

Oxidación de linoleato de metilo con oxígeno singlete generado químicamente por el sistema molibdato de sodio/peróxido de hidrógeno

Oxidation of methyl linoleate with chemically generated singlet oxygen by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system

Carlos Enrique Díaz^{1,2}, Freddy León^{1,2}, Martha Cecilia Daza¹, Fernando Martínez^{2}*

¹Grupo de Bioquímica Teórica. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander A.A 678. Bucaramanga, Colombia.

²Grupo de Oxidación Catalítica. Escuela de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander A.A 678. Bucaramanga, Colombia.

(Recibido el 1 de julio de 2008. Aceptado el 12 de marzo de 2009)

Resumen

Se estudió la oxidación del linoleato de metilo (LM) con el oxígeno singlete (1O_2), generado químicamente por el sistema molibdato de sodio/peróxido de hidrógeno (Na_2MoO_4/H_2O_2), en una microemulsión tipo micela invertida (W/O). El seguimiento de la oxidación del LM se realizó por espectrofotometría UV-Vis, midiendo la absorbancia a 234 nm correspondiente a los hidroperóxidos conjugados. A presión y temperatura ambiente, no se observaron productos de la descomposición de posibles dioxetanos por HPLC y CG-EM, tal y como ha sido sugerido por algunos estudios.

----- *Palabras clave:* Linoleato de metilo, molibdato de sodio/peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, azida de sodio

Abstract

Oxidation of the methyl linoleate with singlet oxygen, generated chemically by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system (Na_2MoO_4/H_2O_2), was studied in a type microemulsion micelle inverted (O/W). The monitoring of methyl linoleate oxidation with singlet oxygen was carried out using a UV-Vis spectroscopy, measuring the absorbance at 234 nm corresponding to the conjugated hydroperoxides. Under room temperature and pressure, products

* Autor de correspondencia: teléfono + 57 + 7 + 655 08 05, fax: + 57 +7 + 655 08 01 correo electrónico: fmartine@uis.edu.co (F. Martínez).

of the decomposition of possible dioxetane were not identified by HPLC and GC-MS, as some studies have suggested.

----- **Keywords:** Methyl linoleate, sodium molybdate/hydrogen peroxide, singlet oxygen, sodium azide

Introducción

La peroxidación lipídica está relacionada con el envejecimiento celular, algunas enfermedades y el deterioro o ranciedad de los alimentos [1, 2], y puede ser iniciada por radicales hidroxilo e hidroperoxilo o por el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) [3-5]. El ácido linoléico, ácido 9,12-octadecadienoico, es un constituyente de las membranas biológicas susceptible de ser peroxidado. La adición del $^1\text{O}_2$ a cualquiera de sus dos dobles enlaces conduce a la abstracción de un átomo de hidrógeno de un grupo $-\text{CH}_2-$ vecino y a la formación de hidroperóxidos, que por efecto de la temperatura y de la luz se descomponen en los aldehídos hexanal y malondialdehído [6, 7]. Debido al carácter electrofílico del $^1\text{O}_2$ puede, también, mediante una cicloadición [2+2] conducir a la formación de dioxetanos que por descomposición producirán los mismos aldehídos [8]. Un aspecto importante en el estudio de la peroxidación lipídica con oxígeno singulete es el poder garantizar que únicamente se genera esta especie reactiva del oxígeno en el medio de reacción. Por lo tanto, la selección del método de producción de oxígeno singulete es crucial. Algunos sensibilizadores generan, además del oxígeno singulete, el radical anión superóxido (O_2^-), [9]. Este radical puede conducir a la formación del radical hidroperoxilo, el ácido conjugado del radical anión superóxido, que también puede ser un iniciador de la peroxidación lipídica. Por tal razón en este estudio, se utilizó el sistema ($\text{Na}_2\text{MoO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) suspendido en una microemulsión tipo micela invertida (W/O) a un pH de 10 para generar $^1\text{O}_2$. La microemulsión (W/O) está compuesta de pequeñas burbujas acuosas, en las que se ubican el MoO_4^{2-} y el H_2O_2 [10, 11]. La descomposición del H_2O_2 en presencia de iones molibdato (MoO_4^{2-}) forma complejos oxotriperoxomolibdato $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$ que por descomposición liberan $^1\text{O}_2$ con una eficiencia del 100% [12]. La vida media del $^1\text{O}_2$ en esta mi-

