

R. 4502

FD
129

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE BIOLOGIA

PRODUCCION FOTOQUIMICA Y FOTOBIOLOGICA DE PEROXIDO
DE HIDROGENO

Trabajo para optar al grado de Doctor en Biología presentado
por el Licenciado JOSE ANTONIO NAVARRO CARRUESCO.

Sevilla, Julio de 1986

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Miguel A. de la Rosa
Profesor Titular

Francisco F. de la Rosa
Profesor Titular

PONENTE

Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

1-9-86

501

T.D.129

TD
129



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral PRODUCCIÓN FOTOCHEMICA Y
FOTOBIOLOGICA DE PEROXIDO DE HIDROGENO

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- ✓ Consulta en depósito.
- ✓ Préstamo interbibliotecario.
- ✓ Reproducción parcial.
- ✓ Reproducción total.
- ✓ Tipo de Usuarios.
- ✓ Otros términos.

Firmado: José A. Navarro

Sevilla, a 9 de MARZO de 1995

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla durante la dirección del Profesor D. Manuel Losada Villasante, a quien quiero agradecer el haberme acogido en su equipo de investigación, así como su orientación en la realización de este trabajo

Asimismo agradezco profundamente a los Drs. Miguel Angel y Fernando de la Rosa, directores de esta Tesis, su constante interés en mi formación científica y su inapreciable labor en la dirección de este trabajo y en la redacción final del mismo.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento y amistad a D^a Mercedes Roncel por la ayuda humana y científica que me ha prestado en todo momento y que ha sido decisiva para la elaboración de esta Tesis. También quiero agradecer al Dr. Paul F. Heelis, del North E. Wales Institute (Gran Bretaña) el haberme iniciado en la técnica de espectrofotometría de excitación por láser.

Quiero manifestar mi gratitud a los Drs. Manuel Hervás y Agustín González por su amistad, colaboración y apoyo, tanto humano como técnico. Al resto de los miembros de este Departamento, especialmente a D. José M^a Ortega, D. José Moreno y la Dra. Angeles Vargas, les agradezco su paciencia, amabilidad y simpatía.

Asimismo agradezco a INTEROX química, S.A. (Solvay & Cie, Bruselas) —particularmente a los Drs. Mulders, Logan y Leaver— su interés y confianza al subvencionar gran parte de los estudios realizados y por la donación del equipo de espectrofotometría de excitación por láser.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y entidades por su apoyo económico y material: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y Federation of European Biochemical Societies.

A mis padres

a mis amigos

a Cati

INDICE

ABREVIATURAS	8
I. INTRODUCCION	11
II. MATERIALES Y METODOS	43
A. <i>SISTEMAS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS UTILIZADOS COMO FOTORRECEPTORES</i>	44
1. <u>Fotosistemas biológicos</u>	44
1.1. Procedencia del material	44
1.2. Obtención de vesículas tilacoidales	44
1.3. Preparación de vesículas tilacoidales inmovilizadas en agar	45
1.4. Aislamiento de partículas del fotosistema I	45
2. <u>Fotosistemas químicos</u>	47
2.1. Pigmentos utilizados	47
2.2. Inmovilización del rutenio(II)-Tris-(2,2'-bipiridilo) en Nafion	47
B. <i>CELULAS DE REACCION Y CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO</i>	48
1. <u>Células de reacción</u>	48
1.1. Células para los sistemas biológicos	48
1.2. Células para los fotosistemas químicos	50
1.3. Células fotoelectroquímicas	50
2. <u>Condiciones experimentales</u>	53
2.1. Iluminación	53
2.2. Sistemas de gaseo	53
2.3. Control de pH	53
2.4. Temperatura	54
C. <i>DETERMINACIONES ANALITICAS</i>	54
1. <u>Peróxido de hidrógeno</u>	54
2. <u>Oxígeno</u>	56
3. <u>Clorofila</u>	57
4. <u>Lumiflavina</u>	58

5. Rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) 58

D. *TECNICAS EXPERIMENTALES* 58

1. Espectrometría de absorción ultravioleta/visible 58

1.1. Medidas de absorbancia 58

1.2. Espectros de absorción ultravioleta/visible 58

2. Espectrometría de emisión: medidas de luminiscencia 59

3. Espectrometría de excitación por láser 60

3.1. Descripción del aparato 60

3.2. Cálculo de las densidades ópticas 63

3.3. Parámetros cinéticos 64

4. Potenciometría redox 65

4.1. Célula de reacción 65

4.2. Medida del potencial redox 65

E. *REACTIVOS* 67

1. Procedencia de los reactivos 67

2. Preparación de los reactivos 68

III. RESULTADOS 70

A. *PRODUCCION FOTOBIOLOGICA DE PEROXIDO DE HIDROGENO* 71

1. Producción de peróxido de hidrógeno por vesículas tilacoidales de espinaca 71

1.1. Efecto de la adición de distintos mediadores redox 71

1.2. Estudios cinéticos en presencia de riboflavina 73

1.3. Efecto de la introducción de electrones a nivel del fotosistema I 76

1.4. Inmovilización de las vesículas tilacoidales en agar. Producción en un sistema de flujo continuo 79

2. Producción de peróxido de hidrógeno por partículas aisladas del fotosistema I 83

B. <i>PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR SISTEMAS FOTOQUIMICOS ARTIFICIALES</i>	87
1. <u>Producción de peróxido de hidrógeno utilizando varios pigmentos como fotorreceptores</u>	87
2. <u>Producción de peróxido de hidrógeno con sistemas flavínicos</u>	89
2.1. Componentes del fotosistema	89
2.2. Factores que afectan a la eficiencia del sistema	93
2.2.1. Efecto del pH	93
2.2.2. Efecto del dióxido de carbono	95
2.3. Factores que afectan a la estabilidad del peróxido de hidrógeno	95
2.3.1. Efecto del pH	95
2.3.2. Efecto del dióxido de carbono	98
2.3.3. Efecto de los iones metálicos	102
2.4. Estudios sobre el mecanismo del proceso fotoquímico	102
2.4.1. Cambios inducidos por la luz y el oxígeno en el potencial redox de las soluciones	102
2.4.2. Análisis por espectroscopía de excitación con láser	106
2.4.2.1. Identificación de las especies flavínicas implicadas	106
2.4.2.2. Desactivación del estado triplete de la flavina. Efecto del pH y de la adición de semicarbazida	109
2.4.2.3. Oxidación con oxígeno de la flavo-semiquinona	113
2.5. Producción de peróxido de hidrógeno en células fotoelectroquímicas	116
2.5.1. Efecto de la naturaleza de los electrodos	116

2.5.2. Efecto del pH y de los distintos fotossistemas donadores	118
3. <u>Producción de peróxido de hidrógeno con rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) como fotorreceptor</u>	125
3.1. Componentes del fotossistema	125
3.2. Factores que afectan a la eficiencia del sistema	125
3.2.1. Efecto del pH	125
3.2.2. Estabilidad del complejo de rutenio ...	128
3.2.3. Concentración del pigmento y del do- nador de electrones	128
3.3. Inmovilización del complejo de rutenio en Nafion. Producción en un sistema de flujo continuo	134
3.4. Estudios sobre el mecanismo del proceso fotoquímico	136
3.4.1. Efecto de la semicarbazida y del oxí- geno sobre la emisión de fluorescencia del complejo de rutenio	136
3.4.2. Análisis por espectroscopía de exci- tación con láser	139
3.4.2.1. Identificación de las diversas especies implicadas	139
3.4.2.2. Cinéticas de desactivación del es- tado de triplete. Efecto del oxígeno y de la concentración de hidro- xilo	142
3.4.2.3. Oxidación por oxígeno del complejo rutenio(I)-Tris(2,2'-bipiridilo)	149
3.4.2.4. Reducción con semicarbazida del com- plejo rutenio(III)-Tris(2,2'-bipi- ridilo)	149
IV. DISCUSION	154
V. CONCLUSIONES	191
VI. BIBLIOGRAFIA	196

ABREVIATURAS

A	absorbancia
Asc	ascorbato
ATP	adenosín trifosfato
CMU	3-(p-clorofenil)-1,1-dimetilurea
chl	clorofila
DPIP	diclorofenol indofenol
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
E°	potencial normal de óxido-reducción
ΔE	diferencia de potencial entre el estado excitado y el fundamental
e^{-}	electrón
ϵ	coeficiente de extinción
F	flavina oxidada en su estado basal
F*	flavina oxidada en su estado excitado triplete
Fd	ferredoxina
$F^{\cdot-}$, FH^{\cdot}	formas ácido-base de la flavosemiquinona
$FH^{\cdot-}$, FH_2	formas ácido-base de la flavohidroquinona
FMN	flavínmononucleótido
g	aceleración de la gravedad
ΔG	incremento de energía libre
h	constante de Planck
HA	hidroxilamina
I	intensidad de emisión de luminiscencia en presencia de un agente amortiguador
I_0	intensidad inicial o basal
I'_0	incremento de la intensidad inicial a tiempo cero
I'_t	incremento de la intensidad inicial a tiempo t
k	constante de velocidad de primer orden de la reacción de desaparición del estado excitado

k_0	constante de velocidad de (pseudo)-primer orden de la reacción de desaparición del estado excitado
k_q	constante de velocidad de la reacción bimolecular entre el estado excitado de un pigmento y un agente amortiguador
K_{sv}	constante de Stern-Volmer
LF	lumiflavina
λ	longitud de onda
MV	metilviológeno
ν	frecuencia
NAD^+	nicotinamín adenín dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamín adenín dinucleótido reducido
$NADP^+$	nicotinamín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
N_0	moléculas excitadas de un pigmento a tiempo cero
N_t	moléculas excitadas de un pigmento a tiempo t
1O_2	oxígeno singlete
PC	plastocianina
PMS	fenazina metosulfato
PQ	plastoquinona
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
P700	molécula de clorofila del fotosistema I
P680	molécula de clorofila del fotosistema II
$*Ru(bipi)_3^{2+}$	Ru(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) en su estado excitado
$Ru(bipi)_3^{n+}$	Ru(n)-Tris(2,2'-bipiridilo)
τ	tiempo de vida
SC, SCH^+ , SCH_2^{2+}	formas ácido-base de la semicarbazida
SC_{ox}	productos de la oxidación de la semicarbazida
S_0	singlete basal
S_1	primer singlete excitado
S_2	segundo singlete excitado

TEOA trietanolamina
TES sulfonato de N-Tris(hidroximetil)metil-2-
aminoetano
T₁ primer triplete excitado
TMPD N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina
Tris Tri-(hidroxi-metil)aminometano

I. INTRODUCCION.

La crisis energética desencadenada al comienzo de los años setenta es un hecho que, aún hoy, preocupa a las sociedades desarrolladas y, de manera especial, a las comunidades científica y política, directamente enfrentadas al problema de la falta de energía y, consecuentemente, de alimentos. La limitada disponibilidad de los recursos energéticos, por una parte, así como la alta velocidad de consumo de las reservas de combustibles fósiles, por otra, han llevado a los países desarrollados a plantearse la búsqueda de fuentes alternativas de energía que sean, a la vez, económicas, limpias y, sobre todo, renovables. Sin embargo, y a pesar del gran esfuerzo realizado, el uso de la energía solar, nuestra más abundante y renovable fuente energética, se ha extendido sólo marginalmente en los últimos años.

Conviene recordar que prácticamente toda la energía que el hombre ha venido consumiendo a lo largo de su historia procede, en último término, de la energía luminosa que nos llega del sol, energía que es directamente transformada en energía química por las plantas y algas verdes a través del proceso conocido como fotosíntesis. En el transcurso de este proceso la energía solar es aprovechada para provocarla rotura (fotólisis) de la molécula de agua y obtener, utilizando el poder reductor derivado del agua, diversas sustancias reducidas de alto contenido energético. Resulta, por tanto, de gran interés aprovechar el evolucionado aparato fotosintético vegetal para la producción de compuestos energéticos o de interés práctico, así como desarrollar sistemas artificiales capaces de imitar el proceso que los organismos fotosintéticos llevan a cabo en sus cloroplastos, convertidores energéticos de gran eficiencia.

La fotosíntesis vegetal tiene a su favor los muchos millones de años de que las plantas dispusieron para desarrollar complejas moléculas, ancladas en estructuras macromoleculares igualmente complejas, con el único y fundamental objetivo de llevar a cabo reacciones específicas de fotocon-

versión con eficiencias que fueran óptimas para su propia su pervivencia. Los sistemas artificiales, sin embargo, pueden llegar a ofrecer una mayor eficiencia y flexibilidad, al menos a priori, además de contemplar la posibilidad de "dirigir" su funcionamiento a la producción de combustibles y otros pro ductos específicos de interés. El estudio de los mecanismos de fotoconversión —un área multidisciplinar en la que conver gen biólogos, químicos y físicos— permite albergar fundadas esperanzas respecto al descubrimiento de nuevos sistemas mo leculares que permitan el eventual desarrollo de los fotorre actores necesarios para captar la energía solar limpia y efi cientemente.

La radiación solar tiene su origen en la reacción de fusión termonuclear del hidrógeno que, a la temperatura de 10-15 millones de grados, tiene lugar en el interior del sol. Como consecuencia de la misma, el sol aniquila su masa a razón de casi un millón de toneladas por segundo, masa que, según la conocida ecuación de Einstein $E = mc^2$, se transforma en una energía del orden de 10^{26} J s^{-1} . No obstante, tan sólo una milmillonésima parte de esta energía, es decir, 10^{17} J s^{-1} o, lo que es lo mismo, 10^{17} W , alcanza la superficie terrestre. Gran parte de esta radiación es devuelta por reflexión al espacio exterior o selectivamente absorbida por diversos gases de la atmósfera (oxígeno, ozono, nitrógeno, dióxido de carbono, vapor de agua), de tal modo que, después de un simple tránsito vertical a través de la atmósfera, la energía solar que incide sobre la superficie terrestre es del orden de 1 kW m^{-2} (Guerrero y Losada, 1983; Slesser y Lewis, 1979).

La distribución espectral de la energía radiante emitida por el sol es bastante amplia. El espectro solar pre senta, al llegar a la superficie de nuestro planeta, un 51% de radiación infrarroja, un 40% visible y un 9% ultravioleta. La máxima irradiancia (energía por unidad de área y tiempo) se alcanza en la zona del verde, alrededor de los 500 nm, mien

tras que la máxima densidad de flujo fotónico (número de fotones por unidad de área y tiempo) aparece en la región del rojo-naranja, entre 600 y 700 nm. Así pues, aunque a la superficie de nuestro planeta llega un número superior de fotones rojos, el mayor contenido energético de los fotones verdes hace que el máximo de irradiancia se desplace hacia longitudes de onda menores (Almgren et al., 1977).

De toda la energía que llega a la biosfera como radiación solar ($10^{17} \text{ W} = 3 \times 10^{24} \text{ J año}^{-1}$), tan sólo una milésima parte ($10^{14} \text{ W} = 3 \times 10^{21} \text{ J año}^{-1}$) es fijada por el reino vegetal, si bien esta energía es un orden de magnitud mayor que el consumo energético total de la humanidad ($10^{13} \text{ W} = 3 \times 10^{20} \text{ J año}^{-1}$) y 200 veces mayor que la energía consumida por la humanidad como alimento ($5 \times 10^{11} \text{ W} = 1,5 \times 10^{19} \text{ J año}^{-1}$). También resulta interesante destacar que la energía que actualmente se encuentra almacenada en forma de biomasa (o material celular) en nuestro planeta es del orden de $3 \times 10^{22} \text{ J}$, cantidad equivalente a nuestras reservas comprobadas de combustibles fósiles (Guerrero y Losada, 1983; Hall, 1982). Estimaciones recientes, sin embargo, permiten asegurar que las reservas de combustibles fósiles en nuestro planeta pueden alcanzar una cifra de hasta $3 \times 10^{23} \text{ J}$ (Guerrero y Losada, 1983).

En principio, pues, y atendiendo tan sólo a la magnitud de la energía fijada por el reino vegetal, se puede afirmar, sin lugar a dudas, que la totalidad de los requerimientos energéticos, e incluso alimentarios, de la humanidad pueden ser satisfechos por el propio proceso fotosintético natural. La realidad, sin embargo, es bien distinta a causa de graves limitaciones prácticas que dificultan la consecución de este objetivo. Si tenemos en cuenta que la eficiencia de la fotosíntesis realizada por las plantas y otros organismos rara vez excede del 1% sobre la base de un año completo—esto es, tan sólo el 1% de la energía solar incidente sobre la planta queda almacenada en compuestos energéticos estables (Hall et al., 1985)—, resultan lógicos los esfuerzos que, con

objeto de aumentar el rendimiento fotónico del proceso, se vienen realizando para tratar de diseñar sistemas fotoquímicos artificiales que simulen las reacciones fotosintéticas biológicas y carezcan de las limitaciones fisiológicas y agronómicas de los organismos naturales (Bolton, 1978; Bolton y Hall, 1979).

El aprovechamiento de la energía solar desde el punto de vista químico y biológico se está encaminando fundamentalmente hacia tres vías diferentes, según se esquematiza en la Figura 1. En primer lugar, se pretende desarrollar especies agrícolas más rentables y con menos requerimientos nutricionales que sean capaces de alcanzar una mayor eficiencia en la conversión de la energía luminosa en material celular (biomasa), el cual puede utilizarse como alimento para el ganado o para el hombre o como fuente de energía (electricidad, calor, etc.) (Wise, 1981). En esta misma línea se encuentra la reciente introducción de cultivos no tradicionales, de algas o microorganismos fotosintéticos, que pueden ser utilizados como fuente rica en proteínas —single cell proteins— (Goldman, 1979). Hay también que señalar el cultivo de algunas especies vegetales acumuladoras de determinados productos energéticos que pueden ser utilizados directamente como combustibles de calidad (Aaronson et al., 1980; Ben-Amotz y Avron, 1980; Mislin y Bachofen, 1982; Tel-Or et al., 1980).

La segunda opción se refiere a la utilización de sistemas semisintéticos en los que se emplean cloroplastos enteros extraídos de células vivas (Cuendet y Grätzel, 1982; Krishna y Hall, 1979), o bien simplemente moléculas de clorofila en solución o en soportes adecuados, capaces de funcionar como células fotoelectroquímicas generadoras de una corriente eléctrica (Krasnovsky et al., 1982; Miyasaka et al., 1978). Con el desarrollo de estos sistemas se pretende aprovechar las ventajas que proporciona el uso del evolucionado aparato fotosintético vegetal a la vez que evitar los inconvenientes que implica el manejo de organismos completos.

