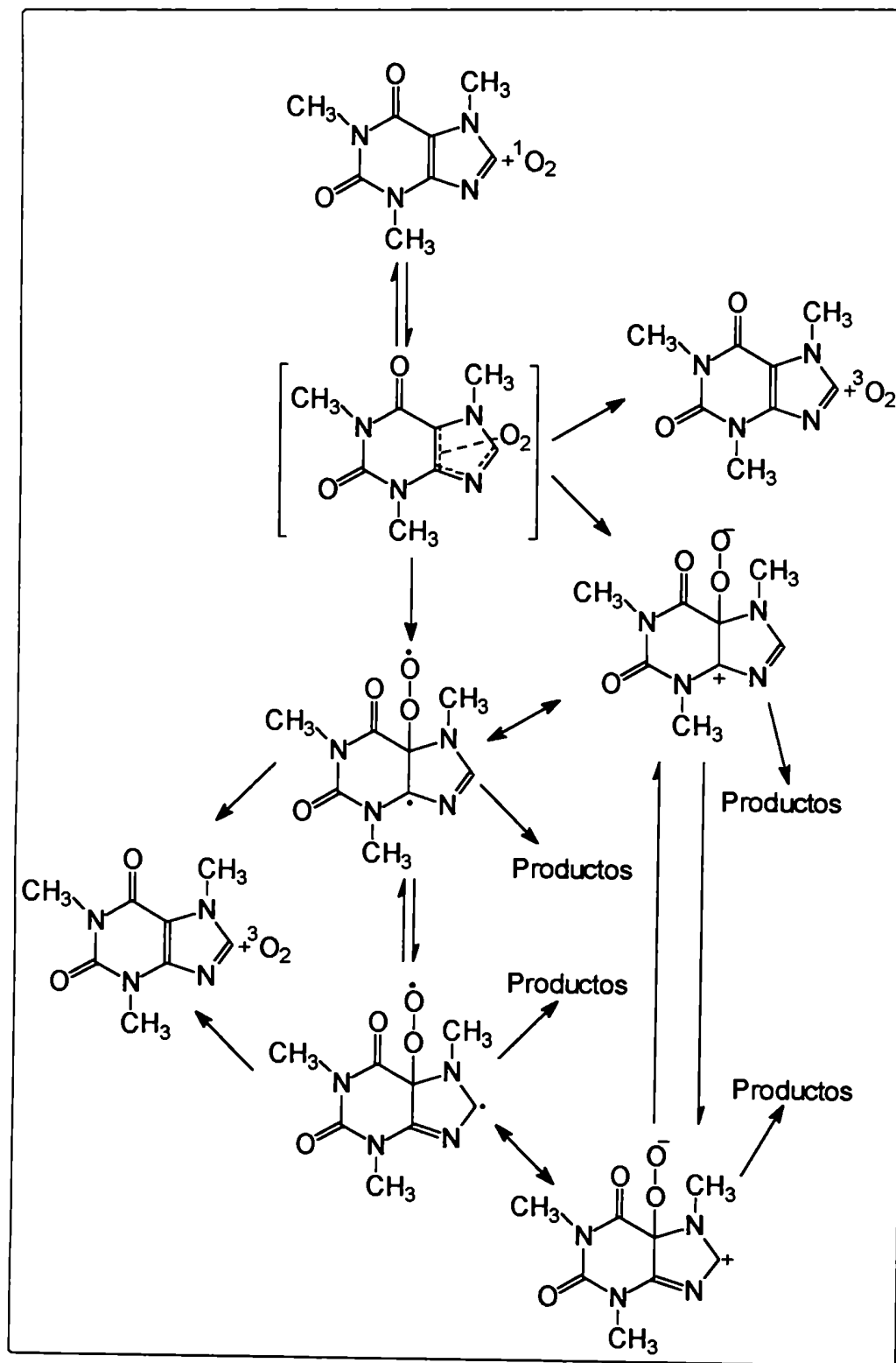
Por otra parte, el hecho de que las constantes de reacción de las cuatro oxopurinas estudiadas presenten exactamente el mismo tipo de dependencia con los diferentes parámetros del solvente (por ejemplo las gráficas de K_r vs. $E_T(30)$ dan las mismas pendientes para los cuatro sustratos), induce a pensar que en los cuatro

casos los procesos primarios son los mismos, dando el mismo tipo de exciplo inicial que luego conduce a la formación de un zwitterión intermediario. De todos modos, esto no implica que los productos finales de reacción deban ser los mismos en los cuatro casos.

En los esquemas 22 y 23 se resumen las conclusiones de esta discusión ejemplificadas para el caso del ácido trimetilúrico y de la cafeína respectivamente (el resto de las xantinas presentarían un comportamiento similar al de la cafeína). Como puede verse en estos esquemas, la carga positiva del zwitterión puede deslocalizarse por resonancia, estabilizando a dicha especie. Esto también constituye un indicio de que nuestra propuesta es válida, ya que como se discutió en numerosas publicaciones³⁸⁻⁴² la formación del intermediario zwitteriónico suele ser la principal vía de reacción sólo en aquellos casos en que exista algún tipo de estabilización del centro catiónico.



Esquema 22



Esquema 23

4.2.4 Identificación de los productos de reacción y sus posibles mecanismos de formación.

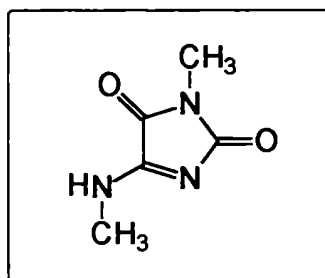
Cuando se irradia una solución de ácido trimetilúrico en etanol utilizando Rosa de Bengala como sensibilizador, se observa por ccd la formación de un producto mayoritario de R_f mayor que la materia prima. Este producto fue aislado por cromatografía de adsorción en columna obteniéndose con un rendimiento químico del 70 %. El producto aislado fue caracterizado por RMN- ^1H , EM (impacto electrónico y FAB) e IR-FT como la 3-metil-5-(metilamino)-1,5-dehidrohidantoína.

RMN- ^1H (CD_3COCD_3): δ (ppm) 2,96 (s, 3H); 3,10 (s, 3H); 8,28 (s, 1H).

EM (IE) m/z (%): 141 (15), 113 (5), 84 (12), 69 (13), 56 (100), 45 (63).

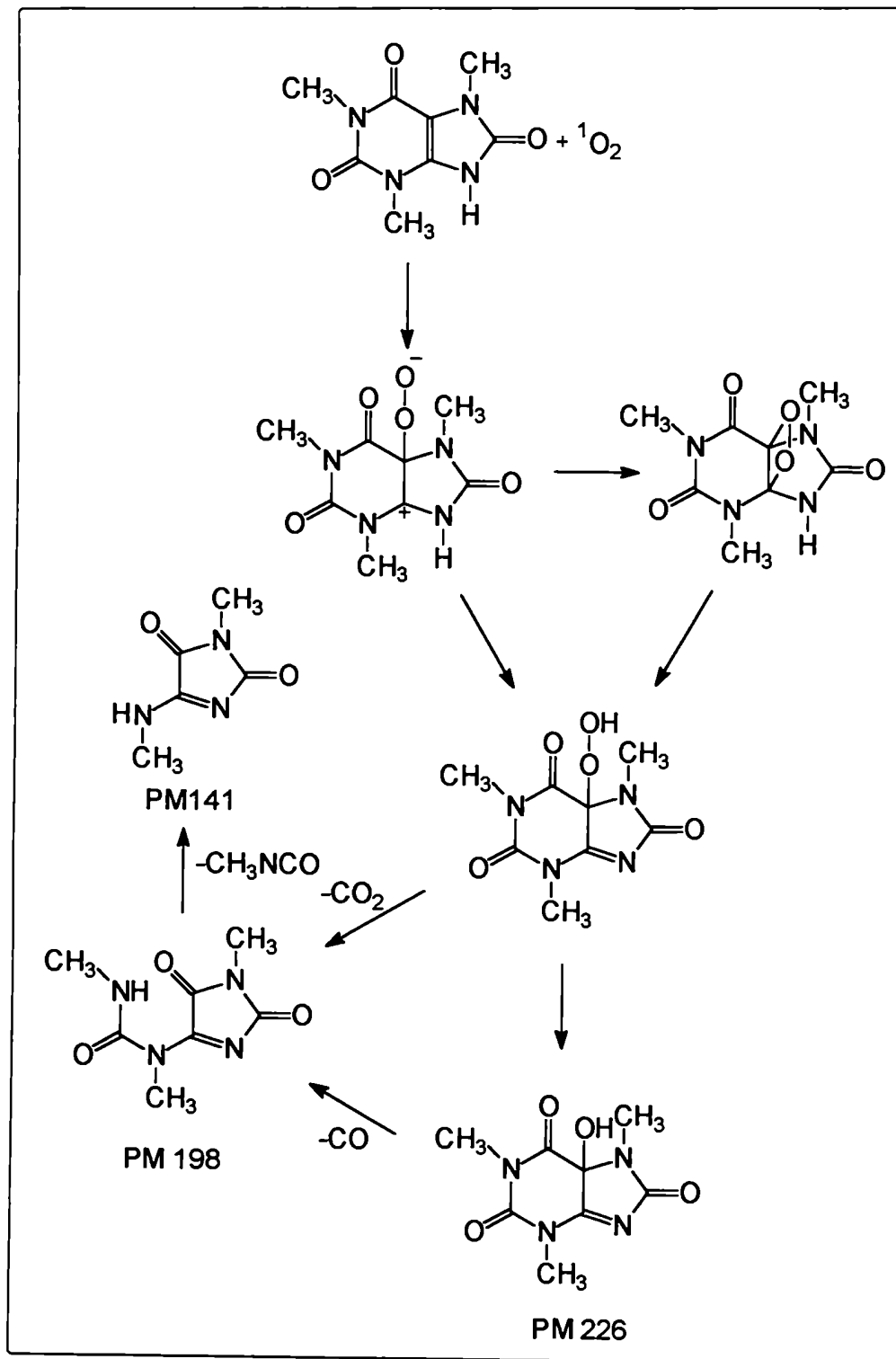
EM (FAB) (matriz de glicerol) m/z (%): $\text{M}+\text{H}^+$ = 142 (100).

