

EL OZONO COMO OXIDANTE DE LIPIDOS BIOLOGICOS:
CAUSAS Y EFECTOS
PARTE A: Química y Generación

Rafael F. Sala Rey y Giuseppe L. Squadrito*

El ozono es un constituyente natural de la atmósfera, se encuentra principalmente en la estratósfera (alta atmósfera), donde se forma y destruye en un proceso fotoestacionario. El ozono estratosférico actúa como un eficiente escudo para la radiación ultravioleta de longitud de onda corta, cuyo deterioro es materia de intenso estudio.

El ozono también está presente en la tropósfera (baja atmósfera). Las principales fuentes naturales del ozono troposférico son las afluencias desde la estratósfera y la producción fotoquímica a partir de los óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles. Ultimamente debido a la emisión de estos gases de fábricas y automóviles en las zonas urbanas se han detectado niveles de ozono muy superiores a los de ocurrencia natural convirtiéndose en un contaminante del aire con efectos dañinos a la vegetación, materiales y a la salud.

En esta primera parte revisaremos la generación y la química del ozono, enfatizando la acción del ozono sobre compuestos orgánicos insaturados, en especial los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos componentes de la membrana celular. En la segunda parte veremos los efectos nocivos del ozono,

* Pontificia Universidad Católica - Sección Química.

su relación con el envejecimiento celular y la formación de lesiones ateroscleróticas, asimismo, se revisarán algunos mecanismos protectivos.

ASPECTOS RELEVANTES DE LA QUIMICA DEL OZONO

1. Generalidades

El ozono es un estado alotrópico del oxígeno, su molécula contiene tres átomos de oxígeno (O_3), tiene un peso molecular de 48 g/mol y un momento dipolar de 0,49-0,58 Debye. Su gravedad específica es 1,65 y presenta una solubilidad en agua de 490 cc/L a 25°C. La estructura del O_3 se indica en la Fig.1:

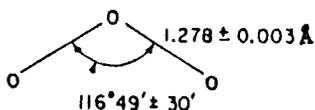


Fig. 1 Estructura del ozono, O_3

El ozono absorbe fuertemente a ciertas longitudes de onda en el infrarrojo, el visible, y en el ultravioleta. Las uniones O-O del O_3 poseen un apreciable carácter de doble enlace, pudiendo describirse como un híbrido de resonancia de cuatro posibles estructuras (Fig. 2), predominando las estructuras (a) y (b).

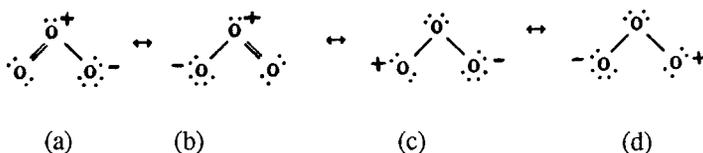


Fig. 2 Estructuras resonantes del ozono

El ozono se prepara generalmente por acción de una descarga eléctrica sobre el oxígeno, pudiéndose obtener por este método concentraciones de hasta un 10% en volumen.

La formación del ozono es sumamente endotérmica



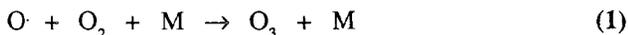
pero a pesar de eso se descompone lentamente recién a los 250°C en ausencia de catalizadores o luz ultravioleta. El ozono gaseoso posee un perceptible color azul y es diamagnético. El ozono puro puede obtenerse por licuefacción fraccionada de mezclas de O₃/O₂. El ozono líquido (p.eb.: -112°C) es de color azul intenso, y es explosivo. El ozono sólido (p.f.: -193°C) posee un color negro violáceo.

El ozono difiere marcadamente del oxígeno molecular en lo que respecta a su reactividad. Aunque el oxígeno se combina prácticamente con todos los elementos, lo hace generalmente a temperaturas elevadas, mientras que el ozono se comporta como un agente oxidante poderoso, reaccionando con numerosas sustancias en condiciones en las que el oxígeno es inactivo. En medio ácido el poder oxidante del ozono es superado solamente por el del F₂ (+3,06V), y algunas otras especies inestables fuertemente oxidantes, encontrándose entre los oxidantes más potentes [1]. El ozono puede reaccionar vía un mecanismo de acción directa involucrando ozono molecular o por un mecanismo indirecto mediante radicales altamente reactivos que provienen de su descomposición, lo cual se verá posteriormente.