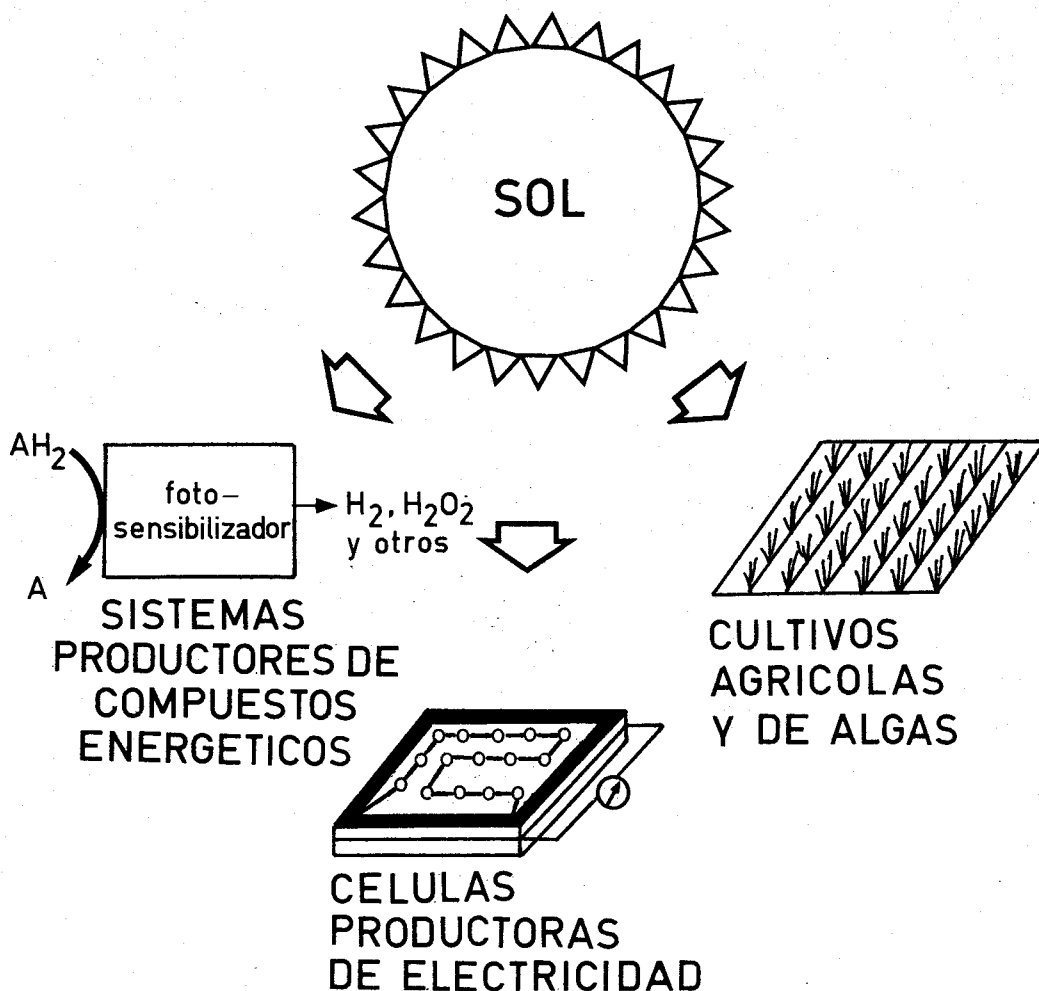


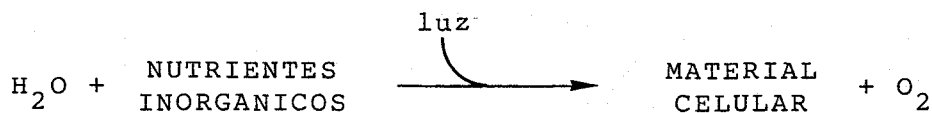
Figura 1. Sistemas químicos y biológicos de aprovechamiento de la energía solar.

Desde un punto de vista práctico, el aprovechamiento de la energía solar por sistemas químicos y biológicos se ha orientado, básicamente, en tres direcciones. Por una parte se intenta aumentar el rendimiento de los cultivos agrícolas tradicionales, así como introducir nuevas técnicas para el cultivo masivo de microalgas. La segunda opción se refiere al uso de sistemas semisintéticos, capaces de funcionar como células fotoelectroquímicas productoras de electricidad. La última línea de trabajo implica el diseño de sistemas fotoquímicos, artificiales o biológicos, productores de compuestos energéticos.

Por último, otra línea de investigación, de gran interés en la actualidad, es la conversión directa de la energía solar en energía química para la producción de compuestos de especial interés para el hombre. Estos sistemas, ya sean biológicos o artificiales, son capaces de llevar a cabo un tipo simplificado de fotosíntesis que se traduce en la producción específica de determinados compuestos energéticos, como pueden ser el hidrógeno, el amoníaco, el peróxido de hidrógeno, el metano y otros (Grätzel, 1983; Mislin y Bachofen, 1982).

A continuación analizaremos con más detenimiento esta última alternativa —es decir, la utilización de fotosistemas químicos y biológicos para la conversión y almacenamiento de la energía luminosa—, dentro de la cual se encuadra el trabajo desarrollado en esta Tesis.

Desde el descubrimiento de la fotosíntesis por el inglés Priestley en 1771, han transcurrido más de dos siglos durante los cuales el concepto de la misma ha experimentado una continua evolución, resaltando cada vez más su carácter de proceso de conversión de energía. En la fotosíntesis, la energía radiante suministrada por el sol es utilizada principalmente para la reducción del dióxido de carbono a carbohidrato, aunque también el nitrato, el nitrito y el nitrógeno molecular son fotoquímicamente reducidos a amonio, así como el sulfato y el sulfito a sulfuro (Losada, 1979). Se trata, pues, de un proceso endergónico de óxido-reducción promovido por la luz, en el que los electrones necesarios para la reducción de los sustratos oxidados provienen, en último término, del agua:



El proceso fotosintético se lleva a cabo en dos fases que actúan independientemente pero de forma se-

cuencial. La primera fase —la única promovida por la luz y, por consiguiente, auténticamente fotoquímica— tiene la doble función de producir el poder reductor (NADPH y ferredoxina reducida, con potenciales redox muy negativos, del orden de $-0,3$ y $-0,4$ V) y el poder energético (ATP, molécula cuya hidrólisis libera gran cantidad de energía) que serán utilizados en la segunda fase (Arnon, 1971). Es en esta primera fase donde tiene lugar la fotooxidación del agua, con la concomitante liberación de oxígeno, y también donde se produce la captación y conversión de la energía solar en energía química, en forma de energía redox y de enlace. La segunda fase, que no necesita de la luz y es por ello conocida como fase oscura de la fotosíntesis, abarca todas aquellas reacciones en las que las moléculas inorgánicas antes citadas (CO_2 , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , ...), de poco valor energético, son reducidas por los electrones procedentes del NADPH o de la ferredoxina reducida. Es en los compuestos reducidos resultantes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) donde queda finalmente almacenada la energía solar.

La fase luminosa de la fotosíntesis no transcurre en un solo acto —salvo en la fotosíntesis no-oxigénica o bacteriana—, sino que requiere la acción secuencial de dos sistemas captadores de la energía luminosa: el fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII) (Duysens y Ames, 1962; Losada et al., 1961). El pigmento transductor de energía en ambos sistemas es una molécula de clorofila a, pero mientras la clorofila del PSI absorbe luz roja lejana de 700 nm, la del PSII capta fotones del rojo cercano de 680 nm. La forma de actuar de ambos fotosistemas ha dado lugar al conocido esquema en "Z" de la fotosíntesis, tal como se muestra en la Figura 2. La absorción de un fotón por el PSI promueve la subida de un electrón desde el potencial de $+0,6$ V, que corresponde al potencial basal de la molécula de clorofila del fotosistema I (P700/P700^+), al nivel de $-1,0$ V, correspondiente al potencial redox del pigmento excitado ($\text{P700}^*/\text{P700}^+$). A

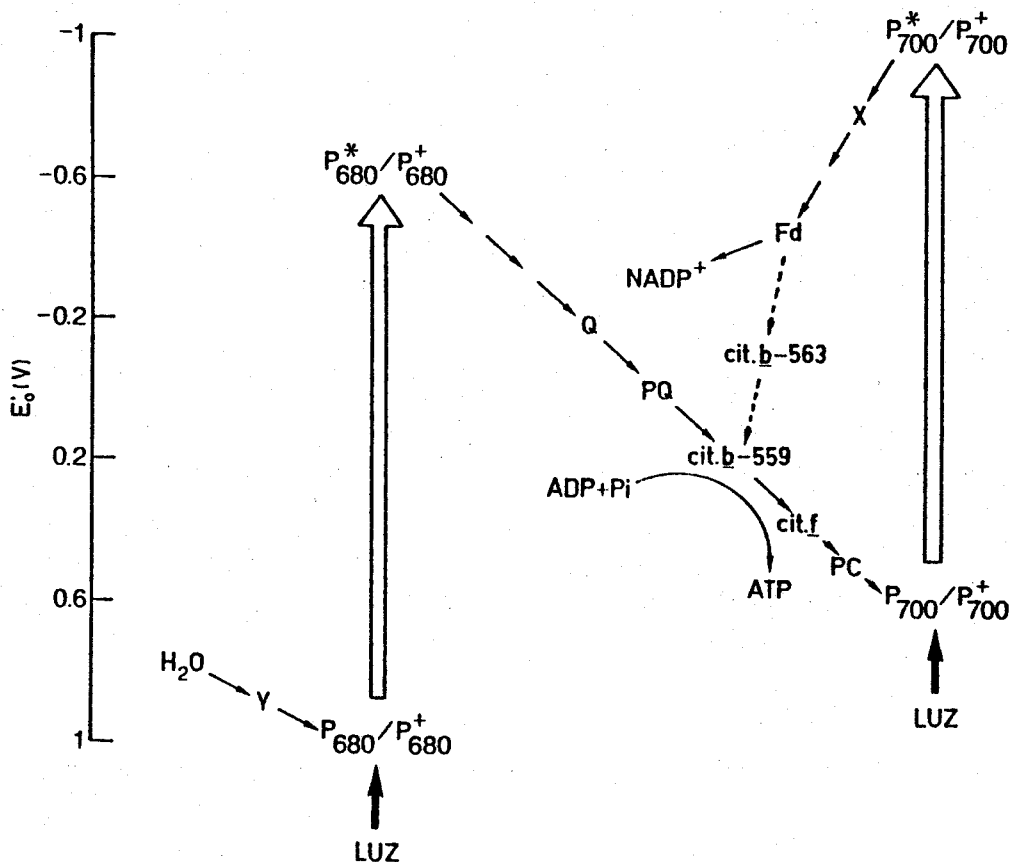


Figura 2. Esquema en "Z" de la fase luminosa de la fotosíntesis.

La luz incide en el centro de reacción (P_{680}) del fotosistema II promoviendo la subida contra potencial de electrones, que son cedidos a un aceptor primario Q. Este aceptor reducido, a través de una serie de transportadores de electrones, reduce al centro de reacción (P_{700}) del fotosistema I. La luz absorbida por este fotosistema produce la transferencia de electrones desde el P_{700} hasta un componente X, que a su vez reduce, a través de varios transportadores de electrones, al $NADP^+$. En un paso intermedio los electrones pueden desviarse de nuevo a la cadena de transporte electrónico entre fotosistemas (flujo cíclico), donde la energía liberada en su caída a favor de potencial se emplea en la síntesis de ATP.

continuación, el electrón se transfiere a la ferredoxina y, eventualmente, al NADP^+ . El déficit electrónico creado por la actuación del fotosistema I esequilibrado por el aporte continuo de electrones desde el fotosistema II, donde un fotón absorbido por el P680 determina la subida de un electrón desde el potencial basal de $+1,0 \text{ V}$ ($\text{P680}/\text{P680}^+$) hasta el potencial excitado de $-0,6 \text{ V}$ ($\text{P680}^*/\text{P680}^+$). El electrón, así elevado a niveles más reductores, es seguidamente transferido al fotosistema I a través de una cadena de conexión formada por varios mediadores redox. Finalmente, los electrones necesarios para cubrir el déficit del PSII son suministrados por el agua, que libera oxígeno en su oxidación.

Al analizar en profundidad el proceso fotosintético, se puede advertir que el punto clave del mismo radica en la elevación del nivel energético de los electrones extraídos del agua. Una vez que los electrones han alcanzado el potencial de la ferredoxina reducida o del NADPH , su utilización en reacciones posteriores se puede considerar secundaria desde el punto de vista de la conversión de la energía solar. De hecho, el aparato fotosintético vegetal se ha manipulado en el laboratorio en el sentido de "dirigir" los electrones fotoexcitados hacia, por ejemplo, la reducción de protones para producir hidrógeno o la reducción del oxígeno para producir peróxido de hidrógeno. De esta forma, el propio aparato fotosintético natural puede ser utilizado para la producción de combustibles u otros compuestos de especial interés para el hombre (Rehm y Reed, 1984).

La producción fotobiológica de hidrógeno por membranas fotosintéticas aisladas (cloroplastos enteros o vesículas tilacoidales) es actualmente una de las líneas de más intensa investigación en el área de la fotobiología aplicada (Cammack *et al.*, 1985; Rao y Hall, 1983; Rao y Hall, 1984). La producción de hidrógeno molecular se consigue acoplado al sistema biológico ciertos intermediarios redox (ferredoxi

na, flavodoxinas, NAD^+ , metilviológeno) capaces de aceptar electrones al nivel reductor del fotosistema I y cederlos, posteriormente, a catalizadores adecuados (hidrogenasa, platino disperso o coloidal) que, como se puede ver en la Figura 3, reducen los protones a hidrógeno (Braun, 1983; Cammack et al., 1985; Weaver et al., 1980). El donador terminal de los electrones puede ser la propia molécula de agua o algún donador exógeno, como el ascorbato o la cisteína (Muallen y Hall, 1982; Rao y Hall, 1983).

Otros ejemplos interesantes de fotosíntesis biológica dirigida —si bien en estos casos la manipulación no se realiza directamente sobre el aceptor primario del PSI, sino en reacciones metabólicas posteriores— son la producción de aldehídos, alcoholes e, incluso, hidrocarburos, por reducción del dióxido de carbono (Rehm y Reed, 1984).

El mayor problema práctico que plantean los fotosistemas biológicos es el de su baja capacidad para mantener una alta eficiencia durante un período prolongado de tiempo a causa de su baja estabilidad. Esto es así debido a que la estabilidad estructural y funcional de la membrana fotosintética se mantiene in vivo gracias a la continua regeneración y recambio de sus componentes químicos, lo que no es posible en sistemas in vitro. Esta falta de estabilidad es la causa de que en los sistemas productores de hidrógeno con cloroplastos aislados, por ejemplo, la capacidad de producción del compuesto cese a corto plazo debido a la pérdida de la actividad de rotura de agua asociada al fotosistema II, la parte más inestable del sistema biológico (Gisby et al., 1982; Morris et al., 1982; Santos y Hall, 1982). Con objeto de aumentar la estabilidad de los cloroplastos se han desarrollado estrategias tales como la inmovilización o el microencapsulamiento en geles o matrices de diferente naturaleza —glutaraldehído, poliacrilamida, gelatina, agar, alginato (Cocquempot et al., 1981; Gisby y Hall, 1980; Rao y Hall, 1984)—, que además constituyen soportes idóneos para construir sistemas heterogéneos

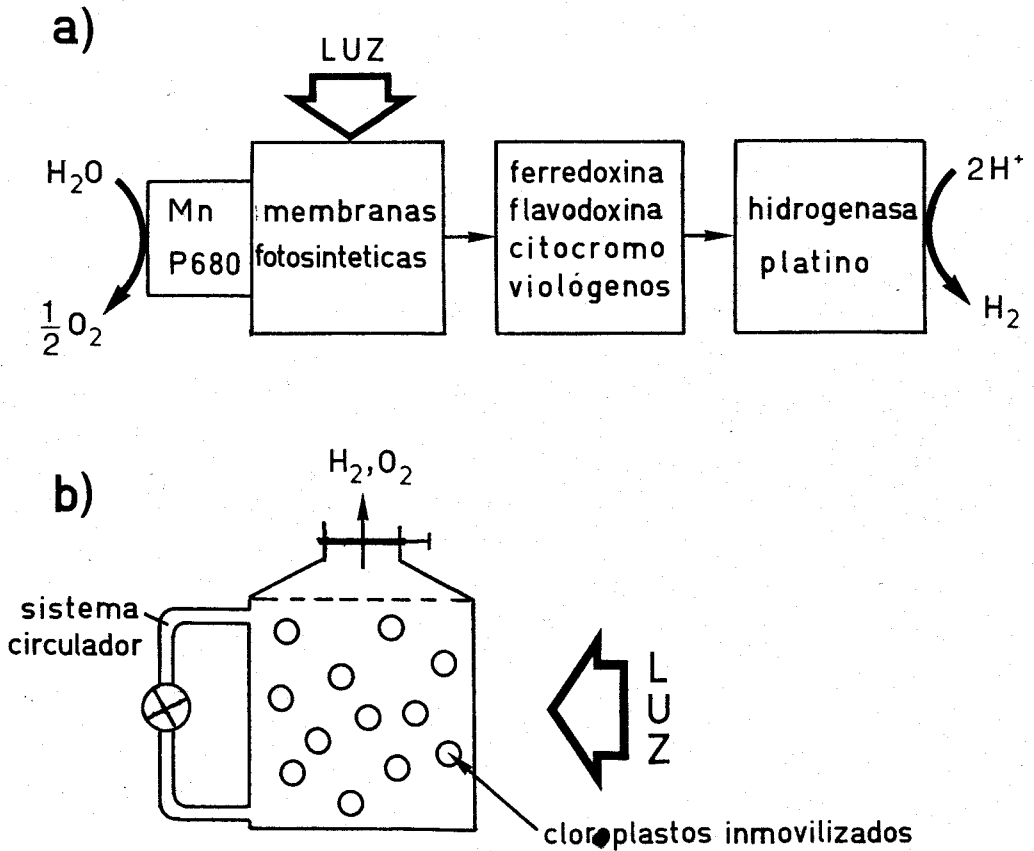


Figura 3. Sistemas fotobiológicos de producción de hidrógeno.