IR-FT (nujol) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3265, 1754, 1643.



Esquema 24. Estructura de la 3-metil-5-(metilamino)-1,5-dehidrohidantoína.

Teniendo en cuenta la estructura química del principal producto de la reacción y las evidencias mecanísticas que se explicaron en las secciones anteriores, el mecanismo de formación de este producto puede racionalizarse mediante el siguiente esquema:



Esquema 25

Junto con este producto principal, se han detectado por espectrometría de masas pequeñas cantidades de otros productos minoritarios de m/z 198 y 226, los que no pudieron ser aislados, y que podrían considerarse de acuerdo a sus pesos moleculares como los dos precursores inmediatos de la 3-metil-5-(metilamino)-1,5-dehidrohidantoína propuestos en el esquema 25.

Por otra parte se han detectado también por RMN- ^1H pequeñas cantidades de otro producto minoritario que posee en su estructura una unidad $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, y que provendría del ataque nucleofílico del solvente al zwitterión inicial o bien a un intermediario más avanzado. Lamentablemente los intentos por aislar este compuesto resultaron infructuosos. Cabe señalar que el aislamiento y purificación de los productos de estas reacciones de fotooxidación resulta muy dificultoso debido a su baja estabilidad.

Cuando se utiliza a la cafeína como sustrato en etanol, la mezcla de reacción es más compleja, y cuando ésta es analizada por CG presenta un cromatograma como el que se muestra en la figura 25. En la figura 26 se muestra el seguimiento de esta reacción en función del tiempo utilizando la misma técnica de monitoreo.

Se intentó aislar los productos de esta reacción por cromatografía de adsorción en columna y en placa preparativa, pero lamentablemente no se logró obtener a ninguno de los productos que inicialmente se observaban por ccd y por CG, debido a que la alta inestabilidad de los mismos lleva a la degradación de la mezcla durante su procesamiento. En vista de este resultado, sólo pudimos estimar la composición de la mezcla por CG-EM. Para ello se realizaron irradiaciones en tres solventes diferentes: metanol, etanol y n-propanol.

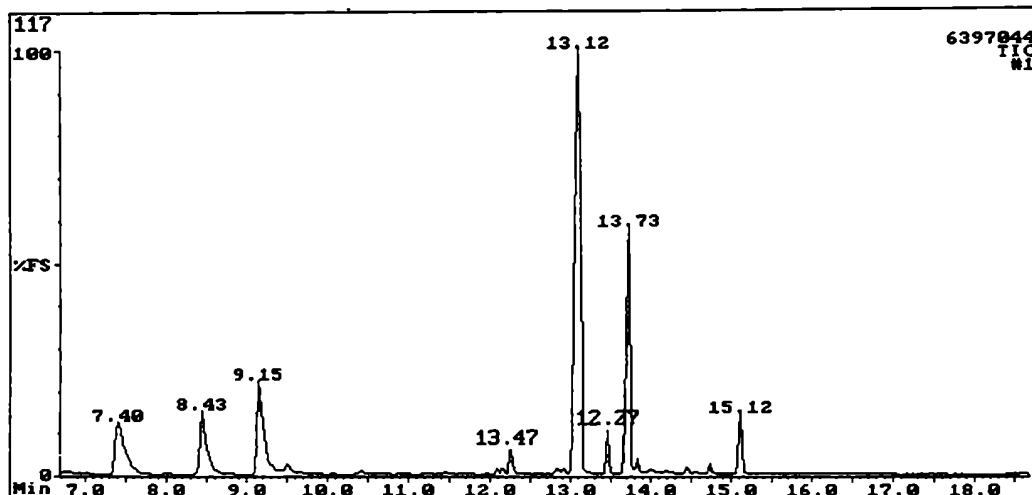


Figura 25. Cromatograma (CG) obtenido a partir de una solución de CF/RB/EtOH luego de irradiada.

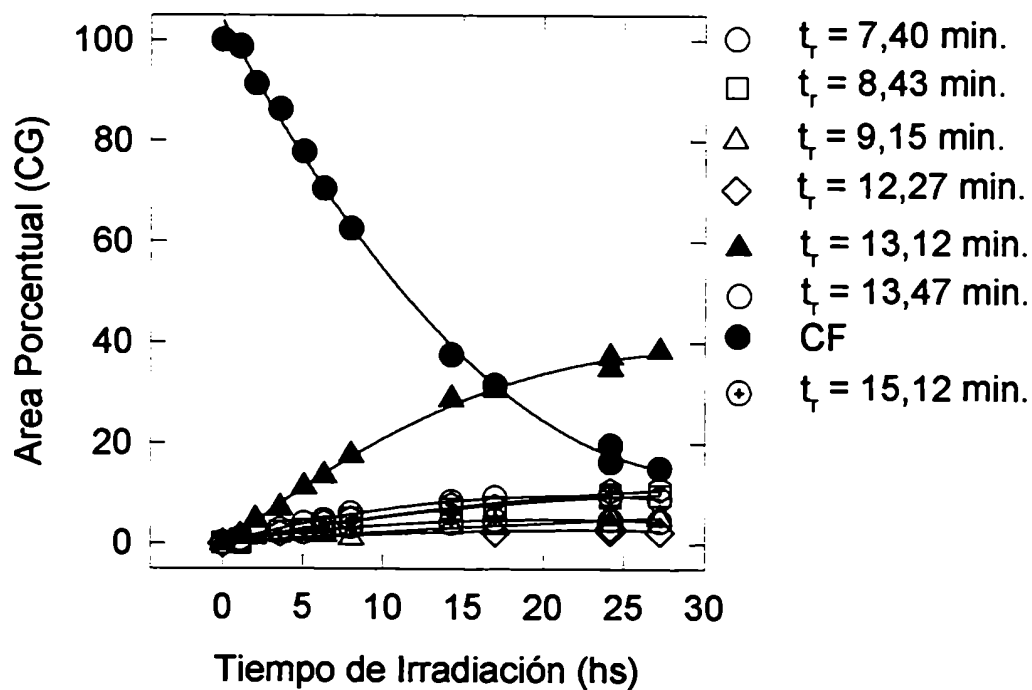


Figura 26. Porcentaje de reactivos y productos en función del tiempo de irradiación para una solución de CF / RB / EtOH medidos por CG.

En los tres casos se obtuvieron cromatogramas similares al que se muestra en la figura 25, donde se puede ver una señal a los 13,12 min. que corresponde al producto mayoritario y cuyo espectro de masa (ver figura 27) es independiente del solvente de reacción, lo que indicaría que no se produjo incorporación del solvente.

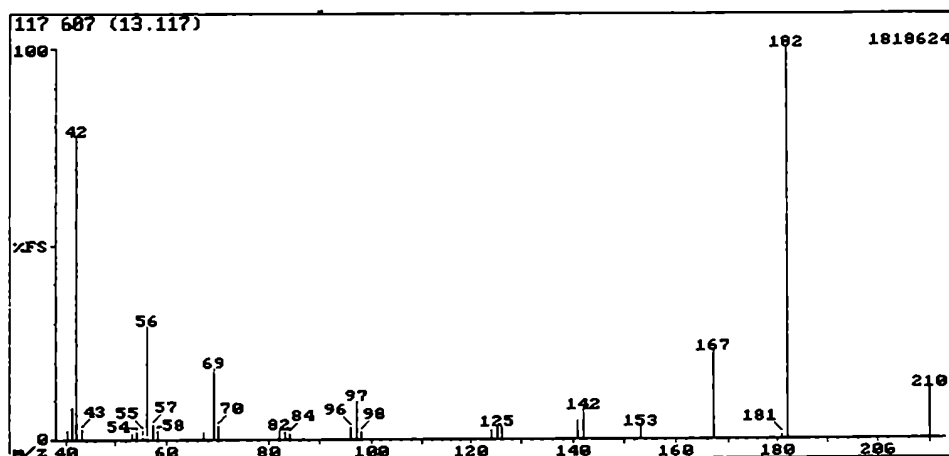


Figura 27. Espectro de masa del producto de $t_r = 13,12$ min.