croemulsión es de 42,4 μs . Se utilizó la detección del endoperóxido-9,10-antraceno por CG-EM como una prueba de atrapamiento químico del $^1\text{O}_2$ generado por la cicloadición [4+2] sobre el antraceno. En la oxidación del linoleato de metilo con el $^1\text{O}_2$ se identificaron, por CG-EM, compuestos carbonílicos e hidroxílicos generados por la reducción de los hidroperóxidos. En las condiciones experimentales usadas no se evidenció la formación de dioxetanos.

Experimentación

Preparación de la emulsión

Se preparó una mezcla de 4,7 g (0,016 moles) de dodecil sulfato de sodio (SDS) con 9,4 g (0,13 moles) de 1-butanol y se agregó a 60 mL (0,93 moles) de diclorometano formando la fase continua de la microemulsión. Luego se adicionó a esta microemulsión 6 mL de una solución 0,2 M de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, gota a gota con agitación constante hasta obtener una emulsión transparente, el pH de la solución fue 10.

Reacción de oxidación del linoleato de metilo

La oxidación de linoleato de metilo y del antraceno se realizó en un balón de fondo redondo de 50 mL, recubierto con papel aluminio, a temperatura ambiente. Se disolvieron 0,2 mmol de LM en 15 mL de la microemulsión (W/O) con agitación magnética durante 10 minutos. Luego se adicionaron en total 600 μL de H_2O_2 (30 V/V%). El peróxido de hidrógeno se adicionó lentamente en alícuotas de 100 μL cada 15 minutos. Como consecuencia de la descomposición de los complejos oxotriperoxomolibdato, $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$, generados en la reacción del H_2O_2 con los iones molibdato se produce $^1\text{O}_2$ con una eficiencia del 100% [12]. El seguimiento de la reacción de peroxidación

del LM se realizó midiendo el cambio de la intensidad de la absorción a 234 nm en un espectrómetro UV-Vis HEWLETT-PACKARD 8453 con arreglo de diodos. Para evidenciar la generación del oxígeno singlete en la microemulsión se utilizó azida de sodio en una concentración de 0,2 mmol, siguiendo el mismo procedimiento de la oxidación anterior [13, 14].

Identificación de los productos de oxidación

Los productos de la oxidación del linoleato de metilo y el endoperóxido del antraceno se aislaron del medio de reacción adicionando 10 mL de agua a la emulsión y separando la fase orgánica. A la fase orgánica se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua. Después se separó el SDS mediante una columna de intercambio aniónico, Amberjet 4200, utilizando como fase móvil diclorometano. Finalmente, los hidroperóxidos en la fase orgánica fueron analizados por HPLC (Agilent con detector de arreglo de diodos) usando como fase móvil metanol: agua(50/50) y una columna C-18 y en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5890, con un detector selectivo de masas, modelo 5972, una columna HP5-MS (30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno) y con una velocidad de flujo de gas de arrastre (He) de 1 mL/min. Una alícuota de 1 µL de la muestra se inyectó con división (1:30). El programa de temperatura se mantuvo durante 5 min en 200 °C, con una velocidad de 10 °C/min hasta 300 °C, durante 15 min, y el tiempo total de análisis fue de 63,33 min. Las condiciones para el detector fueron: 70 eV, impacto electrónico, rango de masas entre 35 y 400 m/z: EM voltaje (A-tune 200 V), frecuencia de barrido 20 Hz y temperatura 230 °C.