Los sistemas de fotoproducción de H_2 a partir de cloroplastos aislados (a) constan de tres componentes principales: 1, membranas fotosintéticas, que llevan a cabo la fotólisis del agua y suministran, así, electrones y protones; 2, un mediador redox, reducible por los electrones generados fotosintéticamente; 3, un catalizador, que con los electrones del mediador promueve la reducción de los protones a hidrógeno. La inmovilización de los cloroplastos en geles o matrices permite el diseño de biorreactores para la producción de hidrógeno (b).

y biorreactores de producción continua (Figura 3) (Rao y Hall, 1984).

Una alternativa a los sistemas fotobiológicos es el desarrollo de sistemas fotoquímicos artificiales que, simulando el proceso vegetal, lleven a cabo la conversión y almacenamiento de la energía solar con una mayor eficiencia y estabilidad en comparación a los sistemas naturales. Mientras los sistemas biológicos deben de invertir gran parte de la energía que captan en su propio mantenimiento, crecimiento y reproducción, los sistemas miméticos, totalmente artificiales, pueden ser diseñados para llevar a cabo un solo objetivo, la producción de un compuesto energético o de interés práctico, por ejemplo, pudiendo desarrollar una mayor eficiencia que los sistemas biológicos naturales y obviando, asimismo, los problemas que plantea el cultivo de especies vegetales (Bolton et al., 1981; Connolly y Turner, 1983; Grätzel, 1983).

El funcionamiento de cualquier sistema fotoquímico se basa en el hecho de la absorción de luz por parte de un pigmento, o fotosensibilizador. Esta primera reacción, de naturaleza puramente física, puede representarse como:



donde P representa a la molécula absorbente en su nivel más bajo de energía (estado fundamental o basal) y P* denota un estado electrónicamente excitado, con más energía, de la misma molécula.

La configuración electrónica de la molécula fotoexcitada difiere del estado basal en que un electrón ha sido promovido desde un orbital ocupado a otro superior, más energético, que se encontraba vacío. La situación puede esquematizarse como en la Figura 4 (Almgrem et al., 1977), en la que se recoge la posibilidad de dos estados excitados, S₁ y S₂, con

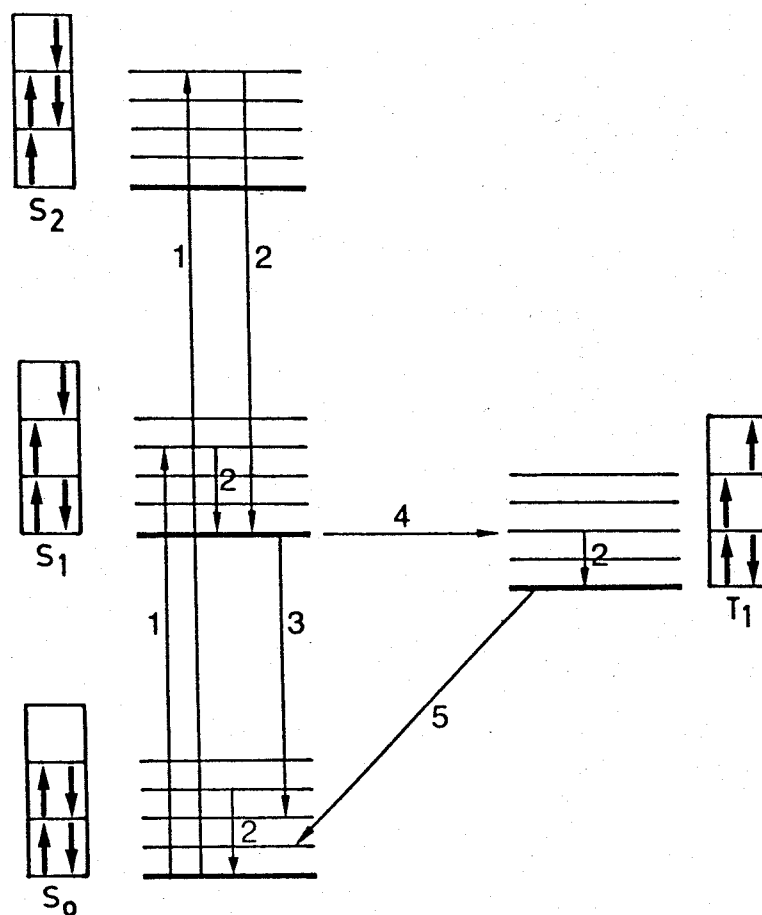


Figura 4. Excitación electrónica de una molécula y posibles vías de desenergetización mediante procesos intramoleculares.

1, absorción de fotones; 2, relajación vibracional con pérdida de energía en forma de calor; 3, fluorescencia; 4, cambio de espín del electrón excitado; 5, fosforescencia; S_0 , singlete basal; S_1 y S_2 , singletes excitados; T_1 , primer triplete excitado, o estado metaestable. Las líneas horizontales representan distintos niveles vibracionales dentro de un mismo nivel electrónico.

respecto al estado basal, S_0 . La letra S significa que los tres estados son estado singlete, es decir, todos sus electrones presentan sus spines apareados: existen tantos electrones con número cuántico magnético de spin $+1/2$ como $-1/2$.

En un corto período de tiempo, del orden del pico segundo, la molécula excitada pierde, en colisiones con otras moléculas, todo el exceso de energía que posee respecto al nivel vibracional más bajo del primer estado excitado, proceso éste que recibe el nombre de relajación vibracional. A partir de este punto existen varias posibilidades de desexcitación de la molécula (Figura 4). Una es la emisión de luz como fluorescencia, con una vida media entre 1 y 100 nanosegundos. Alternativamente, el pigmento en el estado S_1 puede sufrir una reacción química con otra molécula, si bien esta interacción sólo es posible, debido a la corta vida del estado singlete S_1 , si el segundo reactante es muy abundante o se encuentra integrado en un sistema ordenado, como ocurre con la molécula de clorofila en los centros fotosintéticos de reacción.

Otra posible "ruta de escape" desde el nivel S_1 es el cambio de spin del electrón excitado (Figura 4). La molécula resultante contiene, pues, dos electrones con sus spines paralelos, resultando entonces un nuevo estado excitado que recibe el nombre de triplete, T_1 , y que posee una energía algo menor que el correspondiente singlete del que procede. El electrón en este estado puede volver al estado basal, S_0 , con la emisión de un fotón, proceso conocido como fosforescencia. El estado triplete tiene una vida media bastante larga (entre 1 μ s y 1 ms) en comparación a la del estado S_1 , por lo que recibe el nombre de estado metaestable. Precisamente debido a su prolongada vida media, el estado metaestable tiene grandes posibilidades de interaccionar con alguna otra molécula, y es, por tanto, de capital importancia en fotoquímica, ya que la mayoría de las reacciones bimoleculares que implican estados excitados pasan a través de este estado metaestable de "larga" duración.

Como se ha visto, la distribución de los electrones en los orbitales de la molécula fotoexcitada difiere de la del estado basal en que un electrón ha sido promovido desde un orbital ocupado (con dos electrones) a otro que se encontraba vacío, más energético. Es decir, la molécula excitada presenta dos orbitales semillenos, por lo que sus propiedades de óxido-reducción son, en gran medida, distintas de las del estado fundamental (Almgrem et al., 1977).

La elevación de un electrón desde un orbital inferior a otro superior produce, al mismo tiempo, una disminución del potencial de ionización y un aumento de la afinidad electrónica de la molécula. En consecuencia, la molécula fotoexcitada puede ceder con mayor facilidad un electrón —concretamente el electrón que ha sido excitado— a un aceptor adecuado, o bien puede alojar un electrón, cedido por un sustrato donador, a un nivel más bajo de energía —concretamente en el hueco dejado por el electrón que ha subido de nivel energético—. En otras palabras, una molécula excitada es a la vez mejor reductor y mejor oxidante que la molécula en su estado basal (Almgrem et al., 1977; Balzani et al., 1978).

Suponiendo algunas simplificaciones termodinámicas, el potencial de óxido-reducción, E'_0 , de las moléculas fotoexcitadas, para el intercambio de un solo electrón, puede calcularse a partir de las siguientes ecuaciones y dependiendo de que la forma excitada actúe como donador:

$$E'_0(P^*/P^+) = E'_0(P/P^+) - \Delta E$$

o como aceptor de electrones:

$$E'_0(P^-/P^*) = E'_0(P^-/P) + \Delta E$$

donde ΔE corresponde a la diferencia de potencial, expresada en voltios, entre los estados excitado y fundamental. De estas expresiones se deduce que cuando es la forma reducida del

par la que se excita por la luz, el potencial del par excitado se hace más negativo, es decir, más reductor. Por el contrario, si es la forma oxidada la que se energetiza, el potencial del par se vuelve más positivo, es decir, más oxidante (Almgrem et al., 1977; De la Rosa et al., 1985; Losada et al., 1983; Tegnér, 1982).

En las moléculas orgánicas existe generalmente una gran separación entre sus estados de oxidación-reducción, razón por la que una molécula excitada se comporta como mejor donador o como mejor aceptor de electrones con respecto a la molécula basal, pero no ambas cosas al mismo tiempo (Balzani et al., 1978). Tal es el caso de las flavinas (importantes pigmentos biológicos nitrogenados ampliamente distribuidos como grupos prostéticos, o coenzimas, de proteínas transportadoras de electrones en rutas claves del metabolismo), ejemplo típico de par redox del tipo de forma oxidada energetizada, en el que su potencial redox se hace más positivo tras la excitación (Losada, 1979; Losada et al., 1983).

Como se recoge en la Figura 5, la forma oxidada de las flavinas (F) en su estado basal se excita al absorber un fotón y pasa a un estado energetizado inestable (F*), lo que conlleva el correspondiente incremento del potencial redox del par. Teniendo en cuenta que el estado triplete, T_1 , de las flavinas posee una energía adicional de 2,07 eV respecto al estado fundamental, es posible calcular el potencial redox de las flavinas excitadas en base a la ecuación anteriormente citada. Así, ya que el potencial normal de las flavinas en su estado basal, $E'_0(FH^+/F)$ a pH 7, es de -0,22 V, el potencial normal de las flavinas excitadas, $E'_0(FH^+/F^*)$ también a pH 7, será de +1,85 V (De la Rosa et al., 1985). En consecuencia, las flavinas iluminadas pueden aceptar electrones, cedidos por donadores adecuados, a un potencial muy positivo (+1,85 V) y cederlos posteriormente, sin intervención de la luz, a aceptores con potenciales más negativos (-0,22 V), promoviendo de esta forma un flujo de electrones contra-

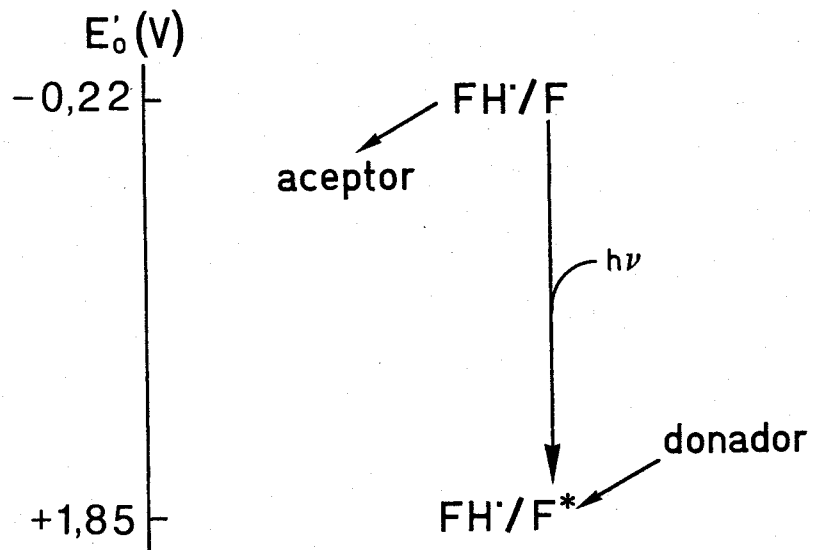


Figura 5. Cambios en el potencial redox de las flavinas inducidos por la luz y promoción de electrones contragradiante de potencial.

Tras la absorción de luz visible, la forma oxidada de las flavinas (F) se fotoexcita y pasa al estado metaestable de triplete (F^*). El par redox ($FH\cdot/F^*$) exhibe ahora un potencial mayor que el del par no energizado ($FH\cdot/F$), calculándose una diferencia entre ambos pares de 2,07 V. De esta forma, la luz puede promover un flujo de electrones contragradiante de potencial desde compuestos relativamente oxidados a otros más reducidos.

gradiente desde compuestos relativamente oxidados (pobres en energía) a otros más reducidos (ricos en energía) (Losada, 1979; Losada et al., 1983).

En los complejos orgánicos de metales de transición, por el contrario, la presencia de varios sitios de óxido-reducción en el metal y en los ligandos ofrece posibilidades adicionales no existentes en los iones metálicos o en la molécula orgánica por separado. Los estados de oxidación suelen estar muy cercanos y es frecuente, por tanto, encontrar complejos de coordinación cuyo estado excitado puede actuar simultáneamente como mejor donador y aceptor de electrones que el estado basal. Un ejemplo de este tipo de compuestos es el complejo catiónico Rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) (Meyer, 1983), que puede existir en tres estados diferentes de oxidación: 1+, 2+ y 3+. El estado intermedio, 2+, es capaz de absorber luz visible y llegar a un estado metaestable con una energía adicional de 2,12 eV, energía que permite calcular los potenciales de los correspondientes pares excitados en base a las ecuaciones antes descritas. Así, y según se puede ver en la Figura 6, el potencial redox del par $*Ru(bipi)_3^{2+}/Ru(bipi)_3^{3+}$ disminuye en 2,12 V, ya que es la forma reducida la excitada, mientras que el potencial del par $Ru(bipi)_3^{1+}/*Ru(bipi)_3^{2+}$ aumenta en 2,12 V, siendo en este caso la forma oxidada la excitada (Balzani et al., 1978; Meyer, 1983).

Como se deduce de todo lo anterior, los estados electrónicamente excitados son susceptibles de actuar como reactantes en las reacciones de óxido-reducción o de transferencia de electrones, si bien en la práctica existen serias limitaciones para que dichas reacciones tengan lugar. Según ya vimos con anterioridad, los estados excitados pueden seguir varias vías para su desenergetización, pero solamente cuando tales procesos no son demasiado rápidos, es decir, cuando la vida media del estado excitado es lo suficientemen

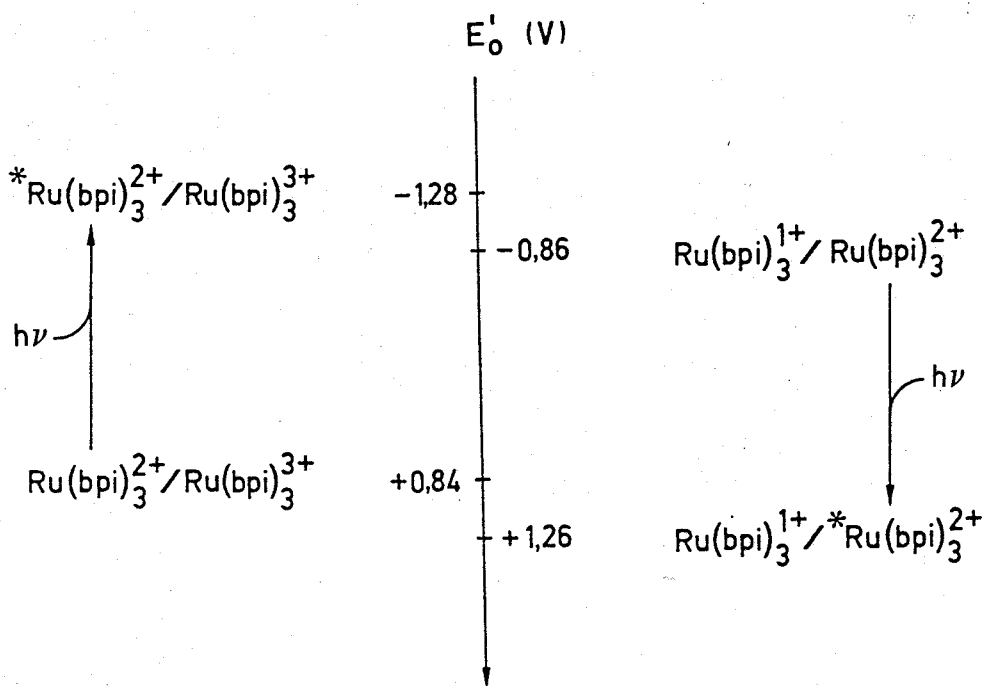


Figura 6. Cambios en los potenciales normales de óxido-reducción inducidos por la luz del complejo de coordinación Ru(II)-Tris(2,2'-bipiridilo).

Dependiendo de que la forma excitada por la luz (la especie intermedia 2+) actúe como forma oxidada (derecha) o reducida (izquierda) del correspondiente par, el potencial redox de éste aumentará o disminuirá, respectivamente, en 2,12 V.

te larga (un microsegundo o más), la molécula energétizada tendrá la oportunidad de encontrar otra molécula y, eventualmente, sufrir algún tipo de reacción bimolecular. Para la mayor parte de las moléculas orgánicas, únicamente el estado triplete de menor energía, T_1 , y, algunas veces, también el estado singlete S_1 , satisfacen esta condición (Balzani y Scandola, 1981; Meyer, 1983).

Cuando la molécula excitada interacciona con otra molécula, varios procesos pueden tener lugar. Así, podremos observar una transferencia de energía, una transferencia electrónica (reacción redox), una simple desactivación del estado excitado, o algunos otros (Balzani y Scandola, 1981; Meyer, 1983). A continuación, centraremos nuestra atención sobre las reacciones redox, que son las que presentan un mayor interés en los procesos de conversión y almacenamiento de la energía solar en forma de compuestos energéticos.

Dependiendo de los niveles energéticos de los productos resultantes de la reacción redox inducida por la luz, se pueden diferenciar dos tipos principales de procesos fotónicos (Figura 7): a) Fotocatálisis, cuando el nivel de energía de los productos es inferior al de los reactantes de la reacción —en este caso el cambio de energía libre, ΔG , de la reacción es negativo: el proceso en su conjunto libera energía—. b) Conversión de la energía luminosa en energía química, cuando el nivel energético de los productos es superior al nivel inicial de los sustratos — ΔG es positivo y el proceso permite el almacenamiento de parte de la energía suministrada por la luz—. En el primer caso la luz se comporta como un simple catalizador, acelerando un proceso que en la oscuridad transcurriría con una eficiencia mucho menor; en el segundo caso la energía luminosa queda almacenada en forma de energía química en los productos resultantes de la reacción, que son, por tanto, considerados como combustibles o compuestos ricos en energía (Balzani y Scandola, 1981).