Como se puede ver en la figura 27, el ión molecular aparente de este compuesto tiene un valor de $m/z = 210$. Este valor de m/z nos indujo a pensar en un principio que el producto podría ser el ácido trimetilúrico, sin embargo cuando se realizó el espectro de masa de una muestra comercial de este compuesto se obtuvo un patrón de rupturas totalmente diferente, además de observarse un comportamiento cromatográfico también diferente. Este valor de $m/z = 210$ correspondería a una molécula de cafeína (PM = 194) que incorporó un átomo de oxígeno, y podría atribuirse a la formación de un epóxido. Sin embargo, no es posible afirmar que este sea realmente el peso molecular, ni tampoco que el compuesto que llega al detector del espectrómetro de masa luego de pasar por la

columna cromatográfica a temperaturas que van desde los 100 hasta los 290 °C, sea el mismo compuesto presente en la mezcla de reacción inyectada.

En el cromatograma de la figura 25 se pueden ver otras tres señales de intensidades intermedias con tiempos de retención de 7,40 min., 8,43 min. y 9,15 min. respectivamente. Los espectros de masa de estos tres compuestos también resultaron independientes del solvente de irradiación empleado, y se muestran en las figuras 28, 29 y 30 respectivamente.

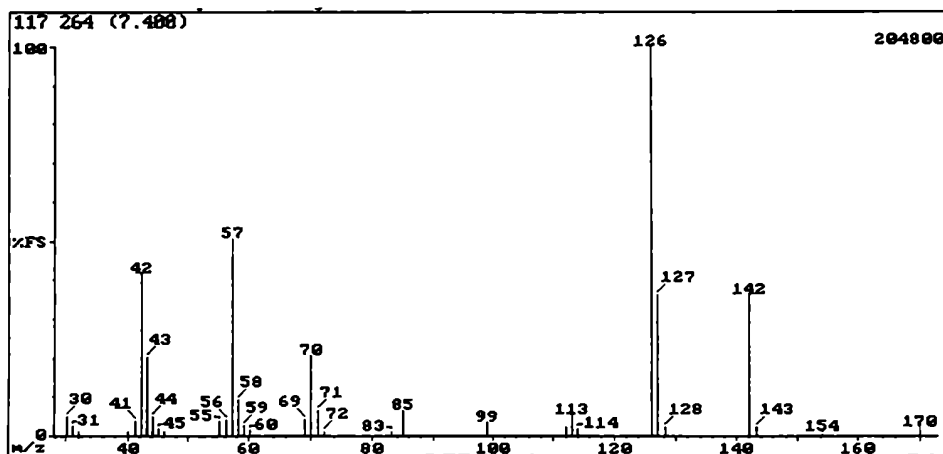


Figura 28. Espectro de masa del producto de $t_r = 7,40$ min.

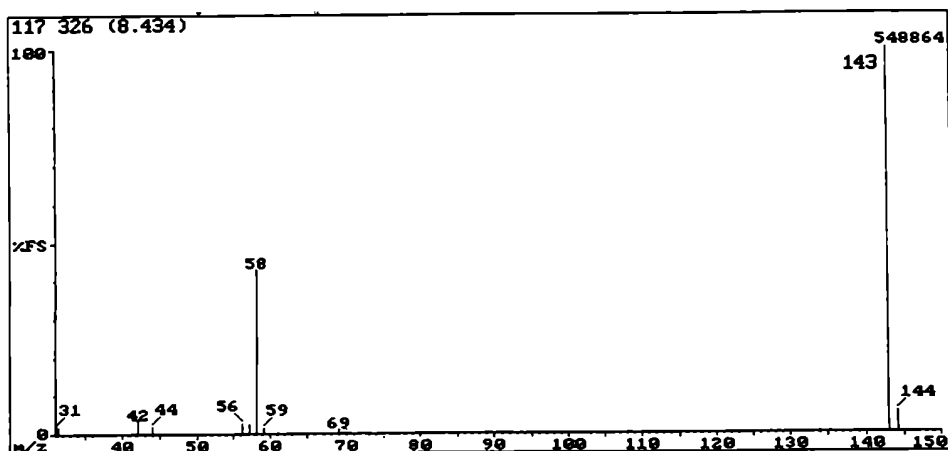


Figura 29. Espectro de masa del producto de $t_r = 8,43$ min.

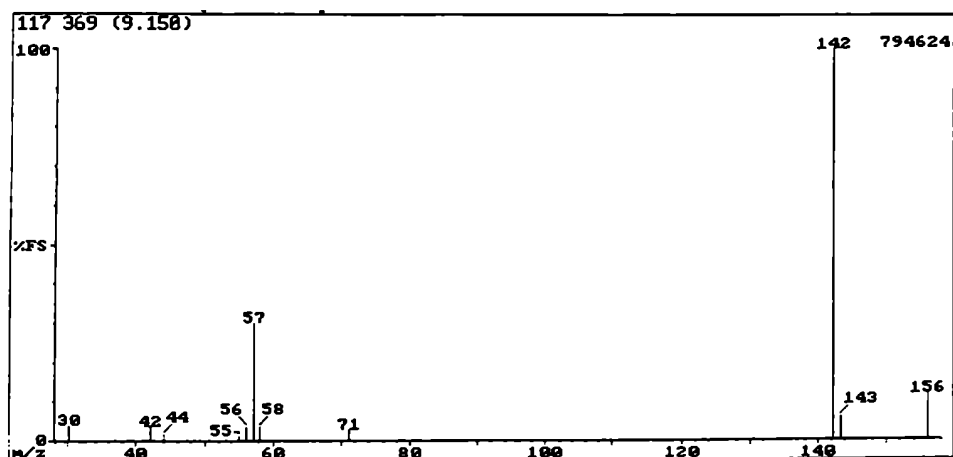
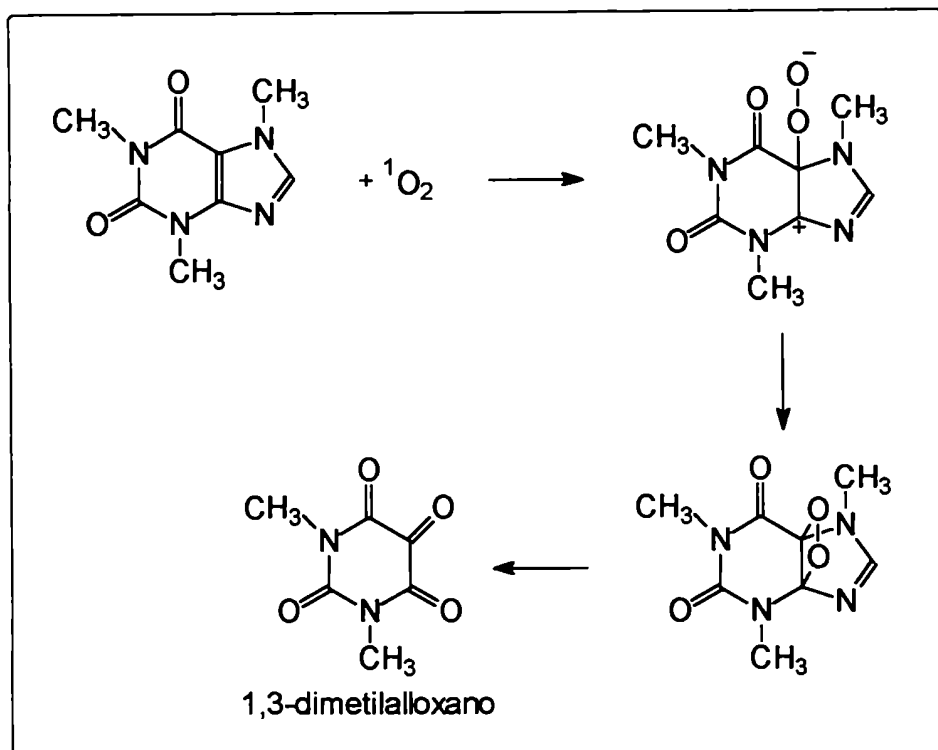


Figura 30. Espectro de masa del producto de $t_r = 9,15$ min.

El análisis del espectro de masa de la figura 28 nos permite proponer que la estructura más probable del producto de $t_r = 7,40$ min. corresponde al 1,3-dimetilaloxano. En el esquema 26 se muestra la estructura propuesta para este producto y su posible origen químico.