Resultados y discusión

Oxidación del antraceno

El endoperóxido-9,10-antraceno es el producto específico de la cicloadición del oxígeno singlete sobre el antraceno (figura1) [15].

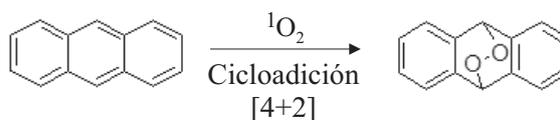


Figura 1 Esquema de cicloadición del $^1\text{O}_2$ sobre el antraceno

En la figura 2 (A) se muestra el cambio en la absorbancia de la banda de 375 nm del antraceno al reaccionar con el oxígeno singlete, y en la figura 2(B) se muestra el efecto inhibitorio de la azida de sodio (NaN_3) en la reacción.

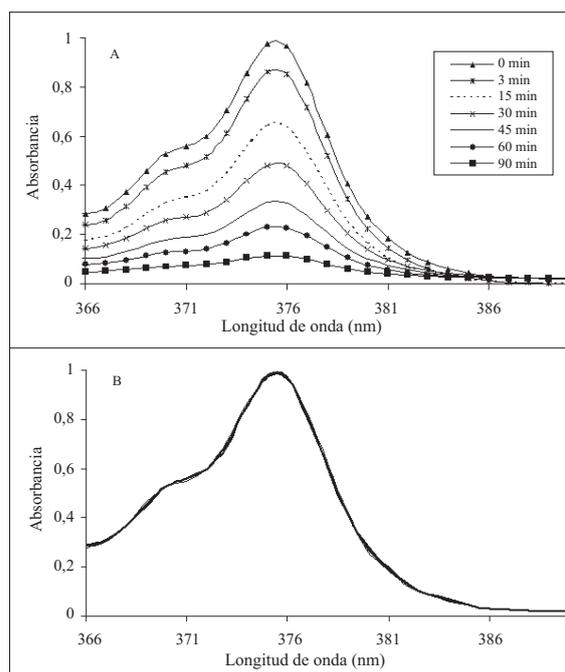


Figura 2 Cambio de la absorción del antraceno en presencia de oxígeno singlete generado por el sistema $\text{Na}_2\text{MoO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. A) sin NaN_3 B) con NaN_3

En presencia de NaN_3 (bloqueador del $^1\text{O}_2$) no se observó cambio en la concentración de antraceno durante los 90 min de adición del peróxido de hidrógeno a la microemulsión, indicando que la azida de sodio desactivó el $^1\text{O}_2$ generado en el medio de reacción, y por lo tanto no se presentó la oxidación del antraceno. El espectro de masas

del endoperóxido-9,10-antraceno formado por cicloadición [4+2] del oxígeno singlete al antraceno se muestra en la figura 3. Su identificación se hizo por la presencia del ión molecular de 210 uma. La pérdida de una molécula de oxígeno a partir del ión molecular ($M-O_2$) indica la presencia del ión $m/z = 178$ (ión más abundante) y por pérdida posterior del grupo C_2H_2 se genera el ión $m/z = 152$.

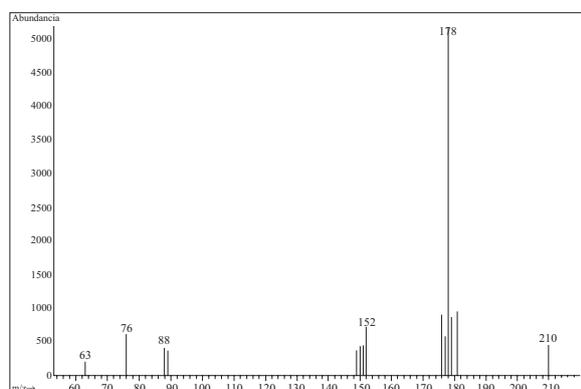


Figura 3 Espectro de masas del endoperóxido-9,10-antraceno

Oxidación del linoleato de metilo (LM)