2. Generación del Ozono Troposférico

El ozono troposférico se genera básicamente por las infiltraciones desde la estratósfera (12 a 52 Km s.n.m) y la producción fotoquímica a partir de los óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles. La concentración de ozono natural en la tropósfera varía entre 20 y 100 µg/m³ (10⁻² a 5 x 10⁻² ppm en volumen) [2].

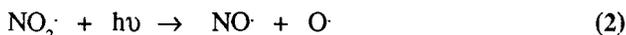
La única reacción significativa de producción de ozono en la atmósfera es aquélla entre el oxígeno atómico y el oxígeno molecular:



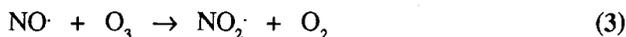
donde M es un tercer agente, como N₂ o O₂, que absorbe el exceso de energía en la reacción y estabiliza al ozono. A elevadas altitudes (encima de 20 km), los átomos de oxígeno son producidos por fotodisociación de oxígeno molecular por radiación en el lejano ultravioleta. A altitudes menores, donde

1. 1 ppm O₃ = 2 mg/m³ (aprox.);
1 mg/m³ (0,001 mg/L) = 0,48 ppm a 25 °C y 1 atm.

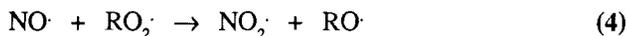
solamente está presente radiación con longitudes de onda mayores a 280 nm., la única producción significativa de oxígeno atómico es de la fotodisociación del NO_2 .



donde el fotón $h\nu$ tiene una longitud de onda entre 280 y 430 nm. El óxido nítrico (NO) producido en esta reacción, reacciona rápidamente con ozono para regenerar NO_2 :



La concentración de ozono puede alcanzar niveles de efectos adversos si otras especies pueden convertir el NO en NO_2 ; compitiendo con el ozono en la reacción (3). Estas otras especies son los radicales peroxilo (RO_2):



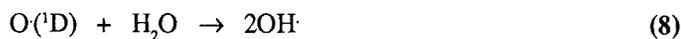
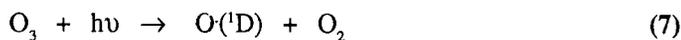
Los RO_2 son formados por la degradación de compuestos orgánicos volátiles, destacando el ataque a los alcanos por parte del radical hidroxilo (5) y la adición de O_2 a los radicales generados por el proceso anterior (6):



Así, la velocidad de generación de ozono está muy relacionada con la velocidad de producción de RO_2 . La estructura química del hidrocarburo determina el número y forma de los radicales RO_2 ; y de aquí, el número de conversiones NO a NO_2 que ocurren mientras el hidrocarburo es oxidado.

Existen tres fuentes principales de radicales OH en la atmósfera urbana soleada: (i) disociación fotoquímica del O_3 , (ii) disociación fotoquímica de compuestos carbonílicos y (iii) disociación fotoquímica de ácido nitroso (HONO).

La disociación fotoquímica del ozono conduce a la formación de átomos de oxígeno excitados $\text{O}(^1\text{D})$, que reaccionan con vapor de agua para formar radicales hidroxilo:



donde $h\nu$ es un fotón de longitud de onda entre 280 y 310 nm.

La disociación fotoquímica de aldehídos (RCHO) conduce a la formación de radicales, los que a través de una serie de reacciones rápidas, llevan por último a la formación de radicales hidroxilo:



donde la longitud de onda del fotón está entre 280 y 360 nm.