Los espectros de masa de los productos de tiempos de retención 8,43 min. y 9,15 min. (figuras 29 y 30) presentan iones moleculares aparentes de $m/z = 143$ y $m/z = 156$ respectivamente. No fue posible encontrar estructuras lógicas que concuerden con estos espectros de masa. Por otra parte, en el caso del compuesto con $t_r = 9,15$ min., la primera ruptura que se observa corresponde a una pérdida de 14 unidades de masa. Estos hechos nos inducen a pensar que en ambos casos no es posible observar los iones moleculares utilizando la técnica de impacto electrónico, y por lo tanto no es posible proponer ninguna estructura para estos productos.



Esquema 26

Además de los productos antes mencionados se logran detectar por CG-EM otros tres productos muy minoritarios de tiempos de retención 12,27 min., 13,47 min. y 15.12 min. respectivamente. A diferencia de los casos anteriores, se observa que los espectros de masa de estos productos dependen del solvente de irradiación. En las figuras 31, 32 y 33 se muestran los espectros de masa de estos compuestos para las irradiaciones realizadas en etanol. Cuando se utiliza metanol o n-propanol como solventes, los espectros difieren respectivamente en -14 y +14 unidades de masa pero presentan los mismos patrones de rupturas, lo cual resulta claramente indicativo de la incorporación de una molécula de solvente a la estructura de la cafeína.

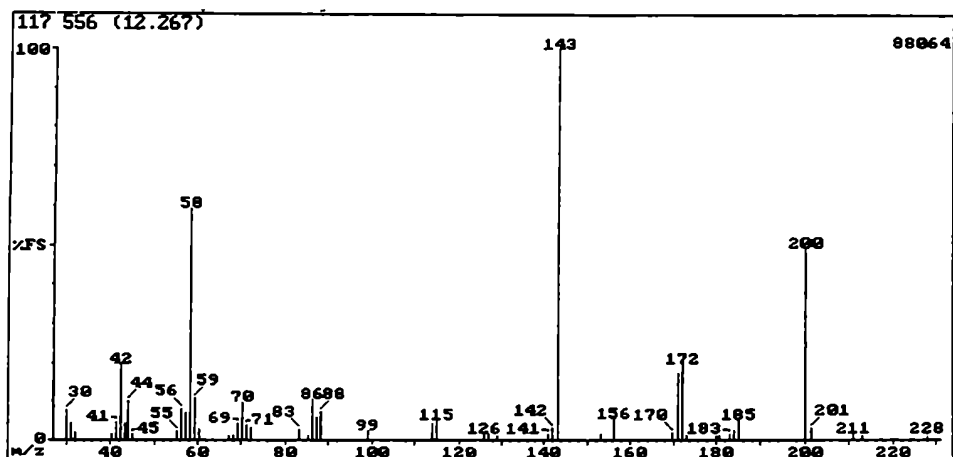


Figura 31. Espectro de masa del producto de $t_r = 12,27$ min.

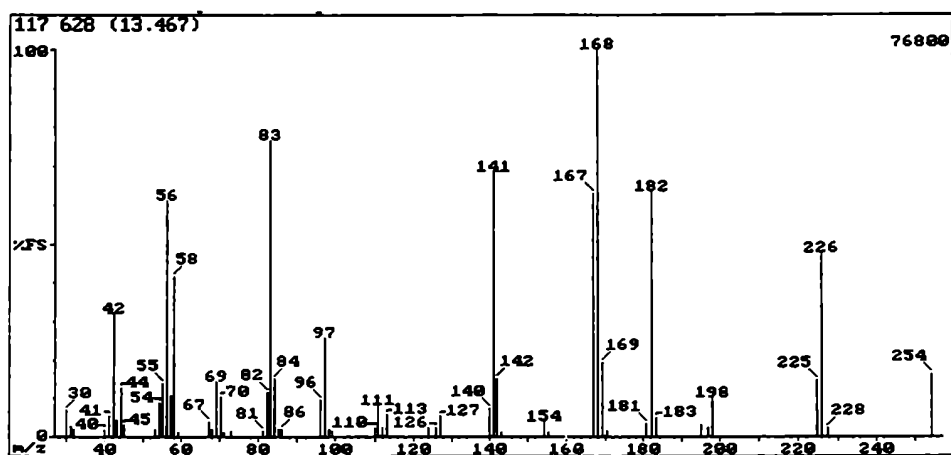


Figura 32. Espectro de masa del producto de $t_r = 13,47$ min.

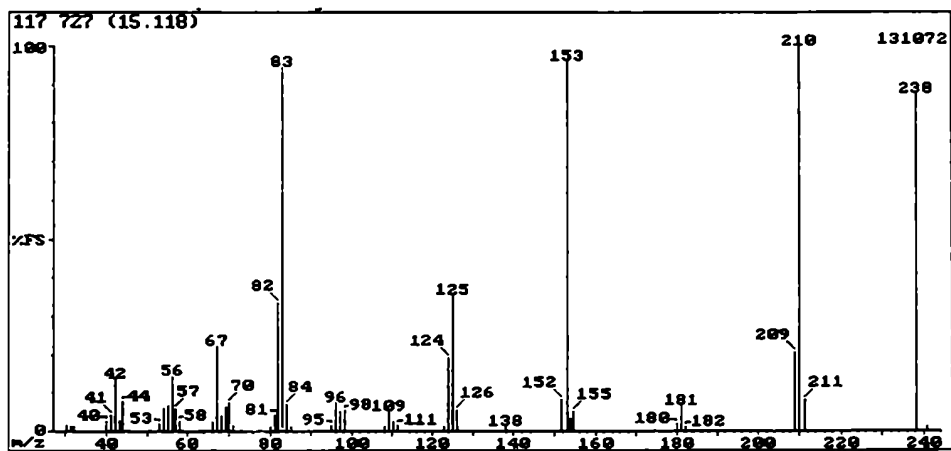
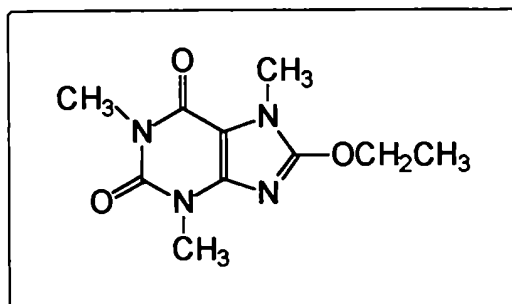


Figura 33. Espectro de masa del producto de $t_r = 15,12$ min.

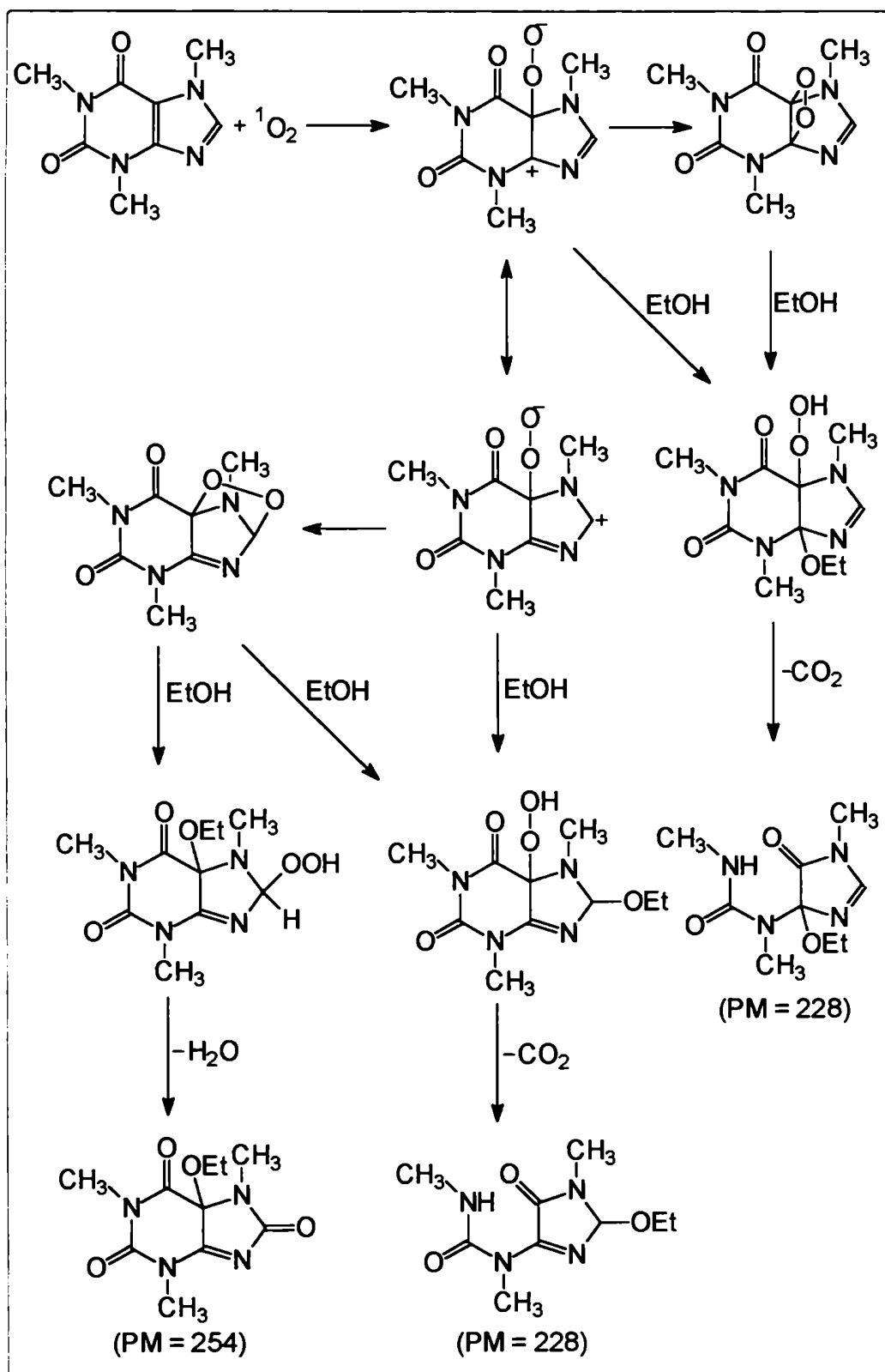
Al producto de $t_r = 15,2$ min., de acuerdo a su espectro de masa, puede asignársele la estructura correspondiente a la 8-alcoxicafeína (esquema 27).