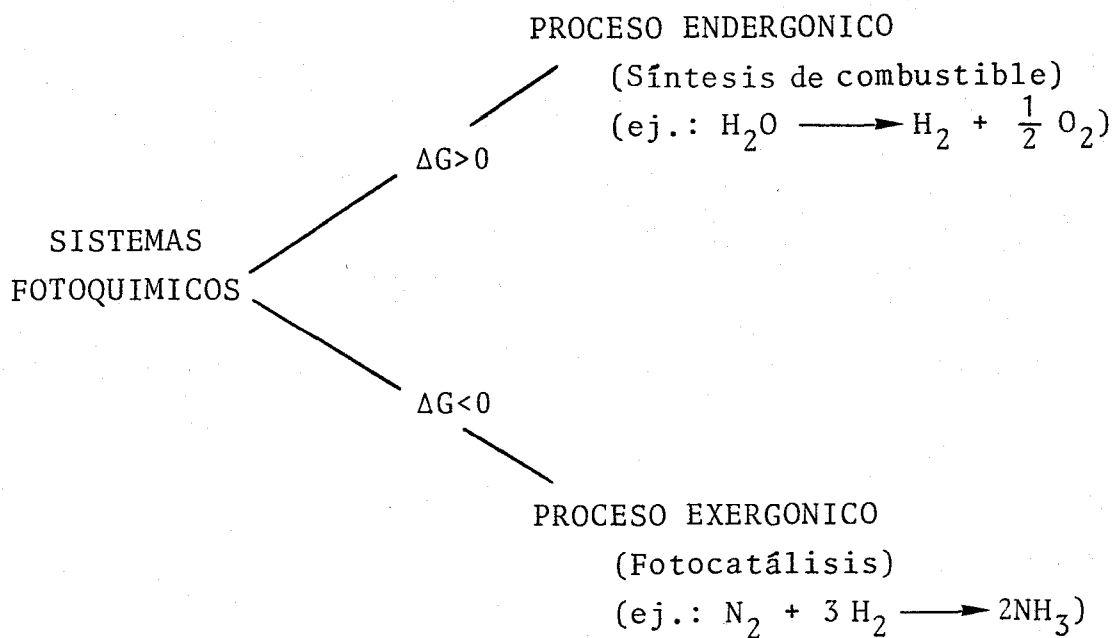


Figura 7. Procesos promovidos por la luz.

Según los niveles energéticos de los productos resultantes de una reacción redox inducida por la luz, se pueden diferenciar dos tipos principales de procesos. a) Fotocatálisis, cuando el nivel de energía de los reactantes es superior al de los productos. ΔG es negativo: el sistema en su conjunto pierde energía. b) Conversión de la energía luminosa en energía química, cuando el nivel energético de los productos es superior al de los reactantes. ΔG es positivo: parte de la energía suministrada por la luz queda almacenada en los productos, que son considerados por tanto como combustibles o compuestos ricos en energía.

En la Figura 8 se presenta esquemáticamente el desarrollo de un proceso redox de conversión y almacenamiento de energía luminosa en energía química (Balzani y Scandola , 1983; Lehn, 1981). En primer lugar, la energía de los fotones se utiliza para conducir uno de los reactantes a un nivel energético superior. A continuación, el estado excitado puede interaccionar con una molécula del segundo reactante y tener lugar la reacción redox de transferencia de carga entre ambos. Según el estado excitado aumente o disminuya su potencial redox, el segundo reactante actuará como donador o como aceptor de electrones, respectivamente. En cualquier caso, se produce la transferencia electrónica y, en reacciones posteriores de óxido-reducción, se formarán los productos finales, en los que queda almacenada gran parte de la energía luminosa inicialmente captada por el pigmento.

La aplicación práctica de tales sistemas se enfrenta con tres problemas fundamentales. El primero concierne al pigmento fotoexcitable, o fotosensibilizador, que debe de presentar una alta eficiencia de absorción de luz en la zona visible del espectro electromagnético, a fin de aprovechar al máximo la energía luminosa incidente; además, el estado excitado del pigmento debe poseer una vida media lo suficientemente larga como para permitir que la reacción redox con el otro reactante tenga lugar. En segundo lugar, es necesario que los intermediarios redox sean bastante estables y no reaccionen entre sí, evitando las reacciones de recombinación espontánea una vez que se ha producido la transferencia electrónica, ya que en caso contrario se llegaría nuevamente a la recuperación de los reactantes iniciales. Por último, la tercera cuestión concierne a las reacciones redox que conducen a la formación de los productos estables de almacenamiento, siendo necesaria en este caso una alta eficiencia de acoplamiento entre estas reacciones y los intermediarios redox (Balzani y Scandola, 1981; Lehn, 1981).

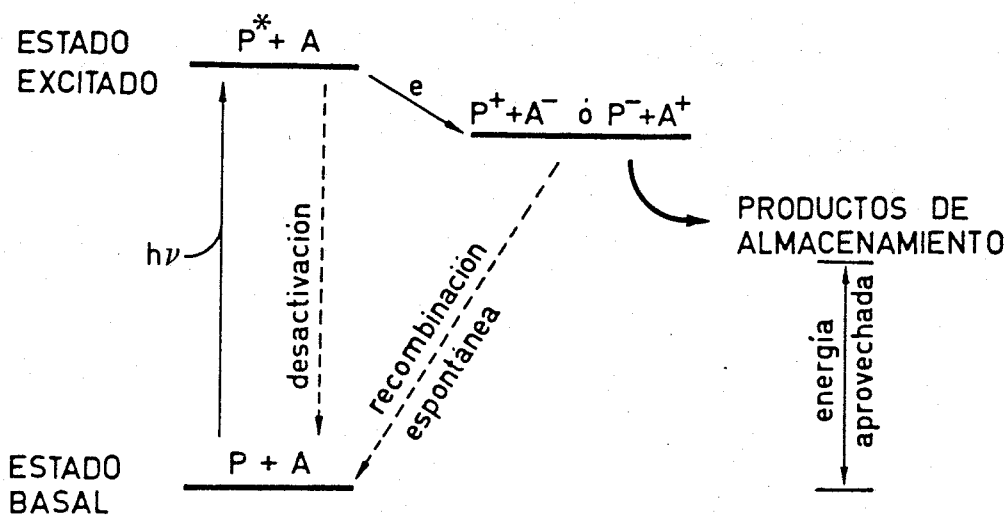


Figura 8. Representación esquemática de un proceso redox de conversión y almacenamiento de energía luminosa en energía química.

La excitación fotónica del pigmento, P, induce una reacción de transferencia electrónica de oxidación o de reducción entre el pigmento energizado, P*, y el reactante A. El acoplamiento subsiguiente de los intermediarios redox resultantes con otras reacciones redox conduce, por último, a la formación de los productos de almacenamiento. El proceso en su conjunto supone una elevación del nivel energético de los reactantes iniciales, que es precisamente la energía aprovechada por el sistema.

En general, los sistemas fotoquímicos artificiales se componen de (a) un pigmento responsable de la absorción de la radiación, que al excitarse se vuelve más oxidante o más reductor; (b) un aceptor de electrones, que al reaccionar con el pigmento excitado sufre un proceso redox que permite la obtención del producto que se persigue; y (c) un donador de electrones pobre en energía, idealmente el agua, que sea la fuente última de electrones para el proceso redox. En algunos sistemas es necesario, además de estos tres componentes básicos, la inclusión de un catalizador que facilite la transferencia electrónica en algunas de las reacciones implicadas. Como ejemplo representativo, en la Figura 9 se presenta un sistema fotoquímico artificial para aprovechar la energía solar mediante la producción de hidrógeno molecular, uno de los productos que ha despertado más interés, no sólo en el campo de la fotobiología aplicada, como se ha discutido antes, sino dentro de la fotosíntesis química o artificial.

Los sistemas químicos inicialmente ideados para la producción de hidrógeno utilizaban donadores de electrones ligeramente reductores (EDTA y trietanolamina, por ejemplo) que se consumen irreversiblemente a lo largo del proceso; diversos pigmentos fotorreceptores (complejos derivados de rutenio o cobalto, derivados metálicos de porfirinas, proflavina y otros); distintos mediadores redox (metilviológeno, complejos de rodio); y, finalmente, catalizadores (hidrogenasa, platino) que actúan de intermediarios en la reducción última de los protones a hidrógeno (Grätzel, 1981; Harriman, 1983; Lehn, 1981; Kalyanasundaram et al., 1978; Kirch et al., 1979; Krasna, 1979). Hace tan sólo unos años, un grupo suizo comunicó, por primera vez, la formación de pequeñas cantidades de hidrógeno y oxígeno en una célula fotoquímica: el pigmento excitado $\text{-Ru(II)-Tris(2,2'-bipiridilo)-}$ transfería un electrón al metilviológeno, y éste, a su vez, a un catalizador de platino que finalmente desprendía hidrógeno. El complejo de rutenio oxidado producía oxígeno, simultáneamente,

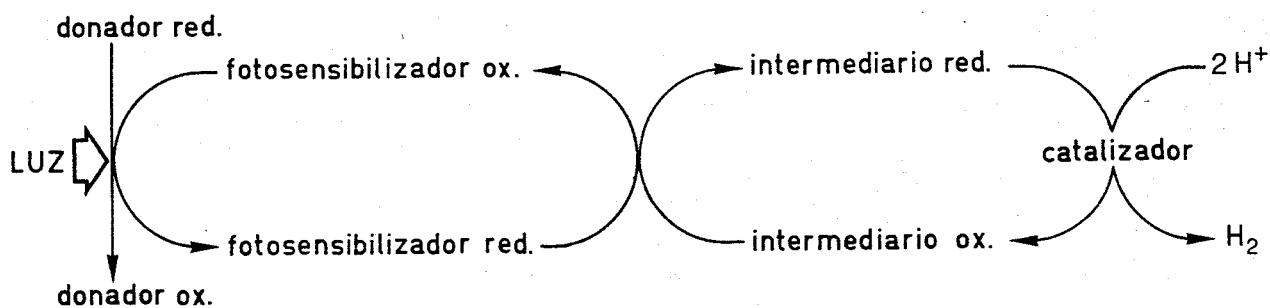
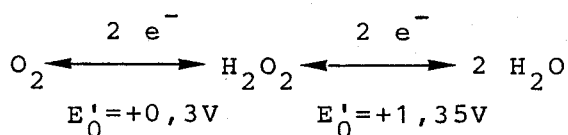


Figura 9. Sistema fotoquímico artificial para la producción de hidrógeno.

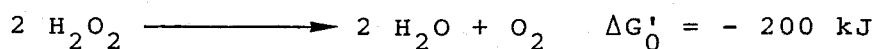
Los sistemas fotoquímicos, en general, se basan en la capacidad de absorción de luz por parte de un pigmento fotosensibilizador, capaz de mediar la transferencia de electrones entre un donador reducido (idealmente el agua) y un compuesto que actúa como intermediario redox. En algunos casos, como en este de la producción de hidrógeno, es necesaria la inclusión de un catalizador que acelere la reducción de los protones con los electrones cedidos por el intermediario. Para más detalles, véase el texto.

al reducirse a partir de agua en presencia de un catalizador de dióxido de rutenio (Grätzel, 1981; Kiwi y Grätzel, 1978; 1979). Posteriormente, los rendimientos de este sistema inicial mejoraron con la introducción de catalizadores de dióxido de rutenio o de titanio en estado coloidal en lugar de en suspensión macrodispersa, y, últimamente, con el diseño de catalizadores bifuncionales de RuO_2 y PtO_2 depositados sobre TiO_2 coloidal (Borgarello et al., 1981; Grätzel, 1981; Kiwi et al., 1980; Pelizzetti y Visca, 1983). Sin embargo, tal sistema adolece aún de una insuficiente eficacia y estabilidad.

El hidrógeno no es el único compuesto de interés energético que los sistemas fotoquímicos o fotobiológicos pueden sintetizar, y, de hecho, se han diseñado sistemas productores de compuestos tales como amonio, metano, alcoholes, hidrocarburos sencillos o peróxido de hidrógeno (Claesson y Holmström, 1982; De la Rosa et al., 1983; Halmann, 1983; Ramos et al., 1982; 1984). El peróxido de hidrógeno, en particular, es un compuesto que corresponde a un estado de oxidoreducción intermedio entre el oxígeno y el agua. Por una parte, puede perder dos electrones y pasar a oxígeno molecular y, por otra, puede ganar dos electrones y formar una molécula de agua.



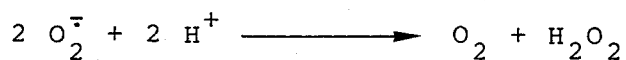
Esta capacidad de reducirse y oxidarse le permite, en presencia de catalizadores metálicos o del enzima catalasa, dismutarse según la siguiente ecuación:



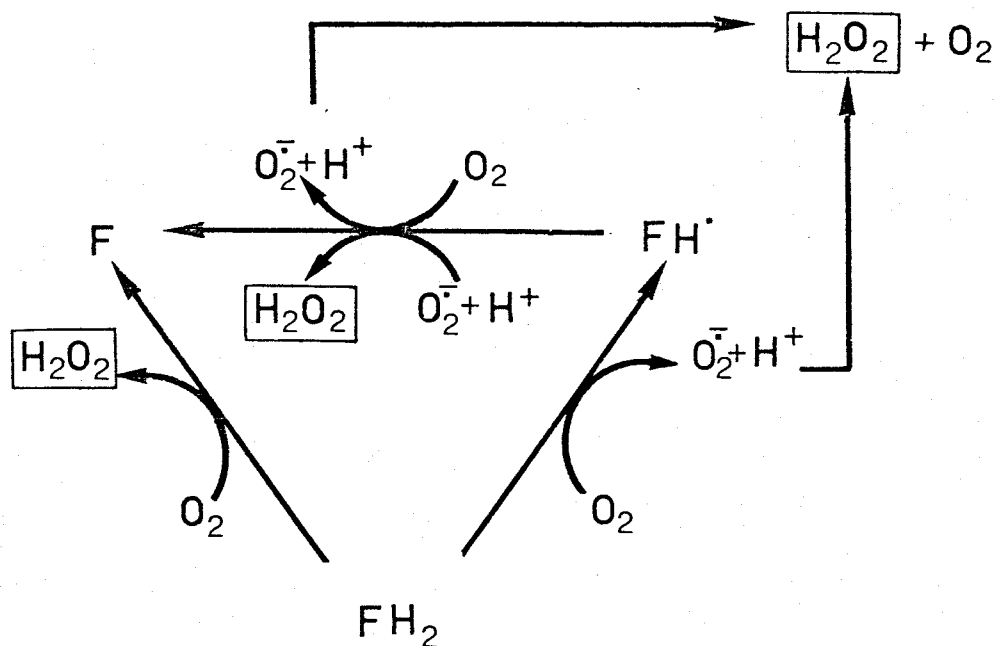
Esta reacción es altamente exergónica y, por lo tanto, el peróxido de hidrógeno es susceptible de ser utilizado como combustible al aprovechar su dismutación como fuente de calor y energía (Crampton et al., 1977; Holmström, 1977; Losada, 1979).

De hecho, su utilización como agente propulsor de cohetes para fines militares o lanzamientos espaciales, por ejemplo, pone de manifiesto las buenas cualidades energéticas de este producto (Losada, 1979). Aparte de su posible uso como combustible, el peróxido de hidrógeno es un compuesto de alto interés industrial, ampliamente utilizado en la industria química o farmacéutica y, como agente blanqueante, en la industria textil (Crampton et al., 1977). Resulta, pues, de gran interés práctico el desarrollar un método alternativo para la producción a gran escala de este compuesto de una manera más económica y rentable que la actual. Con este objetivo como eje central del desarrollo de nuestro trabajo, se emprendió el estudio de la producción de peróxido de hidrógeno por fotosistemas químicos y biológicos, utilizando así la energía solar para la producción de un producto de interés para el hombre.

El peróxido de hidrógeno puede ser fotogenerado de una manera biológica por reducción del oxígeno molecular con los electrones suministrados por el aparato fotosintético de plantas y algas verdes. El papel del oxígeno como reactivo de Hill —aceptor de electrones en la cadena fotosintética— ha quedado bien establecido desde que los ya clásicos experimentos de Mehler demostraron la producción de H_2O_2 por cloroplastos aislados e iluminados (Good y Hill, 1955; Mehler, 1951). El oxígeno parece ser monovalentemente reducido a radical superóxido (O_2^-) por intermediarios redox, naturales o artificiales, de bajo potencial (NADH, ferredoxina, viológenos, quinonas, flavinas) que aceptan electrones en el lado reductor del fotosistema I (Allen, 1977; De la Rosa et al., 1986; Elstner, 1982). La dismutación del inestable radical superóxido, espontánea o catalizada enzimáticamente, conduciría a la formación de H_2O_2 (Allen, 1977):



Otra posibilidad es utilizar sistemas fotoquímicos artificiales para la producción de peróxido de hidrógeno. Con este fin, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de Sevilla se han venido desarrollando desde hace unos años varios sistemas fotoquímicos basados en el uso de las flavinas como pigmentos fotosensibilizadores, las cuales son reducidas en la luz con los electrones suministrados por donadores tales como el EDTA, la semicarbazida o la hidroxilamina y, a continuación, el oxígeno es reducido a peróxido de hidrógeno en la oscuridad (Fontes et al., 1981; De la Rosa et al., 1983). En estos sistemas, la flavina fotoexcitada se reduce con los electrones suministrados por el donador hasta sus formas de semiquinona ($FH\cdot$, parcialmente reducida) o hidroquinona (FH_2 , totalmente reducida), que a su vez reaccionan con el oxígeno molecular y, mediante un conjunto de reacciones concatenadas, dan lugar finalmente a la formación de peróxido de hidrógeno (De la Rosa et al., 1985; Hemmerich y Wessiak, 1976; Massey y Williams, 1982; Massey et al., 1971):



Sobre la base de estos conocimientos se emprendió el estudio aquí presentado, cuyo objetivo fundamental fue la optimización del proceso de reducción del oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno impulsado por energía solar. Se han diseñado, pues, diversos fotosistemas, tanto químicos como biológicos, que al captar luz visible permitieran utilizar la energía de la misma para la formación del peróxido, consiguiendo así la construcción de un sistema de conversión y almacenamiento de la energía solar en energía química mediante la producción de un compuesto estable de especial interés y de alto contenido energético.