La otra fuente importante de radicales OH \cdot es el ácido nitroso (HONO). El ácido nitroso alcanza concentraciones desde 10^{-3} a 10^{-2} ppm en aires polucionados, con niveles máximos de ocurrencia justo antes del amanecer. En la presencia de luz solar el HONO tiene una vida media de cerca de 15 minutos, descomponiéndose por fotólisis según:



proporcionando una fuente de radicales hidroxilo en la madrugada. Su ruta de formación nocturna se piensa que involucra la hidrólisis heterogénea de NO_2 [2,3].

3. Ozonólisis de olefinas

El mecanismo aceptado para la ozonólisis de olefinas simples en fase líquida es el propuesto por Criegee. Se considera la formación de un 1,2,3-trioxolano, (I), el cual se escinde rápidamente para dar un óxido de carbonilo (IIa), conocido como "zwitterión" de Criegee, y un compuesto carbonílico (IIb). En ausencia de un solvente prótico, (IIa) reacciona rápidamente con el compuesto carbonílico para dar un 1,2,4-trioxolano (III), llamado ozónido de Criegee o "moloazónido".

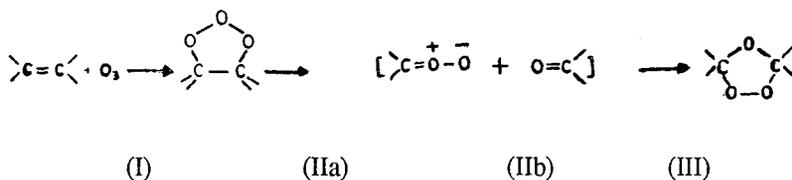


Fig. 3 Ozonólisis de olefinas.

El zwitterión de Criegee (IIa) puede reaccionar con otros compuestos aparte del compuesto carbonílico formado por la ruptura de (I). Los productos finales de ozonólisis dependen de las condiciones de ruptura del molozónido (III). La adición de agua a (III), produce la ruptura formándose dos grupos carbonilos los que pueden degradarse hasta ácidos si la hidrólisis no se da en condiciones reductoras (Fig. 4).

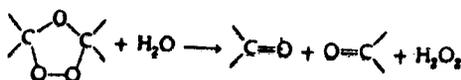


Fig.4 Hidrólisis del molozónido (III)

Una característica secundaria de (IIa) es la capacidad de efectuar reacciones radicalarias, según reporta Sawaki et al.[4]. El zwitterión de Criegee puede describirse como un híbrido de resonancia R de las estructuras R1, R2, R3 (Fig. 5).

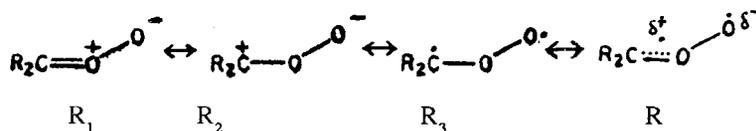


Fig.5 Estructuras resonantes de IIa

Pryor [5] ha presentado evidencia por ESR de la existencia de un precursor de radicales libres en las reacciones de ozonólisis, postulando la formación de una especie trioxídica derivada de la sustracción de hidrógeno alílico de la olefina por el ozono. Así, aunque el proceso tipo Criegee es la principal reacción para monoolefinas, la producción de radicales es una reacción lateral a ser tenida en cuenta.

4. Ozonólisis en medio polar

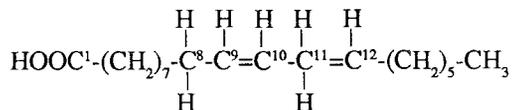
Las reacciones de oxidación iniciadas por el ozono en agua son generalmente bastante complejas; en agua sólo una parte del ozono reacciona directamente con el sustrato disuelto. Otra parte puede descomponerse antes de la reacción dependiendo de un valor crítico de pH. Pasando este valor crítico se producen oxidantes secundarios altamente reactivos, tales como el radical hidroxilo (OH·).

Estos radicales y sus productos de reacción, aceleran la descomposición del ozono, por lo que pueden ocurrir reacciones radicalarias en cadena que consumen ozono concomitantemente a la reacción directa del ozono con los compuestos disueltos [6].