Esquema 27. Estructura de la 8-etoxicafeína.

En el esquema 28 se muestran los posibles mecanismos de formación de los productos de t_r 12,27 min. y 13,47 min. para el caso de la fotooxidación de la cafeína en etanol.

En los casos de la teofilina y la teobromina las mezclas de reacción resultaron extremadamente complejas, y si bien se realizaron numerosas experiencias irradiando en diferentes solventes y analizando las mezclas por CG-EM, no fue posible realizar una asignación tentativa de estructura para los productos formados.



Esquema 28

4.3 Resumen y conclusiones.

Se realizaron numerosos experimentos cinéticos empleando tanto técnicas de estado estacionario (actinometrías de fotólisis estacionarias en distintas condiciones, efecto isotópico cinético del solvente, etc.) como técnicas con resolución temporal (láser flash fotólisis y detección resuelta en el tiempo de la fosforescencia del oxígeno singulete). Los resultados de estos experimentos constituyen firmes evidencias de que las fotooxidaciones de las oxopurinas estudiadas (cafeína, teofilina, teobromina y ácido trimetilúrico) sensibilizadas con Rosa de Bengala ocurren mediante un mecanismo de tipo II, siendo el oxígeno singulete el agente oxidante.

Por otra parte, se lograron determinar las constantes cinéticas de los procesos globales de desactivación del oxígeno excitado singulete por parte de las oxopurinas así como las constantes de reacción. Mientras que las constantes globales de desactivación resultaron insensibles al cambio del solvente, las constantes de reacción mostraron ser fuertemente dependientes de la polaridad y de la capacidad donora de unión hidrógeno del mismo. Este tipo de dependencia fue el mismo para las cuatro oxopurinas, si bien los valores de las constantes resultaron considerablemente mayores para el ácido trimetilúrico que para las xantinas.

Estos resultados pueden ser explicados proponiendo como etapa primaria a la formación de un exciplexo entre el oxígeno singulete y las oxopurinas mediante un proceso no activado. Este exciplexo puede luego conducir a la desactivación física del oxígeno singulete o evolucionar hacia la formación de un intermediario

zwitteriónico reactivo. La formación de este último intermediario depende fuertemente de la capacidad del solvente para estabilizar al centro aniónico mediante interacciones electrostáticas y formación de uniones hidrógeno.

La propuesta del intermediario zwitteriónico está avalada no sólo por los resultados de los estudios cinéticos, sino también por el hecho de que justifica la formación de los productos de reacción obtenidos.

4.4 Sección experimental.

4.4.1 Reactivos y solventes.

Las xantinas utilizadas (cafeína, teobromina y teofilina) son de alta pureza (Nacalai Tesque Inc. y Eastman Organic Chemicals), y fueron usadas sin purificación adicional. El ácido trimetilúrico, el Rosa de Bengala y el óxido de deuterio (Aldrich Chemical Co. Inc.) fueron usados tal como se los recibió. El meso-difenilheliantreno (AMKO LTI) es de máxima pureza y se utilizó sin purificación previa. Los solventes metanol, etanol, n-propanol y acetonitrilo (J. T. Baker Inc. grado CLAR) fueron controlados por espectrofotometría UV-visible y luego usados sin purificación adicional. El agua fue bidestilada y pasada por filtros Millipore antes de su uso.

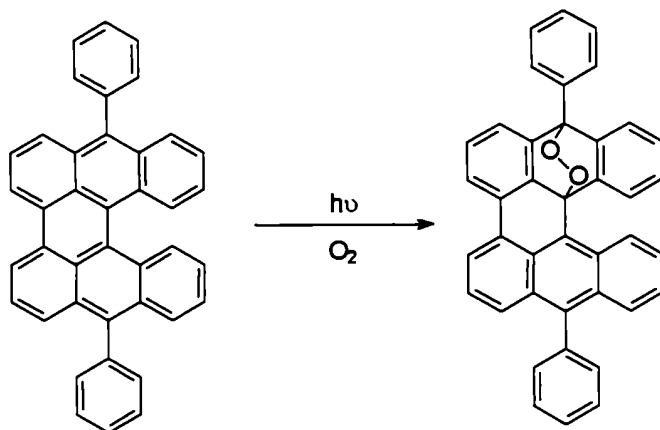
4.4.2 Experiencias realizadas en estado estacionario.

Las experiencias cinéticas se realizaron colocando celdas de 1 mm de paso óptico en un dispositivo de fabricación casera que consta de un posicionador de celdas de dos filas para cuatro celdas cada una, refrigerado por circulación de agua y provisto de un *shutter*. Como fuente de radiación se utilizó una lámpara de mercurio de presión media Hanau TQ-150. Para seleccionar la región útil del espectro de emisión de la lámpara ($\lambda > 500$ nm) se utilizaron filtros Oriel 59500 y Schott 515. Alternativamente se refrigeró la lámpara con una solución acuosa filtrante de $K_2Cr_2O_7$ 0,5 % contenida en un reservorio de 20 dm³ provisto de una bomba sumergible de recirculación (Little Giant). Para evitar el calentamiento de

la mezcla filtrante, se hace pasar la solución tanto a la entrada como a la salida de la camisa refrigerante de la lámpara por tubos refrigerantes sumergidos en hielo. Este método permite optimizar la intensidad de luz incidente. Cuando fue necesario se atenuó la intensidad de luz incidente utilizando filtros de densidad neutra de 25, 50 y 75 % (Thomas Scientific). El consumo de los reactivos se determinó por cromatografía gaseosa y por espectrofotometría UV-visible.

Los espectros de absorción UV-visible se registraron según las características de las muestras, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8451-A o en un Shimadzu 1203. Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-5. Las cromatografías gaseosas se realizaron en un GC-Hewlett Packard 5840-A, utilizando indistintamente columnas capilares HP-5 y HP-17.

La intensidad de luz absorbida se determinó utilizando como actinómetro una solución conteniendo 10^{-3} mol dm^{-3} de *meso*-difenilheliantreno (MDH) en tolueno.⁴⁷ Este compuesto cuando es irradiado con luz visible en atmósfera de aire reacciona mediante una fotooxidación autosensibilizada para dar un endoperóxido estable, cuyo máximo de absorción se encuentra a 429 nm. Midiendo entonces la absorción a esa longitud de onda se puede determinar el grado de conversión del reactivo.^{48,49}



Una solución de *meso*-difenheliantreno (MDH) de concentración 10^{-3} mol dm^{-3} es suficientemente concentrada como para garantizar la absorción total de la luz incidente entre 475 y 610 nm (utilizando una celda de 1 cm de paso óptico). Dentro de este rango de longitudes de onda el producto de reacción no absorbe, por lo tanto se puede escribir la siguiente expresión cinética:

$$da/dt = \dot{a} = -1000 \times I_0 \times \phi_{\text{MDH}} \times \epsilon'_{\text{MDH}} \times a(t) \times [F(E')]^{-1}$$

donde a es la concentración de MDH (mol dm^{-3}), I_0 es el flujo de fotones de la lámpara ($\text{Einstein cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), ϵ'_{MDH} es la absortividad molar del MDH a la longitud de onda de irradiación (donde el producto no absorbe), ϕ_{MDH} es el rendimiento cuántico de la reacción, y $[F(E')]^{-1} = [(1 - 10^{-E'}) / E']$ es el factor cinético. El factor 1000 correlaciona las unidades de volumen (dm^3) y de área (cm^2). Cuando la absorbancia a la longitud de onda de irradiación (E') es alta durante toda la actinometría ($E' > 4$), entonces $[F(E')]^{-1} \approx 1 / E'$. Si toda la superficie de la solución es irradiada, entonces la ecuación se reduce a la siguiente expresión:

$$\dot{a} = -1000 \times I_0 \times \phi_{\text{MDH}} \times 1/d \quad (d = 1 \text{ cm})$$