Parte de los resultados aquí reseñados ha sido previamente presentada en varios congresos científicos y publicada en revistas especializadas:

Artículos publicados:

De la Rosa, M.A., Navarro, J.A., De la Rosa, F.F. y M. Losada (1983), "Stabilization by High pH of Hydrogen Peroxide Production with Flavin Photosystems". *Photobiochem. Photobiophys.*, 5, 93-103.

Navarro, J.A., De la Rosa, M.A., Roncel, M. y F.F. De la Rosa (1984). "Carbon Dioxide-mediated Decomposition of Hydrogen Peroxide in Alkaline Solutions". *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 80, 249-253.

Roncel, M., Navarro, J.A., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa (1985). "Flavin-mediated Production of Hydrogen Peroxide in Photoelectrochemical Cells". *Photochem. Photobiol.*, 40, 395-398.

De la Rosa, M.A., Navarro, J.A., Roncel, M. y F.F. De la Rosa (1985). "Sistemas Fotoquímicos Productores de Compuestos Energéticos: Producción de Peróxido de Hidrógeno con Flavinas". *Química e Industria* 31(7-8), 497-500.

Comunicaciones a congresos

Navarro, J.A., De la Rosa, M.A., De la Rosa, F.F. y M. Losada. "Efecto del pH en la Producción Fotoquímica de Agua Oxigenada por Sistemas Flavínicos". X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica. Resumen 18, Santander, 1982.

De la Rosa, M.A., Navarro, J.A., Hervás, M., De la Rosa, F.F. y M. Losada. "Aprovechamiento de la Energía Solar para la Producción de Agua Oxigenada Utilizando Flavinas como Fotosensibilizadores". Actas Desarrolladas del I Congreso Ibérico de Energía Solar ISES (M. Collares, A. Luque y A. Silverio, eds.). Volumen I, pp. III30-III41, Lisboa (Portugal), 1982.

Navarro, J.A., Roncel, M., De la Rosa, M.A., De la Rosa, F.F. y M. Losada. "Generación de Agua Oxigenada por Flavinas Iluminadas: Efecto del CO₂ y Posibilidades del Sistema". Actas de la II Reunión Científica de Microbiología Industrial, Sevilla, 1983.

Navarro, J.A., Roncel, M., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa. "Factores que Afectan a la Eficiencia del Fotosistema Semicarbazida/Lumiflavina Productor de Peróxido de Hidrógeno". II Congreso Luso-Español de Bioquímica. Resumen 969, Barcelona, 1983.

De la Rosa, M.A., Roncel, M., Navarro, J.A. y F.F. De la Rosa. "Flavin-mediated Production of Hydrogen Peroxide in Photoelectrochemical Cells". Xth IUPAC Symposium on Photochemistry. Resumen 7.1, pag. 591. Interlaken (Suiza), 1984.

Navarro, J.A., Roncel, M., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa. "Estimulación por distintas Flavinas de la Producción Fotosintética de Peróxido de Hidrógeno con Tilacoides de Espinaca". XI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica. Resumen 624, pag. 388. Puerto de la Cruz-Tenerife, 1984.

Roncel, M., Navarro, J.A., De la Rosa, M.A. y F.F. De la Rosa. "Photochemical Production of Hydrogen Peroxide with Ruthenium(II)-Tris(2,2'-bipyridine) as Sensitizer". XXIII Congreso Internacional de COMPLES. Resumen pag. 66. Sevilla, 1983.

Navarro, J.A., Roncel, M., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa. "Fotoproducción de Peróxido de Hidrógeno con Cloroplastos Inmovilizados en Glutaraldehído". XII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica. Resumen 365, pag. 282. Valencia, 1985.

Navarro, J.A., Roncel, M., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa. "The Spinach Thylakoid as a Photobiosystem for H_2O_2 Production". 17th FEBS Meeting. Berlin Oeste (Alemania Federal), Agosto, 1986.

Roncel, M., Navarro, J.A., De la Rosa, F.F. y M.A. De la Rosa. "Hydrogen Peroxide Photoproduction by the Semicarbazide/ $Ru(bpy)_3^{2+}$ /Oxygen System". XIth IUPAC Symposium on Photochemistry. Resumen 5P-40. Lisboa (Portugal), 1986.

II. MATERIALES Y METODOS.

A. SISTEMAS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS UTILIZADOS COMO FOTORRECEPTORES.

A.1. Fotosistemas biológicos.

A.1.1. Procedencia del material.

Tanto las vesículas tilacoidales como las partículas del PSI, se extrajeron de hojas frescas de espinaca (Spinacea oleracea) compradas en el mercado y recolectadas el día anterior. Las hojas se cortaron en trozos pequeños, se lavaron con agua destilada fría, se secaron a 3-5°C en la oscuridad, y se utilizaron inmediatamente para la extracción de vesículas tilacoidales o para el aislamiento del fotosistema I.

A.1.2. Obtención de vesículas tilacoidales.

Las vesículas tilacoidales se obtuvieron según el método de Arnon y Chain (1977). Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en una cámara fría, a 3-5°C y con baja iluminación. 50 gramos de hojas limpias, frías y sin nervios, se trituraron durante 10 s en una batidora LO-MI G-2 (España) con 150 ml de tampón Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5, suplementado con sacarosa 0,4 M y NaCl 10 mM. El homogenado resultante se filtró a través de 6 capas de organdí de nylon y se centrifugó a 400xg durante 1 min, a fin de eliminar los restos celulares y trozos de hoja. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3000xg durante 1 min, y el precipitado resultante, conteniendo cloroplastos intactos, se resuspendió en 40 ml de una solución hipotónica que contenía Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5, y NaCl 10 mM. La resuspensión en la solución hipotónica provocaba la rotura de los cloroplastos por choque osmótico, permitiendo, así, la formación de vesículas tilacoidales. El material resuspendido se centrifugó a 10.000xg durante 30 s, se desechó el sobrenadante obtenido, y se resuspendió el precipitado en 2-3 ml de la anterior solución hipotónica, dilu-

yéndose posteriormente con el mismo tampón hasta conseguir una concentración aproximada de 1 mg de clorofila ml^{-1} . La preparación así obtenida se guardó hasta su uso en hielo y oscuridad. Inmediatamente antes de realizar cada experimento, una cantidad determinada de la suspensión tilacoidal, conteniendo una cantidad conocida de clorofila, se resuspendió en un determinado volumen de tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, suplementado con MgCl_2 2,5 mM y NH_4Cl 5 mM (tampón de fotoproducción).

A.1.3. Preparación de vesículas tilacoidales inmovilizadas en agar.

La inmovilización de las vesículas tilacoidales en agar se realizó según el método descrito por Gisby et al. (1985). Se disolvieron 0,15 g de agar en 10 ml de una solución hirviendo de NaCl 0,15 M. La solución se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45°C, y, a continuación, se extendió sobre una placa de petri de vidrio depositada sobre hielo, que contenía 2 ml de una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 3 mg) y 0,5% de se-roalbúmina bovina. El contenido de la placa se agitó hasta obtener una suspensión uniforme, formándose, casi instantáneamente, una delgada película de agar sólido conteniendo las vesículas tilacoidales fijadas. La película de agar se cortó en trozos rectangulares uniformes, de 2-3 mm, que se resuspendieron en el tampón de fotoproducción.

A.1.4. Aislamiento de partículas del fotosistema I.

Las partículas del fotosistema I se aislaron, a partir de hojas de espinaca, según el método de Peters et al. (1983), si bien ligeramente modificado. Todo el proceso de purificación se llevó a cabo a 3-5°C y con baja iluminación. 500 g de hojas limpias, frías y sin nervios se trituraron durante 15 s en una batidora WARING BLENDOR CB-6 (EE.UU.) con 800

ml de tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,8, suplementado con sorbitol 0,3 M, NaCl 25 mM, KCl 25 mM y $MgCl_2$ 5 mM. El homogenizado resultante se filtró a través de 6 capas de organdi de nylon, y se centrifugó nuevamente a $3000 \times g$ durante 1,5 min. El precipitado obtenido en la centrifugación se resuspendió en 60 ml de una solución hipotónica de $MgCl_2$ 10 mM durante 1,5 min, y, a continuación, se añadieron 60 ml de tampón TES-KOH 40 mM, pH 7,8, suplementado con sorbitol 0,5 M, NaCl 50 mM y KCl 50 mM. La solución así obtenida se centrifugó a $3500 \times g$ durante 1,5 min, descartándose el sobrenadante; el precipitado se resuspendió en 10-15 ml de tampón TES-KOH 20 mM, pH 7,8, suplementado con sorbitol 0,25 M, NaCl 25 mM, KCl 25 mM y $MgCl_2$ 5 mM. Esta solución se diluyó con el mismo tampón y se le añadió digitonina, de forma que la concentración final del detergente fuese del 0,4% (p/v) y la relación digitonina/clorofila (p/p) fuese de 2:1. A continuación, la solución se incubó con agitación suave durante 30 min en la oscuridad y a una temperatura de $4^\circ C$, consiguiéndose, durante este período, que el detergente solubilizase las lamelas del estroma, ricas en fotosistema I. Tras el período de incubación, la suspensión se diluyó tres veces con el último tampón citado y se centrifugó durante 30 min a $10.000 \times g$. El sobrenadante así obtenido se centrifugó, nuevamente, a $50.000 \times g$ durante otros 30 min. El precipitado resultante de esta centrifugación se descartó, y el sobrenadante se centrifugó finalmente durante 1 h a $129.000 \times g$. El precipitado final se resuspendió en 2-3 ml de tampón TES-KOH 5 mM, pH 7,8, suplementado con KH_2PO_4 2,5 mM, NaCl 20 mM, KCl 20 mM y $MgCl_2$ 5 mM. Posteriormente, la suspensión se diluyó con este mismo tampón hasta conseguir una concentración aproximada de 0,5-1 mg de clorofila ml^{-1} . La suspensión final se usó inmediatamente o se almacenó a $-80^\circ C$ hasta su utilización, que nunca fue más tarde de tres días.

A.2. Fotosistemas químicos.

A.2.1. Pigmentos utilizados.

Los pigmentos más estudiados han sido la lumiflavina y el rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo), que presentaron una mayor eficiencia en la producción de peróxido de hidrógeno y una estabilidad relativamente alta. Otros pigmentos ensayados como fotosensibilizadores en la producción de H_2O_2 han sido: quinonas (2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona), derivados de la fenazina (fenazina metosulfato y safranina), y otros pigmentos comúnmente usados en bioquímica o histología (naranja de acridina, rojo de fenilo y procion rojo).

A.2.2. Inmovilización del rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) en Nafion.

La fijación del rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) en Nafion (un polímero del ácido perfluorosulfónico) se realizó de acuerdo con el método descrito por Martin et al. (1982). En un tubo de ensayo se mezclaron 0,2 ml de etanol, 1 ml de una solución de $Ru(bipi)_3^{2+}$ 10 mM en etanol, y 0,8 ml de una solución de Nafion al 5%, también en etanol. El contenido del tubo se depositó cuidadosamente sobre dos discos de plástico de 4,2 cm de diámetro, fijados sobre la superficie interna de la célula de reacción, de manera que se formase una capa uniforme de líquido sobre la superficie de los discos. A continuación, se dejó evaporar el alcohol durante una noche, manteniendo el conjunto en la oscuridad. Como resultado final se obtuvo una membrana de perfluorosulfonato polimerizado sobre la superficie de los discos. Esta membrana presenta una gran estabilidad química, térmica y mecánica en solución acuosa, y la existencia de grupos sulfonato cargados le concede propiedades de intercambiador iónico, con una alta capacidad de fijar cationes, por lo que el $Ru(bipi)_3^{2+}$ se une fuertemente a la membrana por atracción electrostática entre el pig-

mento, cargado positivamente, y la membrana electronegativa.

El complejo de rutenio se puede liberar del Nafion por extracción con una solución de acetona al 80% en agua. La acetona disuelve la membrana de Nafion y el pigmento puede, por tanto, ser recuperado y cuantificado espectrofotométricamente.

B. CELULAS DE REACCION Y CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO.

B.1. Células de reacción.

B.1.1. Células para los sistemas biológicos.

Las reacciones fotosintéticas de producción de peróxido de hidrógeno en sistemas estanco con vesículas tilacoidales, ya fueran libres o inmovilizadas en agar, se llevaron a cabo en una cubeta de metacrilato de paredes transparentes en forma de paralelepípedo. La superficie iluminada de la cubeta medía 4,8 cm de ancho y 10 cm de alto, siendo el espesor de la misma de 1,8 cm. Cuando el sistema biológico empleado fueron partículas aisladas del fotosistema I, la célula de reacción consistía en una cubeta cilíndrica de vidrio, de 2 cm de diámetro y 6 cm de altura, la cual se iluminaba lateralmente.

En los experimentos con sistemas de producción continua con vesículas tilacoidales inmovilizadas en agar, se utilizó un dispositivo cuyo diseño se corresponde básicamente con el que se describe en la Figura 10, con la excepción de que las vesículas tilacoidales inmovilizadas se encontraban en suspensión, y no sobre discos, y que la célula de reacción se burbujeó con aire, y no con oxígeno. La célula de reacción consistía en una cubeta cilíndrica de vidrio, de 2 cm de diámetro y 6 cm de altura, donde se encontraban en suspensión los bloques de agar conteniendo las vesículas tilacoidales.

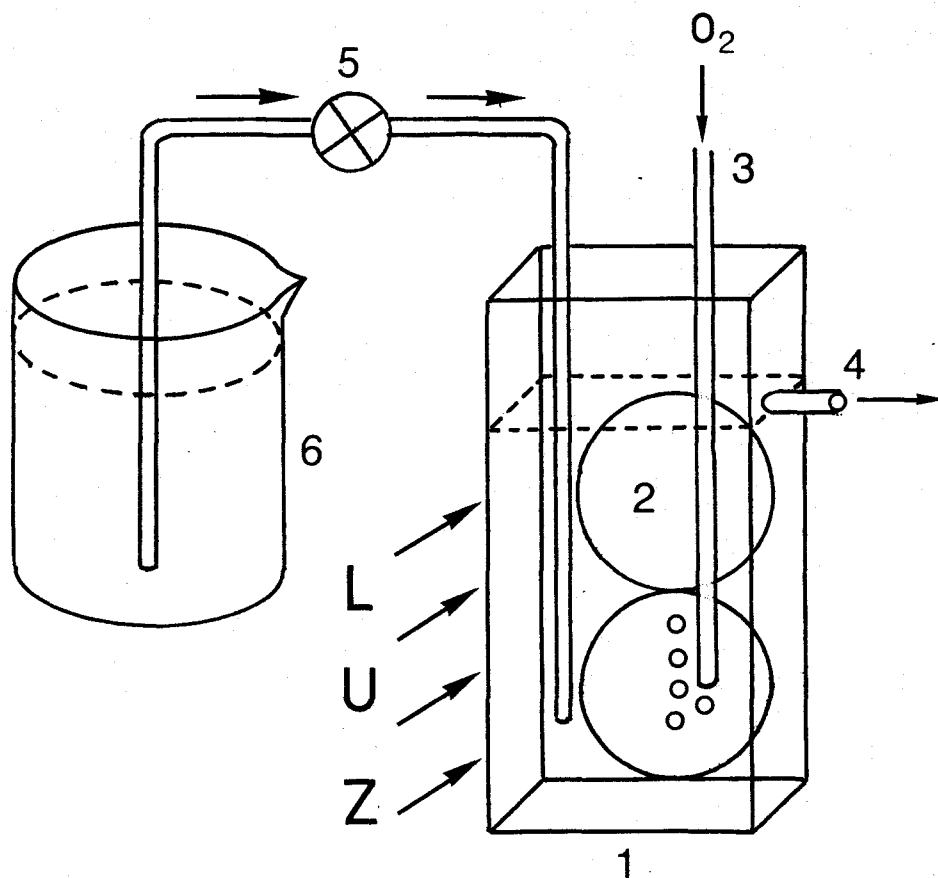


Figura 10. Sistema de flujo continuo para la producción de peróxido de hidrógeno.

1. Célula de reacción
2. Discos con el pigmento inmovilizado
3. Sistema de gaseo
4. Rebosadero
5. Bomba peristáltica
6. Reservorio conteniendo el medio de fotoproducción.

A través de la célula de reacción se hacía fluir el tampón de fotoproducción fresco, contenido en el reservorio, mediante una bomba peristáltica, mientras que el tampón con el peróxido formado en la célula se recogía mediante un rebosadero. El volumen de la mezcla de reacción se mantenía constante y aproximadamente igual a 10 ml.

B.1.2. Células para los fotosistemas químicos.

Las reacciones de producción fotoquímica de H_2O_2 en sistemas estanco se llevaron a cabo en una cubeta cilíndrica (3 cm de diámetro) de vidrio, con fondo esférico y de una capacidad aproximada de 50 ml.

En los sistemas de flujo continuo, con $Ru(bipy)_3^{2+}$ inmovilizado, se utilizó un dispositivo cuyo diseño se recoge en la Figura 10. La célula de reacción consistía en una cubeta de metacrilato transparente, de 1,8 x 4,8 x 10 cm, que contenía dos discos de plástico, sobre cuyas superficies se encontraba fijado el pigmento según se describe en el apartado A.2.2. El medio de producción fresco se introducía continuamente en la célula por bombeo desde el reservorio, mientras que el medio con el peróxido formado se recogía por un rebosadero. El volumen de la mezcla de reacción se mantenía constante y aproximadamente igual a 60 ml. La célula de reacción se gaseó con una corriente de O_2 , al mismo tiempo que se iluminaba lateralmente con luz blanca.

B.1.3. Células fotoelectroquímicas.