El oxígeno singlete reacciona con los dobles enlaces del ácido linoleico mediante un mecanismo tipo “ene”, desplazando el doble enlace para formar los siguientes hidroperóxidos alílicos: (1) metil éster del ácido 9-hidroperoxo-*trans*-10-*cis*-12-octadecadienónico, (2) metil éster del ácido 10-hidroperoxo-*trans*-8-*cis*-12-octadecadienónico, (3) metil éster del ácido 12-hidroperoxo-*cis*-9-*trans*-13-octadecadienónico, (4) metil éster del ácido 13-hidroperoxo-*cis*-9-*trans*-11-octadecadienónico (figura 4) [16].

Los hidroperóxidos (1 y 4), en los que el átomo de hidrógeno es abstraído del C11, se detectaron por la presencia de una banda de absorción a 234 nm, debido a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del doble enlace. Los enlaces dobles conjugados de estos hidroperóxidos del linoleato de metilo (1 y 4) absorben en una región entre 200-260 nm y presentan un máximo a 234 nm. Con el incremento de la con-

centración de 1O_2 y del tiempo de reacción, aumenta, también, la concentración de estos hidroperóxidos, lo cual se refleja en la intensidad de la absorbancia a 234 nm.

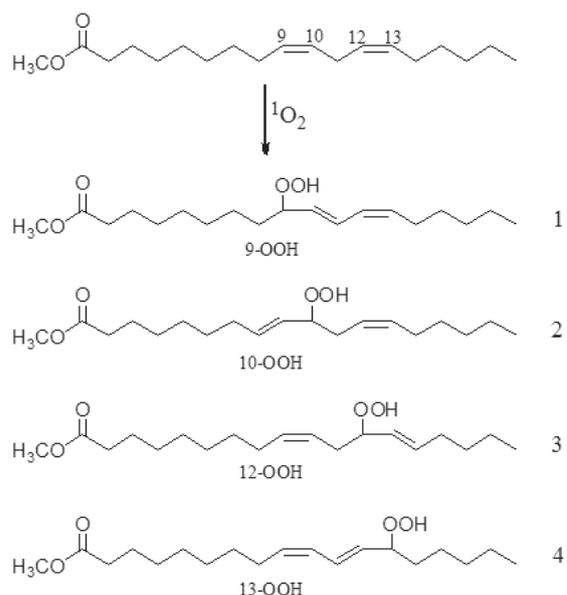


Figura 4 Hidroperóxidos del LM formados en la reacción con oxígeno singlete

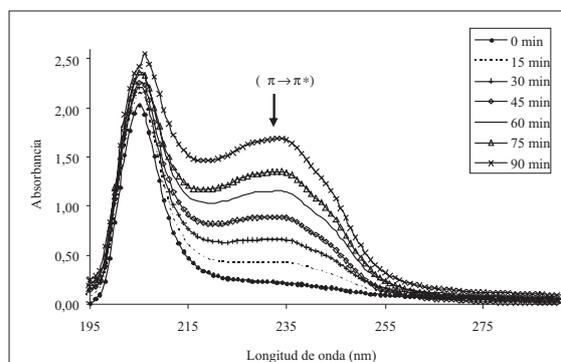


Figura 5 Espectros de absorción del linoletato de metilo y de los hidroperóxidos formados en la reacción con oxígeno singlete generado por el sistema Na_2MoO_4/H_2O_2