Dado que la velocidad de consumo de MDH es igual a la velocidad de formación del endoperóxido (MDHPO), el progreso de la reacción puede seguirse midiendo la absorbancia a 429 nm, donde el endoperóxido tiene su máximo de absorción. A esta longitud de onda también hay algo de absorción del MDH, por lo tanto el cambio de concentración sigue la siguiente expresión:

$$dE / dt = \dot{E} = 1000 \times I_0 \times \Phi_{MDH} \times ({}^{429}\epsilon_{MDHPO} - {}^{429}\epsilon_{MDH}).$$

El producto $F_{(429)} = 1000 \times \Phi_{MDH} \times ({}^{429}\epsilon_{MDHPO} - {}^{429}\epsilon_{MDH})$ resulta independiente de la longitud de onda de excitación y fue evaluado por Brauer y col.^{48,49} mediante tres métodos independientes, obteniendo $F_{(429)} = (4,07 \pm 0,05) \times 10^6$ [cm² mol⁻¹]. Por lo tanto, la intensidad de la lámpara puede determinarse usando la siguiente ecuación:

$$I_0 \text{ (Einstein s}^{-1}\text{)} = (F_{(429)} \times \Delta E_{(429)} \times V) / (\Delta t \times d).$$

El procedimiento consistió en determinar en primer lugar la intensidad de luz incidente (I_0) colocando en el portaceldas sólo una celda conteniendo al actinómetro, y midiendo la absorbancia a 429 nm en función del tiempo. En segundo lugar se determinó la intensidad de luz transmitida por la muestra (I_t). Para ello se interpuso entre la lámpara y la celda conteniendo al actinómetro, una segunda celda que contenía a la solución de interés. Finalmente, la intensidad absorbida por la muestra (I_a) se calcula como $I_a = I_0 - I_t$. Todo este procedimiento se realizó en total oscuridad debido a la alta sensibilidad del actinómetro.

Las irradiaciones en escala preparativa se realizaron utilizando la misma lámpara descrita anteriormente, con filtro de $K_2Cr_2O_7$, sumergida en reactores de capacidad variable, y se realizaron con agitación magnética y burbujeo permanente de oxígeno.

La separación de los productos de reacción se realizó por cromatografía de adsorción en columna de silica gel.

Los espectros de masa por impacto electrónico ya sea por introducción directa de muestra o CG-EM se realizaron indistintamente en un espectrómetro de masa TRIO-2 VG acoplado a un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890-S2 o en un espectrómetro de masa Shimadzu QP5000 acoplado a un cromatógrafo Shimadzu 17-A. Los espectros de masa obtenidos por bombardeo con átomos rápidos (FAB) se realizaron en un espectrómetro ZAB-SEQ4F, utilizando glicerol y nitrobenzilalcohol como matrices. Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en un equipo Bruker AC200. Los espectros infrarrojos se realizaron en un equipo Nicolet FT-IR 510P.

4.4.3 Experiencias de láser flash fotólisis.

El equipo utilizado es el mismo que se describió en el capítulo 3 (sección 3.4.6). La única diferencia importante es que para la excitación se utilizó la segunda armónica del mismo láser de Nd:YAG ($\lambda = 532$ nm) y filtros de corte de la longitud de onda adecuada.

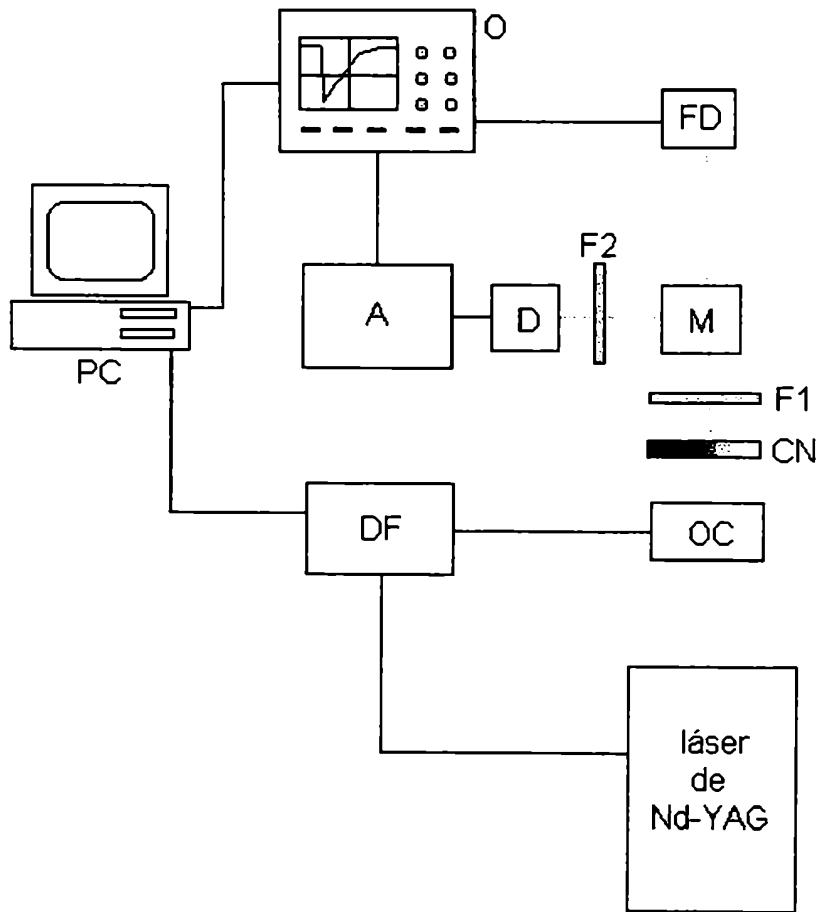
4.4.4 Fosforescencia infrarroja de $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo.

En el esquema 29 se muestra el arreglo experimental utilizado para la detección resuelta en el tiempo de la fosforescencia del oxígeno singulete.

La excitación de las muestras se realiza con un láser pulsado de Nd:YAG operando en su segunda armónica (532 nm) (Spectron Lasers). La repetición de los

pulsos de excitación se controló mediante un obturador cerámico (OC) controlado mediante un divisor de frecuencias (DF) sincrónico con el láser. La energía de los pulsos del láser se varió por atenuación con una cuña de filtro neutro (CN). Además se colocó un filtro de corte de 500 nm (F1) antes de la muestra para minimizar la luz espúrea.

Las soluciones se colocaron en celdas de fluorescencia de cuarzo de 1 cm x 1 cm (M). La detección de la emisión fue realizada a 90° con un fotodiodo de germanio (D) de 5 mm de diámetro (Judson J16-85P-R05M) colocado sobre la pared de la cubeta. Entre la cubeta y el detector se colocó un filtro de silicio (F2) de 1050 nm (Glen Spectra). La salida del detector (D) se amplificó (A) y se registró y promedió en un osciloscopio digital (O) (Hewlett Packard 54502) y luego se almacenó y procesó en una computadora personal (PC). El disparo del osciloscopio se realizó en forma óptica mediante un fotodiodo (FD).



Esquema 29. Equipo de detección resuelta en el tiempo de fosforescencia de oxígeno singlete.

4.5 Referencias.

- (1) Simon M. I. y H. Van Vunakis (1964) The dye-sensitized photooxidation of purine and pyrimidine derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **105** 197-206.
- (2) Morin B. y J. Cadet (1994) Benzophenone photosensitization of 2'-deoxyguanosine: characterization of the 2R and 2S diastereoisomers of 1-(2-deoxy-b-erythro-pentafuranosyl)-2-methoxy-4,5-imidazolidinedione. A model system for the investigation of photosensitized formation of DNA-protein crosslinks. *Photochem. Photobiol.* **60** 102-109.
- (3) Morin B. y J. Cadet (1995) Chemical aspects of the benzophenone-photosensitized formation of two lysine-2'-deoxyguanosine cross links. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 12408-12415.
- (4) Cadet J., M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, S. Raoul y J. L. Ravanat (1994) 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy- β -D-erythro-pentafuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: a novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-Di-O-acetyl-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **116** 7403-7404.
- (5) Ravanat J. L., M. Berger, F. Benard, R. Langlois, R. Ouellet, J. E. Van Lier y J. Cadet (1992) Phthalocyanine and naphthalocyanine photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine: distinct type I and type II products. *Photochem. Photobiol.* **55** 809-814.