Killops [7] estudió la acción del ozono en metanol y agua sobre el metil oleato, proponiendo que la ozonólisis acuosa produce la fragmentación del enlace metilénico con formación -CHO y -COOH en la posición de la ruptura. Estos resultados serían consistentes con un mecanismo radicalario para la ozonólisis por ataque de grupos OH· en solución acuosa y por grupos MeO· (CH₃O·) en solución metanólica. Sin embargo, Criegge [8] desestima este mecanismo.

REACCIONES DEL OZONO CON LOS LIPIDOS BIOLÓGICOS

Los ácidos grasos insaturados (UFA) y poliinsaturados (PUFA), componentes de los lípidos de la membrana celular son las sustancias propensas a sufrir daño oxidativo de efectos adversos. La facilidad de peroxidación de los UFA y PUFA se deben a la presencia del doble enlace debilitando el enlace carbón hidrógeno de los átomos de carbono adyacentes al carbono con el enlace insaturado. En el ejemplo del ácido linoléico existen dos dobles enlaces entre los átomos de carbono 9, 10, 12, y 13 los átomos de carbono 8 y 11 tienen enlaces débiles con sus átomos de hidrógeno (hidrógenos alílicos).



Estos hidrógenos, están considerados como parcialmente "activados" y la presencia de pequeñas cantidades de iniciadores, producirá una activación

completa. De aquí, el oxígeno molecular y pequeñas trazas de ciertos complejos metálicos, pueden iniciar una reacción rápidamente, por sustracción de los hidrógenos alílicos. Esto deja un centro radical en el carbono α -metileno. Este radical alquilo se vuelve altamente reactivo y puede ocurrir una adición del radical perhidroxi, como se muestra en la Fig. 6. [9].

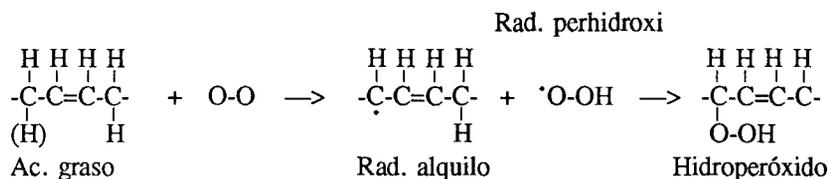


Fig. 6. Peroxidación de ácido graso.

Una forma de medir la oxidación de los PUFA es por la detección de malonaldehído mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) [10]. El malonaldehído es un producto primario de la ruptura de hidroperóxidos durante la oxidación, pudiendo formarse sólo en ácidos grasos con tres o más insaturaciones. Otro parámetro importante en la oxidación de los PUFA es la absorbancia cerca a 235 nm atribuidas a hidroperóxidos diénicos conjugados, los cuales son productos primarios de la autooxidación de lípidos. Los hidroperóxidos conjugados (o dienos conjugados) se formarán en cantidades medibles sólo si se forman radicales libres del ácido graso por sustracción del hidrógeno alílico.

El mecanismo (o mecanismos), mediante el cual el ozono produce daño a los organismos vivos es materia de estudio. La reacción parece involucrar radicales libres pues varios antioxidantes como la vitamina E, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) y ácido p-amino benzóico ejercen un efecto protector [11].

En solución acuosa, encima de pH 5 o 6, el ozono produce radicales hidroxilo (OH)[12]. No ha podido determinarse exactamente si los radicales inducidos por el ozono reaccionan con los ácidos grasos y producen la peroxidación generando más radicales o si la ozonólisis de los ácidos grasos insaturados forma aductos que se descomponen produciendo radicales libres que inician la peroxidación [13].

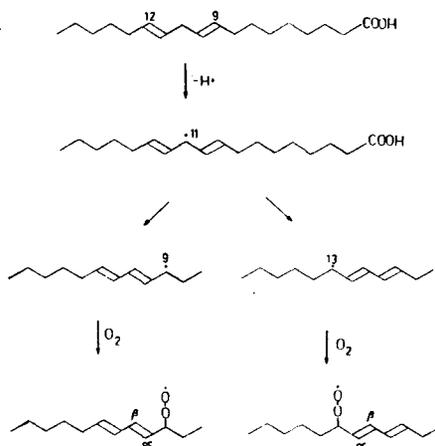


Fig. 7. Formación de hidroperóxidos dienconjugados en durante la autoxidación del ácido linoléico.