En el cromatograma de HPLC, a una longitud de onda de 234 nm, se observa la aparición de

cuatro picos (tiempos de retención: 2.130, 2.226, 2.804 y 3.061), los dos primeros corresponden a los hidroperóxidos dieno conjugados del linoleato de metilo (1 y 4) (Figura 6 A). Los dos isómeros adicionales, según lo reportado por Samadi y colaboradores [17], corresponderían a los isómeros: metil éster del ácido 9-hidroperoxo-*trans*-10-*trans*-12-octadecadienónico y el metil éster del ácido 13-hidroperoxo-*trans*-9-*trans*-11-octadecadienónico, respectivamente. En el cromatograma obtenido a una longitud de onda de 200 nm, se observan los hidroperóxidos 1 y 4, ya que presentan el mismo tiempo de retención (figura 6 B). Los otros dos picos con t_r de 1,943 y 2,392, corresponden a los hidroperóxidos dieno no conjugados (2 y 3), que son específicos de una oxidación con oxígeno singulete.

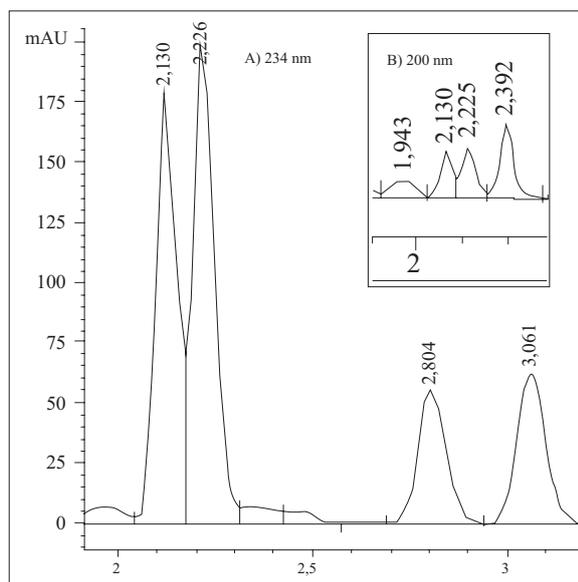
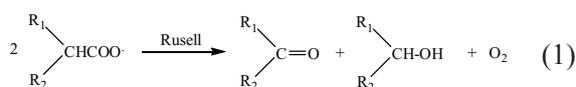


Figura 6 Cromatograma HPLC de los productos de oxidación del linoleato de metilo. A) 234 nm, B) 200 nm

Los productos de la oxidación del LM con 1O_2 no se pudieron identificar por CG-EM directamente, debido a que el enlace O-O de los hidroperóxidos puede sufrir una ruptura en puerto de inyección. Esta ruptura, según la reacción de Russell [18,19], conduciría a la formación de cetonas y alcoholes, ecuación (1):



Otro de los productos de la reacción del oxígeno singulete con enlaces dobles son los respectivos dioxetanos. Estos compuestos sufren una ruptura homolítica, por descomposición térmica, y en el caso del LM se generaría los aldehídos hexanal y malondialdehído [20], los cuales no se observaron en las condiciones de detección usadas.