Un esquema del sistema de fotoproducción de H_2O_2 en células fotoelectroquímicas se presenta en la Figura 11. Se utilizaron dos cubetas de vidrio, como hemicélulas catódica y anódica, de forma y dimensiones similares a la ya descrita para el caso de los sistemas estanco. La hemicélula anódica contenía la solución con el sistema donador de electrones (flavina y sustrato donador), y fue continuamente gaseada con

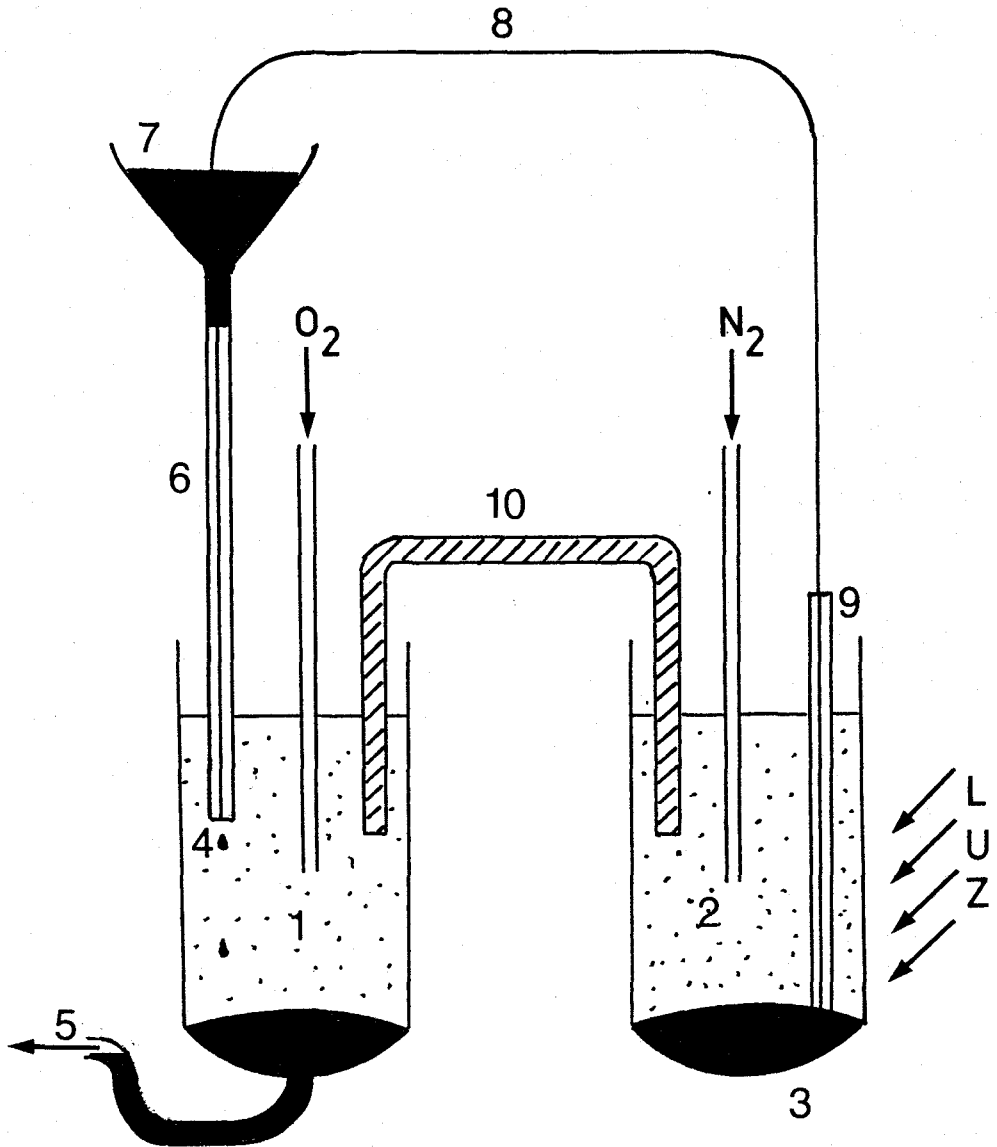


Figura 11. Esquema de una célula fotoelectroquímica para la producción de peróxido de hidrógeno.

1. Compartimento catódico
2. Compartimento anódico
3. Electrodo fijo de mercurio
4. Electrodo de gota de mercurio
5. Rebosadero
6. Capilar de vidrio
7. Reservorio de mercurio
8. Circuito externo de cobre
9. Tubo de vidrio
10. Puente salino de KCl-agar

una corriente de nitrógeno mientras se iluminaba con luz blanca. Por el contrario, en el compartimento catódico, donde el oxígeno se reduce a peróxido de hidrógeno, se hizo burbujear una corriente de O_2 . Ambas hemicélulas se conectaban mediante un cable externo de cobre que hacía de conductor entre los electrodos de cada compartimento. El circuito se cerró mediante un puente salino de KCl 3 M y agar al 2%.

Los electrodos utilizados fueron de distintos tipos. Los metales empleados en la construcción de los mismos fueron platino, plata y mercurio. Los electrodos de platino y plata eran fijos, y con una superficie de 6 cm^2 y 4 cm^2 respectivamente, encontrándose unidos al circuito exterior de cobre mediante una interfase de mercurio. Los electrodos de mercurio, por otra parte, fueron de dos tipos: de gota o fijo en el fondo (ver Figura 11).

El electrodo de gota constaba de un capilar de vidrio de 0,05 mm de diámetro inmerso en la solución de la hemicélula, a través del cual fluía el mercurio procedente de un depósito y cuya altura variable permitía regular la velocidad de formación de la gota de mercurio en el extremo del capilar, de manera que cayeran de 3-5 gotas por segundo del metal. La cubeta utilizada como hemicélula tenía una derivación lateral en el fondo (ver Figura 11) que impedía la acumulación del mercurio.

El electrodo fijo de mercurio consistía simplemente en una cantidad del metal depositada en el fondo de la cubeta, con una superficie expuesta de 7 cm^2 , y directamente en contacto con el extremo libre del circuito externo de cobre (Figura 11, compartimento anódico).

B.2. Condiciones experimentales.

B.2.1. Iluminación.

En el estudio de reacciones catalizadas por luz, se empleó como fuente de iluminación un proyector de diapositivas HANIMEX 2100 EF (España), equipado con una lámpara de wolframio-halógeno de 150 W. El haz de luz se hacía incidir perpendicularmente sobre la célula de reacción, de forma que a ésta llegara una intensidad de luz de 200 W m^{-2} . Opcionalmente, se iluminó con luz naranja, interponiendo entre la célula de reacción y la fuente de luz un filtro de dicho color (85% de transmitancia para $\lambda > 650 \text{ nm}$; 0% de transmitancia para $\lambda < 520 \text{ nm}$). Para la medida de las intensidades de iluminación se utilizó un radiómetro YSI-KETTERING 65A (EE.UU.).

B.2.2. Sistemas de gaseo.

Dependiendo del tipo de reacción a estudiar, las soluciones con los reactivos se burbujearon con gases de diferente naturaleza, a saber: nitrógeno (99,998%), oxígeno (99,998%) y dióxido de carbono (99,5%), todos ellos suministrados por la SOCIEDAD ESPAÑOLA DEL OXIGENO. En otras ocasiones, la mezcla de reacción se gaseó con una corriente de aire impulsada por una bomba peristáltica SIROCCO (España). En los experimentos realizados con aire libre de CO_2 , éste se removía haciendo circular previamente la corriente de aire a través de dos soluciones saturadas de hidróxido bórico, conectadas en serie, de tal forma que el CO_2 se eliminaba por precipitación como carbonato. En todos los casos, el flujo de gas se controló mediante un medidor de flujo de gases CENTURY MANOSTAT 100H (EE.UU.).

B.2.3. Control de pH.

En gran número de experimentos, y para evitar posibles interferencias de los tampones en las reacciones fotoquímicas,

el pH de las soluciones se controló, de forma ininterrumpida a lo largo de toda la reacción, con un pH-metro RADIOMETER (Dinamarca), equipado con un electrodo combinado METROHM AG 9100 HERISAU (Suiza). El pH era ajustado inicialmente al valor deseado por adición a la solución de pequeñas alícuotas de NaOH o HCl 1 M. Cuando en el transcurso de la reacción el pH se desviaba del valor prefijado, éste se restablecía por nuevas adiciones de las soluciones ácida o básica.

B.2.4. Temperatura.

La temperatura de la célula de reacción se mantuvo constante e igual a 25°C en todos los casos por inmersión en un baño de agua mantenido a esa temperatura mediante un aparato regulador SELECTA (España) con agitación.

C. DETERMINACIONES ANALITICAS:

C.1. Peróxido de hidrógeno.

Para la determinación del peróxido de hidrógeno formado en la célula de reacción se han utilizado dos métodos distintos, según se trabajase con sistemas químicos o biológicos. La concentración de H_2O_2 producido por vesículas tilacoidales o por partículas del PSI se determinó espectrofotométricamente midiendo la cantidad de NADH oxidado por el peróxido en una reacción catalizada por el enzima NADH-peroxidasa (De la Rosa et al., 1986). A diferentes tiempos se extrajeron de la célula de reacción alícuotas de 0,1 a 1 ml, que se añadieron a un tubo de ensayo que contenía una solución de NADH y tampón fosfato, pH 7,5, de manera que el volumen final en el tubo fue de 5 ml y las concentraciones de NADH y fosfato fuesen de 1 mM y 0,1 M, respectivamente. A continuación, se transfirieron volúmenes de 1 ml desde el tubo de ensayo a dos cubetas de cuarzo para espectrofotometría, una de las cuales se situó en el compartimento de muestra de un espectrofotómetro, mientras que a la otra cubeta se añadieron 20 mU del enzima NADH-

peroxidasa, tras lo cual se situó en el compartimento de referencia del espectrofotómetro. Después de 5 min de incubación, se midió el incremento de absorbancia a 340 nm causado por la oxidación del NADH en la referencia. La concentración del peróxido de hidrógeno se determinó comparando la absorbancia medida con una recta de calibrado previamente obtenida a partir de concentraciones conocidas de H_2O_2 .

En los estudios de sistemas fotoquímicos, la concentración de H_2O_2 se determinó siguiendo básicamente el método de Bernt-Bergmeyer (1963), más cómodo y económico pero inaplicable con muestras biológicas que interfieren en la longitud de onda de medida. A diferentes tiempos se extrajeron de la célula de reacción alícuotas entre 5 y 50 μ l de volumen, que se añadieron a un tubo de ensayo que contenía 4 ml de una solución de *o*-dianisidina 75 μ M y tampón fosfato 50 mM, pH 7,5. A continuación, se añadían 0,5 U del enzima peroxidasa y, tras una incubación de 10 min a 30°C, se midió la absorbancia a 440 nm del compuesto coloreado aparecido, correspondiente a la forma oxidada de la *o*-dianisidina. Se usó como blanco de referencia una solución que contenía todos los reactivos del test de ensayo a excepción del enzima. La concentración del peróxido se determinó comparando la absorbancia medida con una recta de calibrado, previamente obtenida a partir de concentraciones conocidas de H_2O_2 .

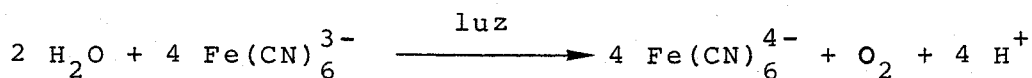
En algunos experimentos con células fotoelectroquímicas, dado el volumen de muestra extraído (hasta 1 ml), era necesario añadir antes de la peroxidasa una cantidad de HCl o NaOH suficiente para mantener el pH del tubo de ensayo en 7,5. En este caso se hicieron las correcciones necesarias para ajustar las concentraciones de los reactivos.

En ambos métodos, las rectas de calibrado se obtuvieron a partir de una solución estándar de H_2O_2 , cuya concentración había sido exactamente determinada por permanganimetría (Relimpio et al., 1977).

C.2. Oxígeno.

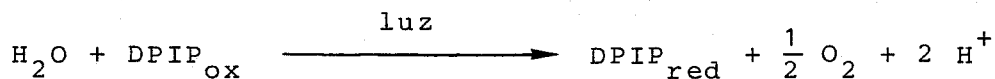
La determinación de la velocidad de consumo o desprendimiento de oxígeno, usando donadores y aceptores de electrones adecuados, tanto naturales como artificiales, constituye una buena medida de la actividad de los dos fotosistemas que componen el aparato fotosintético vegetal, ya sea de cada uno de ellos independientemente, o de los dos actuando en forma secuencial (Trebst, 1972).

La actividad fotosintética total de las vesículas tilacoidales, en la que el agua actúa como donador terminal de electrones, se determinó a partir de la velocidad de desprendimiento de oxígeno con ferricianuro como aceptor final de los mismos:



si bien también se determinó en ocasiones midiendo el consumo de oxígeno en presencia de riboflavina.

La actividad específica del fotosistema II se determinó siguiendo la velocidad de desprendimiento de oxígeno en presencia de DPIP, que actúa como aceptor de electrones en el lado reductor de este fotosistema:



Finalmente, la actividad específica del fotosistema I, ya fuera en vesículas tilacoidales o en partículas aisladas, se determinó siguiendo el consumo de oxígeno en presencia de metilviológeno, o riboflavina, como aceptor intermedio de electrones. En la célula de reacción se incluyó, además, un donador exógeno de electrones (DPIP reducido con ascorbato, por ejemplo) y azida, esta última para inhibir la actividad del enzima superóxido dismutasa y evitar así

C.4. Lumiflavina.

La concentración de lumiflavina se determinó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de las soluciones a aquellas longitudes de onda donde la flavina presenta un máximo de absorción dentro de la zona visible del espectro: 450 nm a pH 7, y 442 nm a pH 14. Los coeficientes de extinción utilizados fueron $\epsilon_{450} = \epsilon_{442} = 1,25 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Koziol, 1971).

C.5. Rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo).

La concentración de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se determinó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de las soluciones a 452 nm, donde el pigmento tiene su máximo de absorción en la zona visible del espectro. El coeficiente de extinción utilizado fue $\epsilon_{452} = 1,46 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ling y Sutin, 1976).

D. TECNICAS EXPERIMENTALES.

D.1. Espectrometría de absorción ultravioleta/visible.

D.1.1. Medidas de absorbancia.

Las determinaciones colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP8-150 UV/VIS (Gran Bretaña), dotado de lectura digital. Las cubetas utilizadas normalmente fueron de cristal o plástico, si bien se usaron cubetas de cuarzo para medidas a longitudes de onda inferiores a 340 nm. En todos los casos las cubetas fueron de 1 cm de paso de luz y 1 ml de capacidad.

D.1.2. Espectros de absorción ultravioleta/visible.

Los espectros de absorción se registraron a temperatura ambiente. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y 1 ml de capacidad. Los espectros se realizaron frente a un blanco adecuado como referencia. Se empleó un espec-

trofotómetro PYE UNICAM SP8-150 UV/VIS (Gran Bretaña) con registrador incorporado. Antes de realizar un espectro se registraba la línea base del aparato. La anchura del haz fue siempre de 1 nm.

D.2. Espectrometría de emisión: medidas de luminiscencia.

Los estudios de luminiscencia se realizaron en un equipo PERKIN-ELMER (Gran Bretaña), consistente en un espectrofluorímetro modelo LS-5, una estación de datos modelo 3600 y una impresora. Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y 4 ml de capacidad. La anchura del haz, tanto de excitación como de emisión, se fijó en 2,5 nm. En algunos experimentos la muestra se mantuvo en condiciones anaeróbicas o se saturó de oxígeno haciendo pasar una corriente de N_2 u O_2 , respectivamente, sobre la superficie de la muestra durante 1 h antes de realizar las medidas de luminiscencia.

La disminución de la luminiscencia de un pigmento, en presencia de un agente amortiguador, viene descrita por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

de donde se deduce que $K_{sv} = k_q \tau_0$, siendo K_{sv} la constante de Stern-Volmer, k_q la constante de velocidad de la reacción bimolecular entre el estado luminiscente y el agente amortiguador, y τ_0 el tiempo de vida del estado excitado. I_0 e I son las intensidades de emisión de luminiscencia en ausencia y presencia, respectivamente, del agente amortiguador a la concentración $[Q]$. La representación de I_0/I frente a $[Q]$ es una recta cuya pendiente es igual a K_{sv} .

D.3. Espectrometría de excitación por láser.

La técnica de excitación con láser permite conseguir altas concentraciones de intermediarios químicos inestables (estados excitados o radicales), mediante la irradiación de una muestra con un corto e intenso pulso de luz láser monocromática. La concentración de las distintas especies formadas puede ser medida, en función del tiempo transcurrido tras el pulso láser, gracias al uso de distintos métodos de observación, siendo uno de los más utilizados el uso de un segundo flash sincronizado de luz blanca proveniente de una fuente de luz de análisis, que permite observar, en unión del equipo adecuado, la absorción diferencial del estado transiente respecto al estado basal a una longitud de onda determinada.

D.3.1. Descripción del aparato.

El sistema de espectrofotometría de excitación por láser, empleado en el estudio de las reacciones fotoquímicas productoras de peróxido de hidrógeno, se describe básicamente en la Figura 12, y fue suministrado por APPLIED PHOTOPHYSICS (Gran Bretaña). El sistema consta de un láser de rubí (modelo 2000, JK LASERS, Gran Bretaña) capaz de emitir pulsos de luz de 347 nm de 100 mJ de energía y de 20-30 ns de duración. La luz de análisis la suministra una lámpara de arco de Xenón de 250 W, capaz de producir un flash de luz blanca a una intensidad constante durante 500 μ s después del pulso del láser. La lámpara consta, asimismo, de una unidad de suplemento y estabilización de alimentación eléctrica (IREM, Italia), y de una unidad de pulsación que produce incrementos en la luz emitida por la lámpara de Xe de hasta 1,5 ms de duración. El pulso de luz de la lámpara de Xe ocurre de forma sincronizada con el disparo láser, de tal manera que los cambios inducidos en la muestra por el mismo tienen lugar en el período de tiempo donde la pulsación de la lámpara alcanza su máxima estabilidad e intensidad (ver Figura 13).