-
- (6) Raoul S. y J. Cadet (1996) Photosensitized reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: identification of 1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentafuranosil)cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product. *J. Am. Chem. Soc.* **118** 1892-1898
- (7) Adam W. y A. Treiber (1995) Oxidation of acetylated guanosine by 3,3-disubstituted 1,2-dioxetanes through nucleophilic attack on the peroxide bond: model studies on the oxidative DNA damage by reactive peroxides. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 2686-2693.
- (8) Adam W., C. R. Saha-Möller, A. Schönberger, M. Berger y J. Cadet. (1995) Formation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine in the 1,2-dioxetane-induced oxidation of calf thymus DNA: evidence for photosensitized DNA damage by thermally generated triplet ketones in the dark. *Photochem. Photobiol.* **62** 231-238.
- (9) Adam W., C. R. Saha-Möller y A. Schönberger (1997) Type I and type II photosensitized oxidative modification of 2'-deoxyguanosine (dGuo) by triplet-excited ketones generated thermally from the 1,2-dioxetane HTMD. *J. Am. Chem. Soc.* **119** 719-723.
- (10) Adam W., C. R. Saha-Möller y A. Schönberger (1996) Photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type I and type II photosensitizers. *J. Am. Chem. Soc.* **118** 9233-9238.

-
- (11) Sheu C. y C. S. Foote (1993) Endoperoxide formation in a guanosine derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **115** 10446-10447
- (12) Sheu C. y C. S. Foote (1995) Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative. Formation of dioxetane and hydroperoxide intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 474-477.
- (13) Sheu C. y C. S. Foote (1995) Reactivity towards singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine (“8-hidroxyguanosine”) formed by photooxidation of a guanosine derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 6439-6442.
- (14) Devasagan T. P. A., S. Steenken, M. W. Obendorf, W. A. Schulz y H. Sies (1991) Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* **25** 6283-6289.
- (15) Boiteux S., E. Gajewski, J. Laval y M. Dizdaroglu (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* **31** 106-110.
- (16) Murov S. L., I. Carmichael y G. L. Hug (1993) *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, N.Y.
- (17) Wintgens V., J. C. Scaiano, S. M. Linden y D. C. Neckers (1989) Transient phenomena in the laser flash photolysis of Rose Bengal C-2'ethyl ester C-6 sodium salt. *J. Org. Chem.* **54** 5242-5246.

-
- (18) Murasecco-Suardi P., E. Gassman, A. M. Braun y E. Oliveros (1987) Determination of the quantum yield of intersystem crossing of Rose Bengal. *Helv. Chim. Acta* **70** 1760-1773.
- (19) Lambert. C., T. Sarna y T. G. Truscott (1990) Rose Bengal radicals and their reactivity. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86** 3879-3882.
- (20) Lambert C. R. y I. E. Kochevar (1996) Does Rose Bengal triplet generate superoxide anion? *J. Am. Chem. Soc.* **118** 3297-3298.
- (21) Ebersson L. (1987) *Electron transfer reactions in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
- (22) Lambert C. R. y I. E. Kochevar (1997) Electron transfer quenching of the Rose Bengal triplet state. *Photochem. Photobiol.* **66** 15-25.
- (23) Sawyer D. T. y E. T. Seo (1977) One-electron mechanism for the electrochemical reduction of molecular oxygen. *Inorg. Chem.* **16** 499-501.
- (24) Wilkinson F., W. Phillip Helman y A. B. Ross (1993) Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22** 113-262.
- (25) Cramer L. E. y K. G. Spears (1978) Hydrogen bond strengths from solvent-dependent lifetimes of Rose Bengal dye. *J. Am. Chem. Soc.* **100** 221-227.
- (26) Linden S. M. y D. C. Neckers (1988) Bleaching studies of Rose Bengal onium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **110** 1257-1260.
- (27) Linden S. M. y D. C. Neckers (1988) Tipe I and tipe II sensitizers based on Rose Bengal onium salts. *Photochem. Photobiol.* **42** 543-550.

-
- (28) Rózanowska M., J. Ciszewska, W. Korytowski y T. Sarna (1995) Rose-Bengal-photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **29** 71-77.
- (29) Stiel H., K. Teuchner, A. Paul, D. Leupold y I. E. Kochevar (1996) Quantitative comparison of excited state properties and intensity-dependent photosensitization by Rose Bengal. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **33** 245-254.
- (30) Miklis P., T. Cagin y W. A. Goddard III (1997) Dynamics of Rose Bengal encapsulated in the Meijer dendrimer box. *J. Am. Chem. Soc.* **119** 7458-7462.
- (31) Wilkinson F., W. Phillip Helman y A. B. Ross (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. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24** 663-1021.
- (32) Nonell i Marrugat S. (1988) Photosensitized production and physico-chemical properties of singlet molecular oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ in system of biological importance. Steady-state and time-resolved near-IR phosphorescence studies. *Schriftenreihe des Max-Planck-Instituts für Strahlenchemie*, ISSN 0932-5131.
- (33) Reichardt C. (1979) *Solvent effects in organic chemistry*. Verlag Chemie, Weinheim.
- (34) Marcus Y. (1993) The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chem. Soc. Rev.* 409-416.

-
- (35) Abraham M. H. y R. W. Taft (1993) Hydrogen bonding. Part 26. The colorimetric acidity scale of Laynez. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 305-306.
- (36) Kamlet M. J. y R. W. Taft (1976) The solvathochromic comparison method. I. The b-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. *J. Am. Chem. Soc.* **98** 377-383.
- (37) Kolling O. W. (1992) Hydrogen bond donor acidity parameters for kinetics studies in nonaqueous solvents. *J. Phys. Chem.* **96** 1729-1733.
- (38) Clennan E. L. y K. Nagraba (1988) Additions of singlet oxygen to alkoxy-substituted dienes. The mechanism of the singlet oxygen 1,2-cycloaddition reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **110** 4312-4318.
- (39) Clennan E. L. (1991) Synthetic and mechanistic aspects of 1,3-diene photooxidations. *Tetrahedron* **47** 1343-1382.
- (40) Kearns D. R. (1971) Physical and Chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chem. Rev.* **71** 395-427.
- (41) Manring L. E., R. C. Kanner y C. S. Foote (1983) Chemistry of singlet oxygen. 43. Quenching by conjugated olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **105** 4707-4710.
- (42) Manring L. E. y C. S. Foote (1983) Chemistry of singlet oxygen. 44. Mechanism of photooxidation of 2,5-dimethylhexa-2,4-diene. *J. Am. Chem. Soc.* **105** 4710-4717.
- (43) Liang J. J., C. L. Gu, M. L. Kacher y C. S. Foote (1983) Chemistry of singlet oxygen. 45. Mechanism of the photooxidation of sulfides. *J. Am. Chem. Soc.* **105** 4717-4721.

-
- (44) Saito I. y Matsuura (1980) Formation of superoxide from singlet oxygen. On the use of a water-soluble singlet oxygen source. *J. Am. Chem. Soc.* **103** 188-190.
- (45) Saito I., T Matsuura y K. Inoue (1983) Formation of superoxide ion via one-electron transfer from electron donor to singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **105** 3200-3206.
- (46) Zaklika K. A., B. Kaskar y A. P. Schaap (1980) Mechanisms of photooxidation. 1. Substituent effects on the [2+2] cycloaddition of singlet oxygen to vinyl ethers. *J. Am. Chem. Soc.* **102** 386-388.
- (47) Braslavsky S. E. y H. J. Kuhn (1987) Provisional list of actinometers, IUPAC edn., IUPAC, Mülheim an der Ruhr.
- (48) Acs A., R. Schmidt y H. D. Brauer (1983) Mesodiphenylhelianthrene – The most reactive singlet oxygen acceptor. *Photochem. Photobiol.* **38** 527-531.
- (49) Brauer H. D., R. Schmidt, G. Gauglitz y S. Hubig (1983) Chemical actinometry in the visible (475-610 nm) by *meso*-diphenylhelianthrene. *Photochem. Photobiol.* **37** 595-598.

Resumen y conclusiones generales

Resumen y conclusiones generales.

En el presente trabajo de tesis se han estudiado diferentes aspectos de la fotofísica y la fotoquímica de diversos componentes de la familia de las purinas entre los que se incluyen la purina misma y varios de sus derivados con distintos sustituyentes en la posición 6 (metilo, cloro, amino, hidroxilo y metoxi), dioxipurinas o xantinas tales como la cafeína, la teofilina y la teobromina y una trioxipurina como es el ácido trimetilúrico.

En primer lugar se estudiaron y describieron los espectros electrónicos de absorción en solventes polares de las diferentes xantinas y purinas utilizadas en este trabajo de tesis. En los casos en que esos espectros ya estaban descritos, nuestros resultados fueron coincidentes con los de la literatura.