Menzel et al. [14] presentó evidencia indicando que el ozono en niveles de ppm se adiciona al doble enlace de los ésteres PUFA para formar ozónidos, siendo ésta la principal reacción de metil linoleato (18:2) y metil linolenato (18:3) puros.

Los ozónidos se detectaron por espectroscopía infrarroja, observándose también, la formación de malonaldehído, pero no de dienos conjugados. Además, refiere que las emulsiones acuosas de ácidos grasos en atmósferas conteniendo ozono se oxidan rápidamente produciendo una mezcla de productos de ozonólisis y de autoxidación, por lo que concluyó que el mecanismo de Criegee era la principal reacción entre el ozono y los ácidos grasos. En este último caso consideró que el zwitterión de Criegee una vez formado, puede ser solvatado por agua para formar hidroperóxidos, los que catalizan las reacciones de peroxidación.

Pryor [11], analizó el efecto del ozono a bajas concentraciones en la autoxidación de metil linoleato (18:2) y metil linolenato (18:3) como modelos de PUFA. Midiendo la formación de material peroxidativo, la generación de dienos conjugados y la formación de materiales reactivos al TBA, Pryor et al. llegaron a las observaciones que se mencionan a continuación:

- 1) La gráfica de los productos de los productos de la reacción versus el tiempo es sigmoïdal, típica de autoxidación (Fig 8).

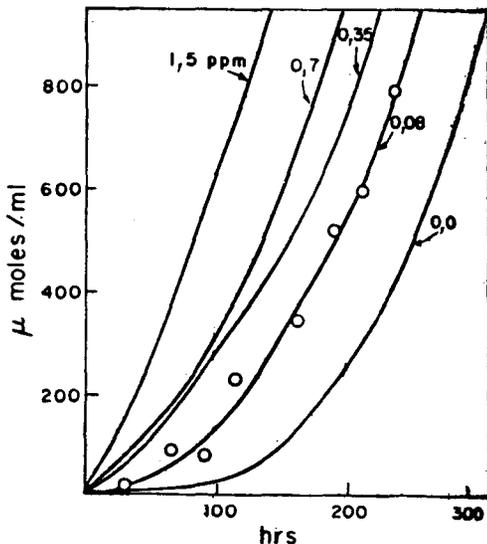


Fig. 8 Formación de material peroxídico desde metil linoleato expuesto a varias concentraciones de ozono.

- 2) La reacción comienza con un período de inducción donde la formación de productos es lenta o no existente. Esto es seguido de un período llamado de autoxidación, donde la velocidad de formación del producto es fija.
- 3) El ozono tiende a acortar el período de inducción, comparando con el aire puro, además se observa que la velocidad de formación de material peroxídico es independiente de la concentración de ozono durante el período de autoxidación.
- 4) La adición de vitamina E modifica el período de inducción pero no tiene efecto durante la fase de autoxidación.
- 5) Durante el período de inducción la velocidad de formación del producto es lineal y es dependiente de la concentración de ozono.

- 6) Durante la fase de autoxidación, la velocidad de formación de los productos (peróxidos, dienos conjugados, o materiales reactivos al TBA), no es función de la concentración de ozono ni de vitamina E. Por lo que se deduce que la cantidad de radicales producidos por el ozono es despreciable respecto a los producidos por la descomposición de hidroperóxidos de los lípidos (LOOH). Es decir, después que se ha alcanzado la concentración suficiente de hidroperóxido, su descomposición inicia la secuencia normal de propagación (Ec. 13 y 14), la cual produce más LOOH y causa que la reacción sea autocatalítica.



El mecanismo molecular responsable para la formación de productos durante el período de inducción aún no está bien comprendido. Es probable que algunos de los "peróxidos" formados durante el período de inducción sean ozónidos y aunque Menzel et al. reportaron evidencia por espectroscopía infrarroja de la formación de ozónidos, otros investigadores no han podido corroborarla [11].