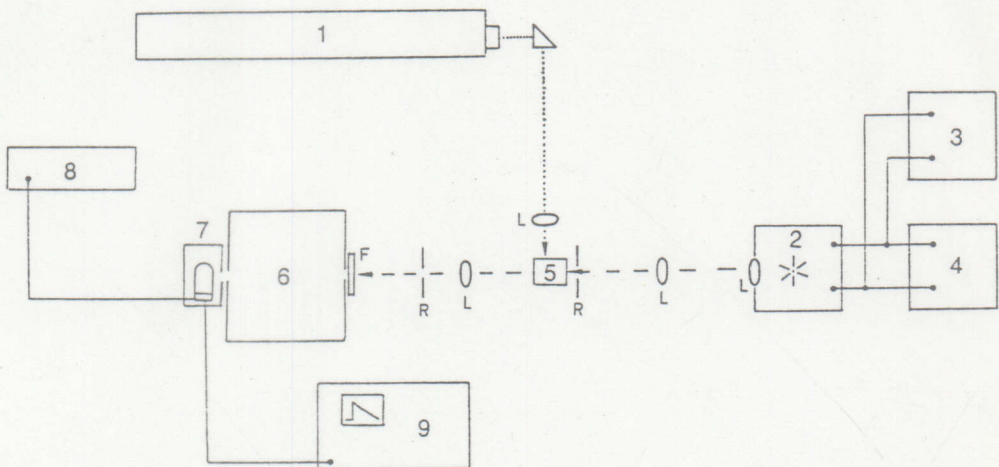
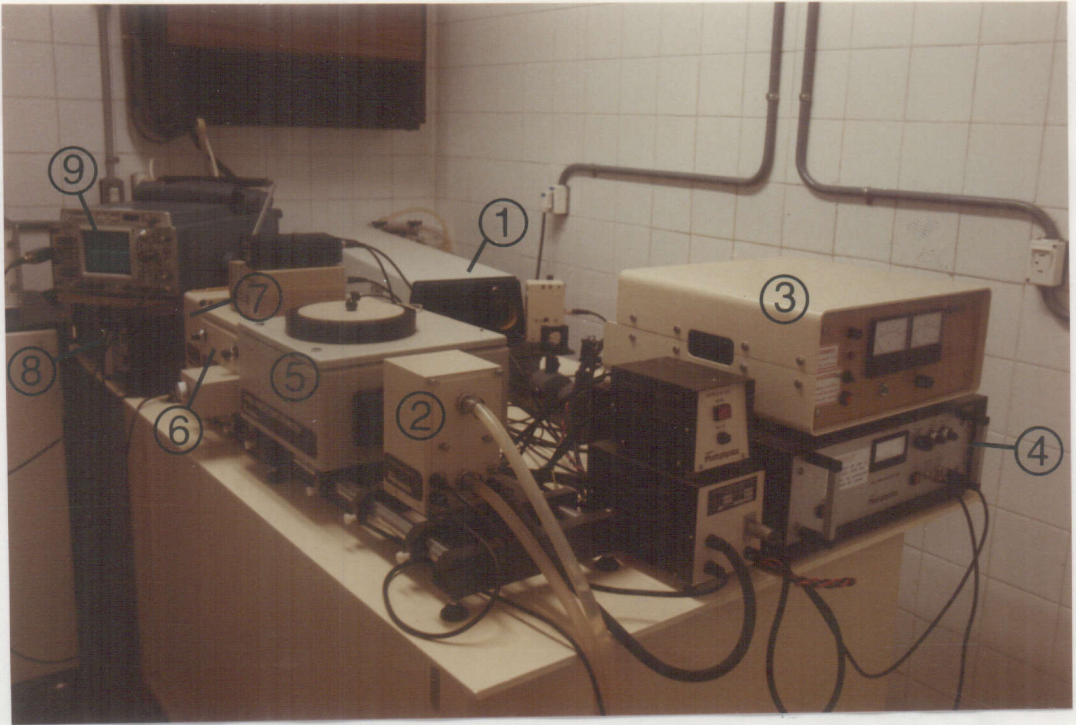


Figura 12. Equipo de espectrofotetría de excitación por láser.

1. Cañón láser
2. Lámpara de arco de Xe
3. Fuente de alimentación de la lámpara de Xe
4. Unidad de pulsación de la lámpara de Xe
5. Compartimento de muestra
6. Monocromador
7. Fotomultiplicador
8. Fuente de alimentación del fotomultiplicador
9. Osciloscopio

L: lente; R: rendija

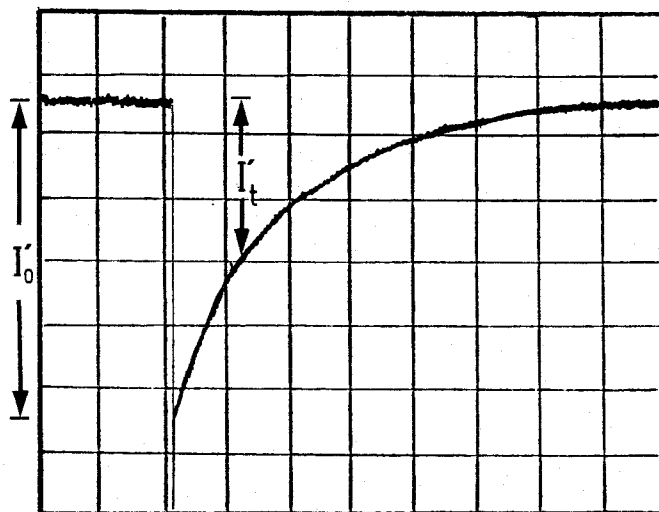
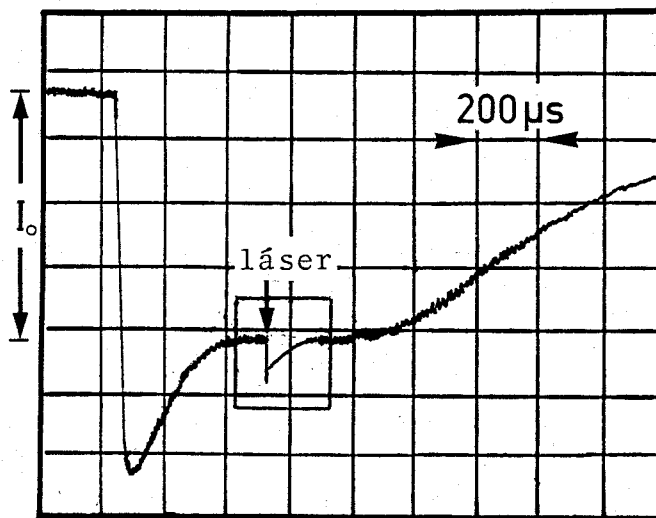


Figura 13. Registro en el osciloscopio mostrando el perfil del pulso de la lámpara de Xe y donde tiene lugar el disparo del láser.

Arriba se representa la variación en la intensidad de luz recogida en el osciloscopio durante el pulso de la lámpara de Xe. Donde se indica tiene lugar el disparo del láser. Abajo se presenta una cinética de desaparición de un estado excitado tras el pulso láser. I_0 , intensidad inicial o basal recogida en el osciloscopio; I_0' , incremento tras la excitación por láser, respecto de la intensidad basal, a tiempo cero; I_t' , incremento de la intensidad a tiempo t .

El pulso láser y la luz de análisis inciden perpendicularmente entre sí y sobre el compartimento donde se sitúa la cubeta con la muestra a analizar. La luz de análisis, después de atravesar la muestra, incide sobre un monocromador, que selecciona la longitud de onda de medida, y, finalmente, sobre un fotomultiplicador, conectado a su vez a un osciloscopio (TEKTRONIX, modelo 468, EE.UU.) con posibilidad de almacenaje digital de datos, donde se recogen los cambios en la transmisión de la muestra con el tiempo.

Las cubetas utilizadas eran de cuarzo, de 5 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz, manteniéndose en condiciones anaeróbicas o saturadas de oxígeno, según los casos, haciendo pasar a su través una corriente de N_2 u O_2 , respectivamente, durante una hora antes de someterlas a la excitación con el láser.

D.3.2. Cálculo de las densidades ópticas.

El aumento o disminución de la densidad óptica, D.O., de las muestras, tras su excitación con el láser, viene dado por la ecuación:

$$D.O. = \log \frac{I_0}{I_0 - I'}$$

donde I_0 es la intensidad, en mV, medida en el osciloscopio como diferencia entre el trazo registrado en oscuridad y durante la pulsación de la lámpara de Xe justo antes de la excitación con el pulso de láser. I' es, por otra parte, la intensidad, también en mV, medida en el osciloscopio como diferencia entre el trazo registrado justo antes de la excitación con el láser y el trazo registrado a un tiempo cualquiera, t , tras la misma (ver Figura 13). La densidad óptica de las muestras se determinó midiendo I_0 durante la pulsación de la lámpara de Xe manteniendo apagado el láser, y midiendo, posteriormente, I' a distintos tiempos tras la excitación con láser.

D.3.3. Parámetros cinéticos.

Tras el pulso de láser, la absorción de la luz de excitación por parte de un pigmento produce una alta concentración de moléculas del mismo en su estado excitado. Esta población de moléculas excitadas generalmente cae, o desaparece, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

donde N_t y N_0 son el número de moléculas excitadas del pigmento a tiempo t y cero, respectivamente, tras la excitación por láser; k es la constante de velocidad de primer orden de la reacción de desaparición del estado excitado. El cálculo experimental de la constante k se lleva a cabo representando el logaritmo neperiano de la absorbancia diferencial de la muestra, a aquellas longitudes de onda donde absorbe el estado excitado, frente al tiempo transcurrido tras la excitación. Teniendo en cuenta que la absorbancia es proporcional al número de moléculas excitadas, esta representación conduce a una recta cuya pendiente es el valor de la constante k . Un cálculo similar permite determinar el valor de la constante de velocidad de (pseudo)-primer orden de la reacción de recuperación del estado basal del pigmento.

El tiempo de vida, τ , del estado excitado se define como el tiempo medio que el pigmento permanece en el estado excitado antes de volver al estado basal. Cuando $t = \tau$, entonces $N_0/N_t = e$, es decir, el 63% de las moléculas han regresado ya al estado fundamental, mientras que el 37% todavía permanecen excitadas. El tiempo de vida, τ , es igual al inverso de la constante de velocidad:

$$N_0/N_t = e = e^{k\tau} \rightarrow \tau = 1/k$$

Existe una gran cantidad de sustancias que son capaces de interactuar con los estados excitados de las moléculas

las, impidiendo que éstas se desactiven con emisión de luz. Son las llamadas sustancias amortiguadoras de la luminiscencia —ya sea fluorescencia o fosforescencia—. El resultado es que en presencia de un amortiguador la cinética de caída del estado excitado del pigmento —que según acabamos de describir suele ser de primer orden— se acelera y pasa a ser de (pseudo)-primer orden. A partir de ambas cinéticas se puede calcular la constante de velocidad de la reacción bimolecular, k_q , entre el pigmento en su estado excitado y la sustancia amortiguadora, Q , de acuerdo con la siguiente expresión:

$$k_q = \frac{k - k_0}{[Q]}$$

donde k_0 y k son las constantes de velocidad de primer orden de la reacción de desaparición del estado excitado en ausencia y presencia, respectivamente, de una concentración determinada del compuesto Q .

D.4. Potenciometría redox.

D.4.1. Célula de reacción.

Las determinaciones potenciométricas con sistemas flavínicos se llevaron a cabo en una cubeta cilíndrica de 10 ml de capacidad. La célula constaba de una doble pared, que formaba una cámara alrededor de la célula propiamente dicha, y por la que circulaba una corriente de agua a 25°C. Un esquema de la célula de reacción, así como del sistema de medida del potencial de las soluciones, se recoge en la Figura 14.

D.4.2. Medida del potencial redox.

La mezcla de reacción, conteniendo lumiflavina y semicarbazida, se gaseaba con N_2 durante 45 min antes de comenzar su irradiación. El pH de la muestra se controló continuamente mediante un electrodo conectado a un pH-metro, y se mantuvo

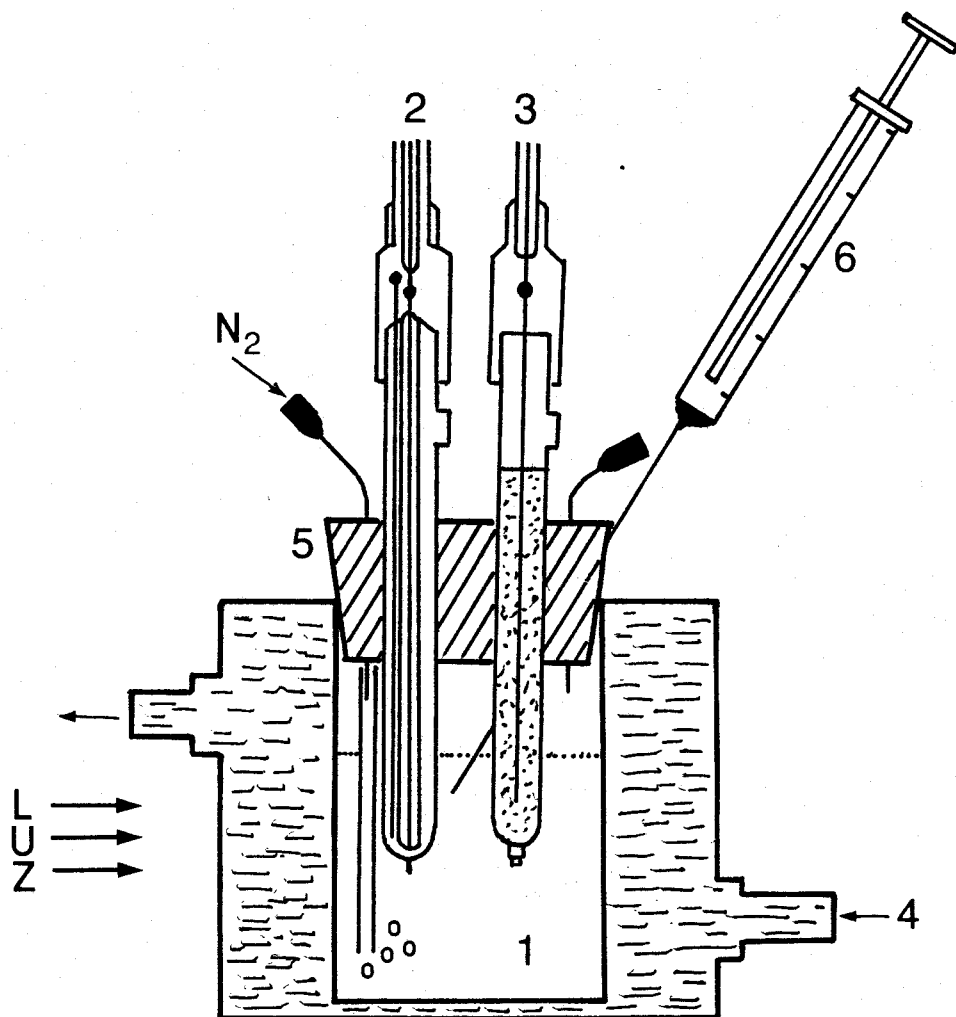


Figura 14. Sistema empleado para las determinaciones potenciométricas de soluciones flavínicas.

1. Mezcla de reacción
2. Electrodo de potencial
3. Electrodo de pH
4. Corriente de agua
5. Tapón
6. Jeringa

en los valores deseados por adición de pequeñas alícuotas de soluciones concentradas de NaOH o HCl. El potencial redox de las soluciones se midió y se registró continuamente con un electrodo combinado INGOLD de Pt-Ag/AgCl (Suiza) conectado a un potenciómetro digital BECKMAN 4500 (EE.UU.), previamente calibrado con una solución saturada de quinhidrona a pH 7 ($E'_{O, pH 7} = 280 \text{ mV}$), y a su vez conectado a un registrador VARIAN 9176 (EE.UU.).

Una vez el potencial redox estabilizado tras la iluminación de la solución, ésta se puso en condiciones de oscuridad y se inyectó en la célula de reacción 1 ml de aire con una jeringa, registrándose entonces el aumento del potencial redox.

E. REACTIVOS.

E.1. Procedencia de los reactivos.

Todos los productos que se utilizaron en este trabajo tenían una pureza de grado analítico. Los siguientes productos se obtuvieron de MERCK (Alemania Occidental): azida sódica, ácido clorhídrico, cloruro amónico, cloruro magnésico, cloruro potásico, etanol, ferricianuro potásico, fosfatos mono- y di-sódicos, fosfatos mono- y di-potásicos, hidroxilamina, hidróxidos sódico y potásico, mercurio, peróxido de hidrógeno, permanganato potásico, quinhidrona, sacarosa y semicarbazida.

De SIGMA (EE.UU.) procedían: ascorbato sódico, catalasa, cisteína, digitonina, duroquinona, DPIP, DTE, DTT, EDTA, flavínmononucleótido, glutatión, lumicromo, lumiflavina, metilviológeno, NADH, NADH-peroxidasas, naranja de acridina, o-dianisidina, peroxidasas, PMS, procion rojo, riboflavina, safranina, seroalbúmina bovina, sorbitol, TES, TMPD, Tricina y Tris.

El ácido perclórico, bicarbonato sódico e hidróxido bórico se obtuvieron de PANREAC (España). La acetona, de SCHARLAU (España); el agar, de DIFCO (EE.UU.); el Nafion, de DuPONT (EE.UU.); y el CMU, de SERVA (Alemania Occidental). El $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se obtuvo de CARLO ERBA (Italia).

Los siguientes productos se obtuvieron de ALDRICH (Bélgica): 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 2-sulfonatoantraquinona.

Las flavinas sintéticas 10-dodecilisoaloxacina, N^{10} -tetrabutiratorriboflavina, 3-metil,10-dodecilisoaloxacina y N^{10} -tetraacetatorriboflavina fueron amablemente cedidas por el Dr Paul F. Heelis (Gran Bretaña).

E.2. Preparación de los reactivos.

Riboflavina, lumiflavina, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y, en general, los compuestos utilizados como pigmentos fotosensibilizadores, se prepararon a concentración elevada, guardándose en frío y oscuridad hasta el momento de su uso. La peroxidasa, catalasa, NADH y NADH-peroxidasa, se prepararon también en soluciones concentradas, que contenían, además, tampón fosfato 50 mM, pH 7,5, y se guardaron en frío hasta su utilización. La quinhidrona se preparó en tampón comercial Titrisol (pH 7).

La semicarbazida, cuando se utilizó a concentración elevada, se preparó en agua destilada y posteriormente se neutralizó con NaOH.

CMU, o-dianisidina, duroquinona, 2-sulfonatoantraquinona, 10-dodecilisoaloxacina, N^{10} -tetrabutiratorriboflavina, 3-metil,10-dodecilisoaloxacina y N^{10} -tetraacetatorriboflavina se prepararon en etanol.

El silicato de magnesio se obtuvo por precipitación del silicato sódico (MERCK) con cloruro de magnesio.

III. RESULTADOS.

A. PRODUCCION FOTOBIOLOGICA DE PEROXIDO DE HIDROGENO

A.1. Producción de peróxido de hidrógeno por vesículas tilacoidales de espinaca.

A.1.1. Efecto de la adición de distintos mediadores redox.