Se determinó que ninguno de los sustratos estudiados es un eficiente emisor fluorescente a temperatura ambiente y se estableció una cota superior para los rendimientos cuánticos de emisión ($\phi_f < 10^{-3}$). Como consecuencia de estos resultados se estudiaron los espectros de emisión fluorescente y fosforescente de las diferentes purinas y xantinas a 77 K, observándose que para el caso de las purinas, aún a esta temperatura, el rendimiento cuántico de fluorescencia es extremadamente pequeño lo que no permite obtener espectros aceptables con nuestro instrumental. Por otra parte se analizó el efecto de la matriz sobre las intensidades de emisión a bajas temperaturas, observándose que dichas intensidades son fuertemente dependientes de la composición del solvente cuando se utilizan las mezclas etanol-agua. También se analizó el cambio que produce el

agregado de sales inorgánicas sobre las intensidades de emisión, encontrándose que existen dos tipos de efectos:

- a) Un efecto de matriz que implica un mejoramiento en la calidad óptica de la misma y por lo tanto un incremento de las señales de emisión al aumentar la concentración de las sales. Este efecto resultó equivalente para los tres haluros estudiados (KCl, KBr y KI) y para el acetato de plomo.
- b) Un efecto de átomo pesado que conduce a un incremento en las intensidades de fosforescencia. La magnitud de este último efecto es dependiente de la sal empleada y sigue el orden: $\text{KCl} \ll \text{KBr} < \text{KI} < \text{Pb}(\text{AcO})_2$.

Finalmente, se estableció que el agregado de MnCl_2 conduce a una importante disminución de las intensidades de emisión de todos los sustratos estudiados. En el caso de las xantinas se pudo ver que esta disminución es mucho mayor para la fosforescencia que para la fluorescencia, lo que indicaría que el MnCl_2 es más eficiente como desactivante de los estados excitados triplete que como desactivante de los correspondientes estados singulete. Este efecto también podría atribuirse a la formación de algún tipo de complejo entre el Mn^{+2} y las xantinas en su estado fundamental. Sin embargo la ausencia de cambios en los espectros de absorción, emisión y excitación al agregar esta sal a las soluciones de las diferentes xantinas y purinas nos permiten, en principio, considerar a esto como poco probable.

Debido a la baja o nula reactividad que se observó para estos sustratos cuando son irradiados en forma directa y a sus bajos rendimientos cuánticos de emisión fluorescente, se decidió estudiar la desactivación no emisiva de las

moléculas electrónicamente excitadas. Así, utilizando la técnica de espectroscopia optoacústica inducida por láser (LIOAS) se logró determinar el parámetro α (fracción de la energía absorbida que es liberada al medio en forma de calor rápido) para los distintos sustratos. En los casos de la purina y de la 6-metilpurina se obtuvieron valores de $\alpha = 0,38 \pm 0,02$. A partir de este valor de α y estimando las energías de los estados tripletes mediante la técnica de fosforescencia a 77 K se determinó el rendimiento cuántico de cruce intersistemas para ambas purinas, obteniéndose un valor de $\phi_{ci} = 0,88 \pm 0,03$. Para el resto de los compuestos estudiados se obtuvieron valores de $\alpha = 1 \pm 0,05$, lo cual implica que casi la totalidad de la energía absorbida por las moléculas es devuelta al medio en forma de calor en un tiempo inferior a 1 μ s.

Se pudo establecer además, que si bien los estados triplete de la purina y la 6-metilpurina son eficientemente desactivados por el oxígeno molecular, esta desactivación ocurre mayoritariamente debido a un cruce intersistemas inducido por el oxígeno y no por transferencia de energía. Este resultado coincide además con la ausencia de señal de emisión a 1270 nm debida a la fosforescencia del oxígeno excitado singulete.

Por otra parte, se estudió la respuesta optoacústica de las distintas xantinas y purinas utilizando altas fluencias de excitación. Para valores de fluencias superiores a 2000 J m⁻² se observaron desviaciones positivas y negativas de la linealidad según cual fuera el sustrato estudiado. Estas desviaciones se analizaron teniendo en cuenta los espectros de absorción de los estados excitados calculados por modelado molecular (métodos PM3 y ZINDO/S).

Para poder realizar este estudio mediante la técnica LIOAS se debieron establecer nuevas referencias calorimétricas para una zona del espectro electromagnético donde no existía ningún precedente en la literatura, y se extendió además el uso de la 2-hidroxibenzofenona como referencia a 266 nm.

Además de los estudios fotofísicos anteriormente descritos, en este trabajo de tesis se han estudiado las reacciones fotosensibilizadas de tipo I y II de la cafeína, la teofilina y la teobromina. En estos casos los estudios se restringieron a las xantinas en primer lugar porque a diferencia de lo que ocurría con algunas purinas, no existían en la literatura estudios mecanísticos rigurosos sobre estos sustratos, y en segundo lugar porque la alta polaridad de las purinas y la complejidad de las mezclas de reacción tornaban muy dificultosa la separación de los productos de reacción por cromatografía de adsorción en columna para su posterior caracterización.

El estudio de las reacciones de tipo I se realizó empleando a la benzofenona como fotosensibilizador. Para las tres xantinas utilizadas (cafeína, teofilina y teobromina) se aislaron y caracterizaron espectroscópicamente los cuatro productos principales de las reacciones: benzopinacol; difenilcarbinol; 1,1-difenil-1,2-propanodiol y 8-[1-(1-hidroxietil)] xantina.

Los diferentes estudios mecanísticos realizados muestran que las tres xantinas desactivan al estado triplete de la benzofenona, aunque lo hacen por diferentes mecanismos. Mientras que en el caso de la cafeína la desactivación ocurre mediante un cruce intersistemas inducido (es decir, desactivación física), la teofilina actúa como donador de hidrógeno (desactivación química). Para el caso de

la teobromina se detectan ambos procesos. Los cálculos de modelado molecular predicen adecuadamente esta tendencia.

Los procesos de transferencia de energía triplete-triplete y de transferencia electrónica pueden descartarse como procesos primarios de la interacción de la benzofenona excitada con las xantinas por ser estos poco factibles tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético.

Los radicales generados por la abstracción de los hidrógenos de las posiciones 1 y 3 de la teobromina y de la teofilina respectivamente revierten rápidamente a la materia prima por abstracción de un hidrógeno carbinólico del solvente (etanol) generando un radical metilcarbinólico. Estos radicales, junto con los generados por la abstracción de hidrógeno de la benzofenona excitada al solvente se unen rápidamente a los átomos de carbono de la posición C-8 de la cafeína, la teofilina y la teobromina generando un radical intermediario que finalmente conduce al producto principal de la reacción (8-[1-(1-hidroxietil)] xantina).

Finalmente, se estudiaron las reacciones de las xantinas utilizando Rosa de Bengala como sensibilizador. En este caso a los tres sustratos estudiados anteriormente se agregó un cuarto caso, el ácido trimetilúrico. Se realizaron numerosos experimentos cinéticos empleando tanto técnicas de estado estacionario (actinometrías de fotólisis estacionarias en distintas condiciones, efecto isotópico cinético del solvente, etc.) como técnicas con resolución temporal (láser flash fotólisis y detección resuelta en el tiempo de la fosforescencia del oxígeno singulete). Los resultados de estos experimentos constituyen firmes evidencias de que las fotooxidaciones de las oxopurinas estudiadas (cafeína, teofilina,

teobromina y ácido trimetilúrico) sensibilizadas con Rosa de Bengala ocurren mediante un mecanismo de tipo II, siendo el oxígeno singulete el agente oxidante.

Por otra parte, se lograron determinar las constantes cinéticas de los procesos globales de desactivación del oxígeno excitado singulete por parte de las oxopurinas así como las constantes de reacción. Mientras que las constantes globales de desactivación resultaron insensibles al cambio del solvente, las constantes de reacción mostraron ser fuertemente dependientes de la polaridad y de la capacidad donora de unión hidrógeno del mismo. Este tipo de dependencia fue el mismo para las cuatro oxopurinas, si bien los valores de las constantes resultaron considerablemente mayores para el ácido trimetilúrico que para las xantinas.

Estos resultados pueden ser explicados proponiendo como etapa primaria a la formación de un exciplexo entre el oxígeno singulete y las oxopurinas mediante un proceso no activado. Este exciplexo puede luego conducir a la desactivación física del oxígeno singulete o evolucionar hacia la formación de un intermediario zwitteriónico reactivo. La formación de este último intermediario depende fuertemente de la capacidad del solvente para estabilizar al centro aniónico mediante interacciones electrostáticas y formación de uniones hidrógeno.

La propuesta del intermediario zwitteriónico está avalada no sólo por los resultados de los estudios cinéticos, sino también por el hecho de que justifica la formación de los productos de reacción obtenidos.