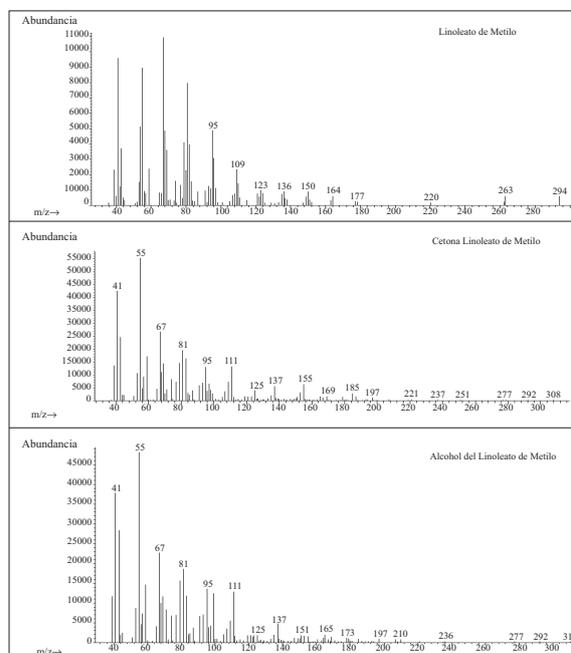


Figura 7 Espectro de masas del linoleato de metilo, del alcohol y su cetona

En la figura 7 se muestran los espectros de masas del medio de reacción y de los productos de la reacción entre el LM y el 1O_2 , la amplia presencia de picos no permite identificar los diferentes alcoholes y cetonas de cada uno de los hidroperóxidos formados (figura 8), ya que al ser isómeros co-eluyen y por lo tanto se encuentran iones fragmentos comunes para los distintos hidroperóxidos como: 308 (M^+), 272 (M^+-OCH_3), 43 (CH_3OC^+), 41 ($O\equiv CCH^+$), para los alcoholes, y 310 (M^+), 279 (M^+-OCH_3), 43 (CH_3OC^+), 41 ($O\equiv CCH^+$), para las cetonas, tal y como se indican en los espectros de masas del alcohol y la cetona respectivos.

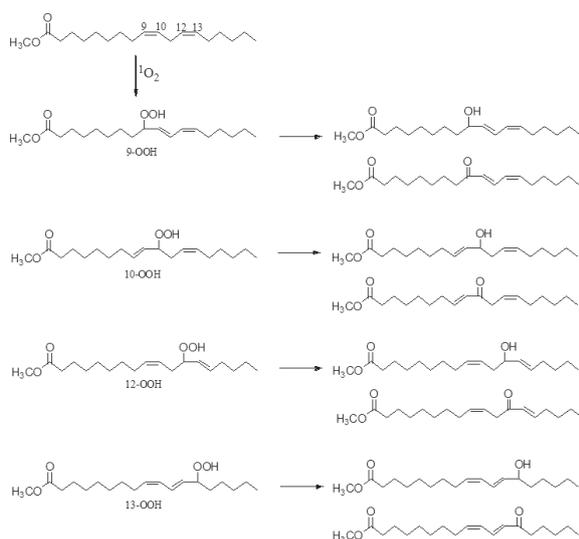


Figura 8 Alcoholes y cetonas provenientes de los hidroperóxidos del linoleato de metilo

Conclusiones

En el presente trabajo, se estudió la peroxidación del linoleato de metilo (LM) con $^1\text{O}_2$, generado por la reacción entre el H_2O_2 con iones molibdato (MoO_4^{2-}). Utilizamos la detección a 234 nm del endoperóxido-9,10-antraceno formado por la reacción del antraceno con el $^1\text{O}_2$ y el efecto inhibitorio de la azida de sodio para demostrar la formación del $^1\text{O}_2$. Identificamos la formación de este endoperóxido por CG-EM. En la reacción del LM con el $^1\text{O}_2$ identificamos la formación de los hidroperóxidos dieno conjugados: metil éster del ácido (9-hidroperoxo-cis-10-trans-12- y 13-hidroperoxo-cis-9-trans-11-) octadecadienóico y sus dos isómeros respectivos, resultado de la adición del $^1\text{O}_2$ al C9 y al C12 y a la abstracción del hidrógeno bisalílico, por el incremento en la absorción a 234 nm. También, identificamos la formación de los hidroperóxidos dieno no conjugados: metil éster del ácido 10-hidroperoxo-trans-8-cis-12-octadecadienóico y metil éster del ácido 12-hidroperoxo-cis-9-trans-13-octadecadienóico, por la presencia de dos picos en la elusión de HPLC a 200 nm, resultado de adición del oxígeno singlete al C9 y al C11. Sin embargo, dadas las condiciones utilizadas como la cromatografía gaseosa y HPLC no fue posible detectar la formación de dioxetanos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, proyecto 1102-05-1692, y por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, proyecto 5138. Carlos E. Díaz agradece a COLCIENCIAS por la beca doctoral. Agradecemos al laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander por la toma de los espectros CG-EM.