El mecanismo de iniciación de autoxidación por el ozono puede especularse de la siguiente manera: Inicialmente se forma un producto durante el período de inducción, el cual es titulado como peróxido y es producido aun en presencia de inhibidores. Este probablemente sea un ozónido o un peroxiderivado del ozono. De cualquier forma, se descompone o reacciona en una reacción bimolecular (ozono o oxígeno) para formar los "radicales primordiales".

Los radicales primordiales producidos por este proceso inician la formación de algunos hidroperóxidos dienconjugados durante el período de inducción por la cadena de autoxidación usual, pero esta reacción es sostenida por cadenas cinéticas de longitud muy pequeña y son frenadas por los inhibidores de radicales como el tocoferol. Después que los hidroperóxidos han alcanzado concentración suficiente, éstos inician la fase autocatalítica de autoxidación (Ec. 13 y 14). Los hidroperóxidos reaccionan con ozono para producir radicales los que pueden contribuir a la producción de más radicales durante el período de inducción luego de que algo de hidroperóxido se ha formado. Sin embargo, esta reacción no puede producir un número significativo de radicales durante el período de autoxidación, pues se han observado las mismas velocidades para la formación del producto con o sin ozono.

Pryor et al. [15], prosiguieron los estudios sobre el mecanismo de acción del ozono considerando las velocidades de reacción de alquenos modelos de PUFA con ozono en tetracloruro de carbono (CCl_4) y en solución micelar acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS). Es aparente que las constantes de velocidad para estos compuestos son típicas de reacciones de alquenos con ozono, es decir, presentan una cinética de segundo orden (de primer orden en el ozono y en el alqueno). Mientras que las constantes de velocidad determinadas en solventes apróticos son informativas, las soluciones micelares acuosas son mejores modelos del medio ambiente de los sistemas biológicos en los que ocurren estas reacciones.

Resumiendo, el ozono puede reaccionar con los compuestos insaturados básicamente de dos formas: un mecanismo polar (tipo Criegee) generalmente aceptado para condiciones apróticas. Y un mecanismo que involucra la formación de radicales libres en condiciones acuosas donde el ozono induce la formación de radicales que inician la cadena peroxidativa clásica de los compuestos insaturados. Este último mecanismo es el responsable de los efectos nocivos del ozono a nivel biológico, lo cual veremos posteriormente.

BIBLIOGRAFIA

1. Cotton F.A., Wilkinson G., (1981), *Química Inorganica Avanzada*, Segunda Edición. 1981. Ed. Limusa S.A. Mexico.
2. Grennfelt P., Schjoldager J., (1984), *Ambio*, **13**, 61-72.
3. Seinfeld J.H., (1989), *Science*, **243**, 745-742.
4. Sawaki Y. et al., (1981), *J.Am.Chem.Soc.*, **103**, 3832-3838.
5. Pryor W.A. et al., (1983) *J.Am.Chem.Soc.*, **105**, 2883-2888.
6. Hoigne J., Bader H., (1983), *Water Research*, **17**, 173-183.
7. Killops S.D., (1986), *Water Research*, **20**, 167-171.
8. Criegee R., (1975), *Angew.Chem.inter.Edit.*, **14**, 745-752.
9. Demopoulos H.B., (1973), *Federation Proceedings*, **32**, 1859-1861.
10. Dahle L.K., Hill E.G., (1962), *Arch.Biochem.Biophys.*, **98**, 253-261.
11. Pryor W.A. et al., (1976), *Arch.Env.Health.*, **31**, 201-210.
12. Hoigne J., Bader H., (1976), *Water Research*, **10**, 377-386.
13. Balchum O. et al., (1971), *Arch.Env.Health*, **22**, 32-34.
14. Menzel D.B. et al., (1971), *Arch.Env.Health*, **23**, 142-148.
15. Pryor W.A., Giamalva D.H., Church D.F., (1986), *J.Am.Chem.Soc.*, **108**, 6646-6651.