Referencias

1. E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi. "Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 338. 2005. pp. 668-676.
2. A. Barschak, C. Marchesan, A. Sitta, M. Deon, R. Giugliani, M. Wajner, C. Vargas. "Maple syrup urine disease in treated patients: Biochemical and oxidative stress profiles". *Clinical Biochemistry*. Vol. 41. 2008. pp. 317-324.
3. J. Yiang, Z. Huang, Q. Zhao, W. Feng. "Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 368. 2008. p. 145-150.
4. G. Bartosz. "Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species". *Clinica Chimica Acta*. Vol. 386. 2006. pp. 53-76.
5. A. Girotti. "Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol. 63. 2001. pp. 103-113.
6. M. Smith, R. Brown, S. Smullin, J. Eager. "Photosensitized peroxidation of lipids: An Experiment Using $^1\text{H-NMR}$ ". *Journal of Chemical Education*. Vol. 74. 1997. pp. 1471.
7. P. Spiteller, W. Kern, J. Reiner, G. Spiteller. "Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid". *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 153. 2001. pp. 188-208.
8. N. Paillous, S. Fery. "Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation". *Biochimie*. Vol. 76. 1974. pp. 355-368.
9. D. Madhavan, K. Pitchumani. "Photoreactions in clay media: singlet oxygen oxidation of electron-rich substrates mediated by clay-bound dyes". *Journal of*

- Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 153. 2002. pp. 205-210.
10. K. Bohme, H. Brauer. "Generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions". *Inorganic Chemistry*. Vol. 31. 1992. pp. 3468.
 11. V. Nardello, S. Bogaerta, P. Alstersb, J. Aubry. "Singlet oxygen generation from H₂O₂/MoO₄²⁻: peroxidation of hydrophobic substrates in pure organic solvents". *Tetrahedron Letters*. Vol. 43. 2002. pp. 8731-8734.
 12. J. Aubry, S. Bouttemy. "Preparative oxidation of organic compounds in microemulsions with singlet oxygen generated chemically by the Sodium molybdate/hydrogen peroxide system". *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 119. 1997. pp. 5286-5294.
 13. C. Schweitzer, R. Schmidt. "Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen". *Chemical Reviews*. Vol. 103. 2003. pp. 1685-1757.
 14. S. Yang, J. M. Lee, J. C. Lee, J. H. Lee. "Effects of riboflavin-photosensitization on the formation of volatiles in linoleic acid model systems with sodium azide or D₂O". *Food Chemistry*. Vol. 105. 2007. pp. 1375-1381.
 15. A. Klein, M. Kalb, M. Gudipati. "New assignment of the electronically excited states of anthracene-9,10-endoperoxide and its derivatives: A critical experimental and theoretical study". *Journal Physical Chemistry A*. Vol. 103. 1999. pp. 3843-3853.
 16. A. Greer. "Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [¹O₂ (¹Δ_g)] in photosensitized oxidation reactions". *Accounts of Chemical Research*. Vol. 39. 2006. pp. 797-804.
 17. A. Samadi, L. Martínez, M. Miranda, I. Morera. "Mechanism of lipid peroxidation photosensitized by tiaprofenic acid: Product studies using linoleic acid and 1,4-cyclohexadienes as model substrates". *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 73. 2001. pp. 359-365.
 18. G. Russell. "Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Alkyl Hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals". *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 79. 1957. pp. 3871.
 19. A. Factor, C. Russell, T. Traylor. "Bimolecular combination reactions of oxy radicals". *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 87. 1965. pp. 3692-3698.
 20. C. Tanaka, J. Tanaka. "Ab initio molecular orbital studies on the chemiluminescence of 1,2-dioxetanes". *Journal Physical Chemistry. A*. Vol. 104. 2000. pp. 2078-2090.