Como se citó en la Introducción, los cloroplastos aislados y las vesículas tilacoidales pueden fotoproducir peróxido de hidrógeno por reducción del oxígeno molecular con los electrones suministrados por su propio aparato fotosintético, lo que se ha dado en llamar "reacción de Mehler" (Good y Hill, 1955; Mehler, 1951). Está asimismo descrito en la literatura que la adición de ciertos mediadores redox, como viológenos, flavinas o quinonas, incrementa la tasa de reducción del oxígeno y potencia, consiguientemente, la reacción de Mehler (Allen, 1977; De la Rosa *et al.*, 1986; Elstner, 1982). Estos compuestos actúan como intermediarios redox que transfieren electrones desde el sitio reductor del fotosistema I al oxígeno, que es reducido hasta radical superóxido (O_2^-), el cual, a su vez, sufre una reacción de dismutación cuyo producto final es el peróxido de hidrógeno (Allen, 1977).

Es por ello que, con vistas al aprovechamiento de la energía solar mediante la producción de peróxido de hidrógeno por el aparato fotosintético de plantas, se llevó a cabo, en primer lugar, una selección del mediador redox que actúa con una mayor eficiencia en potenciar la producción de H_2O_2 en preparaciones de vesículas tilacoidales obtenidas a partir de hojas de espinaca. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla I, donde se presentan las velocidades iniciales de producción y los niveles finales de peróxido de hidrógeno que se alcanzan en presencia de distintos mediadores redox. Entre los distintos compuestos ensayados, varios de ellos han permitido obtener altas velocidades de produc-

TABLA I

FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR TILACOIDES DE
ESPINACA EN PRESENCIA DE DISTINTOS MEDIADORES REDOX

Mediador	velocidad inicial de producción ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg (chl)}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	concentración final ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$)
ninguno	0,25	66
5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona	0,23	27
duroquinona	0,30	78
2-sulfonatoantraquinona	1,65	136
metilviológeno	3,20	193
lumicromo	0,15	40
10-dodecilisoaloxacina	0,28	57
N ¹⁰ -tetrabutiratorriboflavina	0,33	58
3-metil,10-dodecilisoaloxacina	0,48	68
flavínmononucleótido	2,20	200
N ¹⁰ -tetraacetatorriboflavina	2,50	176
lumiflavina	2,83	235
riboflavina	4,27	270

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 0,5 mg) en 30 ml del tampón de fotoproducción suplementado con el mediador redox indicado, a la concentración de 10 μM , y azida 5 mM. La suspensión se iluminó con luz blanca de 200 Wm^{-2} y se gaseó con aire a razón de 0,1 l min^{-1} . A intervalos regulares de tiempo, se sacaron pequeñas alícuotas para determinar la velocidad de producción de peróxido de hidrógeno, así como la concentración final de H_2O_2 una vez estabilizada la producción.

ción de H_2O_2 así como elevadas concentraciones del peróxido. Entre los más eficaces -2-sulfonatoantraquinona, metilviológeno y varias flavinas- destaca la riboflavina, en presencia de la cual en cantidades catalíticas ($10 \mu M$) se alcanza una velocidad inicial de generación de H_2O_2 de hasta $4,27 \mu mol mg(chl)^{-1} min^{-1}$ y una concentración final de peróxido de casi $300 \mu M$. Teniendo en cuenta, por tanto, estos resultados, el resto de los estudios de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por el aparato fotosintético de espinacas se llevaron a cabo en presencia de riboflavina a la concentración indicada.

A.1.2. Estudios cinéticos en presencia de riboflavina.

En la Figura 15 se presenta una cinética típica de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por vesículas tilacoidales de espinaca en presencia de riboflavina. Como puede verse, la adición de riboflavina induce un considerable aumento, en comparación con los resultados obtenidos en ausencia del mediador, tanto en la velocidad de producción como en la concentración final de peróxido formado. Por otra parte, la adición de CMU, conocido agente inhibidor del flujo fotosintético de electrones entre los dos fotosistemas, inhibe la reacción de generación de H_2O_2 , lo que indica que los electrones necesarios para la reducción del O_2 a peróxido de hidrógeno provienen, en última instancia, de la molécula de agua a través del fotosistema II.

De igual manera, la adición de riboflavina estimula el consumo fotosintético de oxígeno por las vesículas tilacoidales (Figura 16), el cual es 10 veces superior en presencia del mediador redox pero se inhibe totalmente cuando se añade CMU, lo que nuevamente indica que la reducción del oxígeno tiene lugar a partir de electrones suministrados por

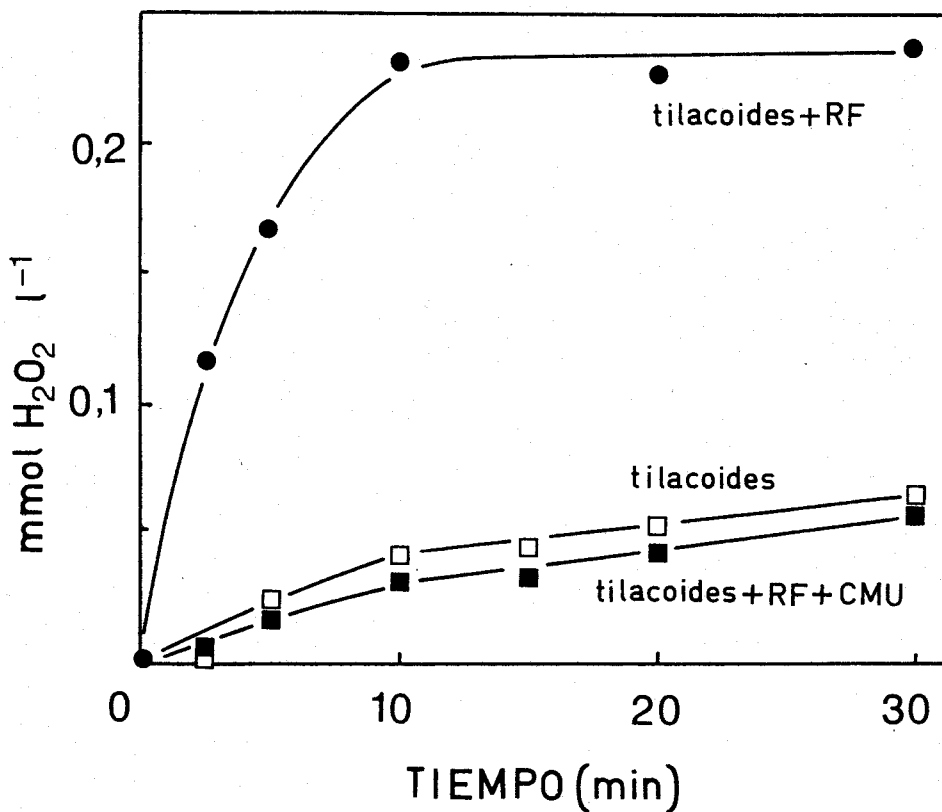


Figura 15. Cinéticas de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por tilacoides de espinaca.

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 0,5 mg) en un volumen final de 30 ml del tampón de fotoproducción que, donde se indica, se suplementó con riboflavina 10 μM , azida 5 mM y/o CMU 10 μM . La reacción fotoquímica comenzó al irradiar con luz blanca de 200 W m^{-2} la suspensión tilacoidal, que simultáneamente se gaseó con un flujo de aire de 0,1 l min^{-1} . A los tiempos indicados se sacaron pequeñas alícuotas para determinar la cantidad de H_2O_2 formado.

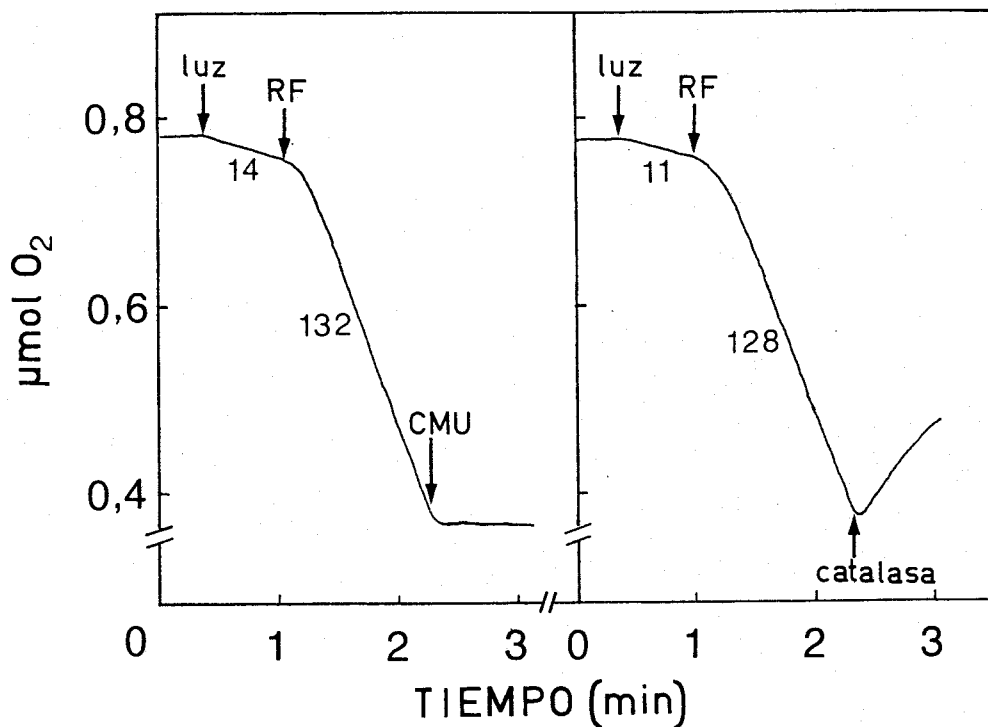


Figura 16. Efecto de la adición de riboflavina sobre el consumo fotosintético de oxígeno por tilacoides de espinaca.

La célula de reacción, que contenía una suspensión de tilacoides (clorofila total, 0,15 mg) en 3 ml del tampón de fotoproducción, se irradió con luz blanca de 300 W m^{-2} . Donde se indica, se añadió riboflavina $10 \mu\text{M}$, CMU $10 \mu\text{M}$ o 10 unidades de catalasa. Los valores de las pendientes expresan el consumo fotosintético de O_2 en $\mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

la fotooxidación de la molécula de agua. Por otra parte, la adición de catalasa —enzima que específicamente cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno— revierte el consumo de oxígeno, provocando, por el contrario, un desprendimiento del mismo, lo que viene a corroborar que es el peróxido de hidrógeno el producto final de la reducción fotosintética del oxígeno.

A.1.3. Efecto de la introducción de electrones a nivel del fotosistema I.

La producción de peróxido de hidrógeno por el sistema vesículas tilacoidales/riboflavina se detiene al cabo de aproximadamente 10 min de reacción, como se recoge en la Figura 17. Sin embargo, la adición de ascorbato y DPIP, conocido sistema exógeno donador de electrones al nivel del fotosistema I, provoca que la formación de H_2O_2 se reanude de nuevo, lo que sugiere que la parada anterior en la producción del peróxido se debe a una pérdida de la actividad del fotosistema II —descrito con anterioridad como la parte más lábil e inestable del aparato fotosintético (Gisby et al., 1982; Morris et al., 1982; Santos y Hall, 1982)—. Estos resultados y los presentados en la Figura 18 —donde puede apreciarse que el consumo fotosintético de oxígeno por vesículas tilacoidales en presencia de riboflavina se acelera del orden de tres veces por la adición de ascorbato y DPIP— demuestran que el sitio donador para la reducción del oxígeno se sitúa a nivel del fotosistema I, actuando el fotosistema II, en ausencia de un sistema donador exógeno, meramente como fuente de electrones para el fotosistema I, que es el que en última instancia lleva a cabo la reducción del O_2 .

Una vez comprobado el incremento en la producción de peróxido de hidrógeno tras la adición de un donador exógeno de electrones, se procedió a ensayar otros conocidos donadores del fotosistema I, a fin de optimizar la producción

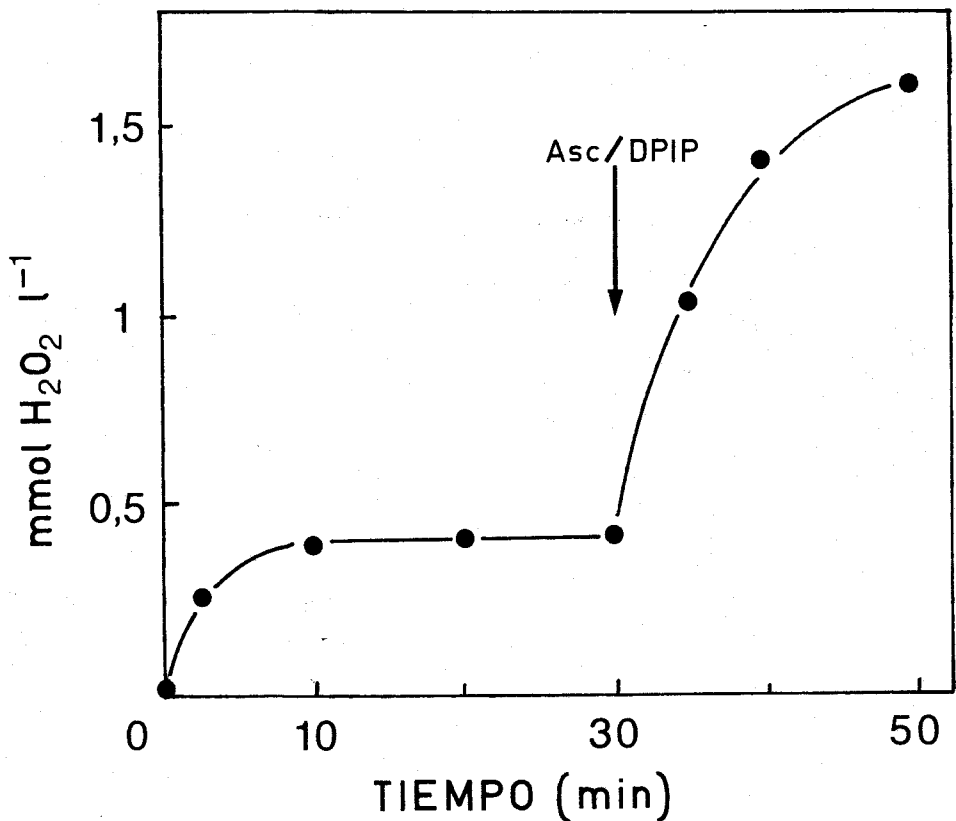


Figura 17. Efecto de la adición de ascorbato y DPIP sobre la producción de peróxido de hidrógeno por tilacoides de espinaca en presencia de riboflavina.

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 0,5 mg) en un volumen final de 30 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μM y azida 5 mM. Donde se indica, se añadió ascorbato 5 mM y DPIP 60 μM . El sistema se gaseó con aire a razón de 0,1 l min⁻¹ y se iluminó con luz naranja de 100 W m⁻².

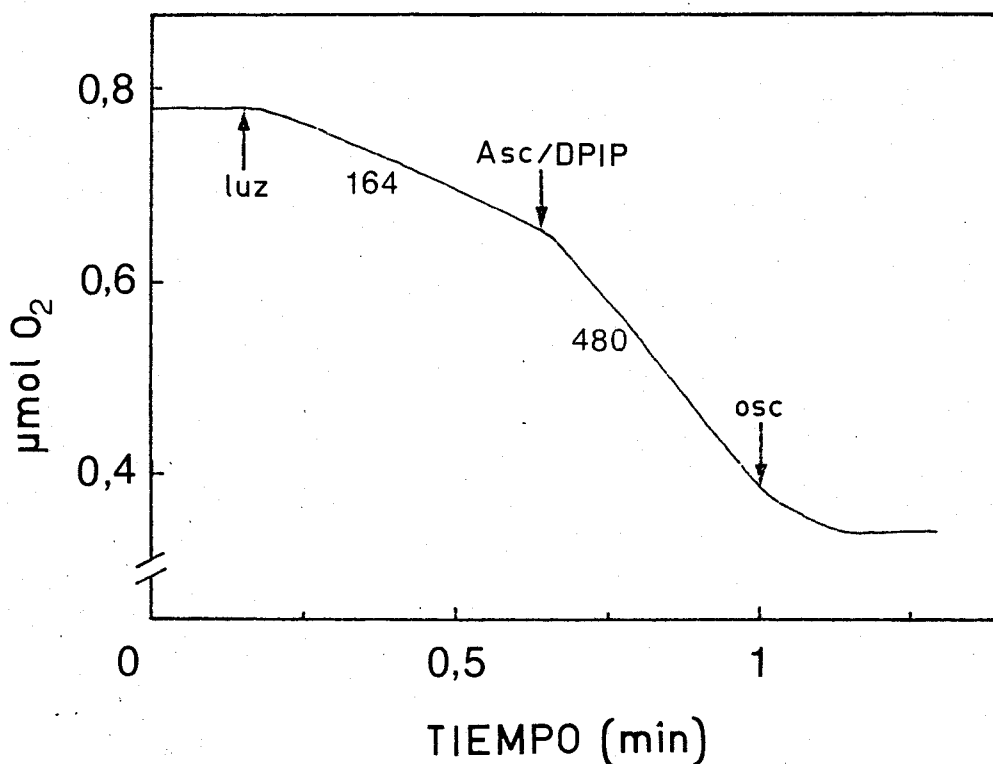


Figura 18. Efecto de la adición de ascorbato y DPIP sobre el consumo fotosintético de oxígeno por tilacoides de espinaca en presencia de riboflavina.

La célula de reacción, que contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 50 μg) en 3 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μM , se irradió con luz naranja de 150 W m^{-2} . Donde se indica, se añadió ascorbato 5 mM y DPIP 60 μM . Los valores de las pendientes expresan el consumo fotosintético de O_2 en $\mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

de H_2O_2 . Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla II, en la que puede apreciarse que, entre los diversos sistemas ensayados, el TMPD reducido con DTE permite obtener los valores más altos de reducción de oxígeno, medida como desaparición del mismo en el electrodo de O_2 .

En la Figura 19 se recogen las cinéticas de producción de H_2O_2 con varios donadores de electrones del foto sistema I, destacando de nuevo el nivel de producción que se alcanza con el sistema DTE/TMPD ($1,2 \text{ mmol } H_2O_2 \text{ l}^{-1}$). Asimismo, la formación del peróxido, al contrario de lo que ocurre cuando es el agua el donador final de electrones, seman tiene incluso al cabo de 20 min de reacción.

A.1.4. Inmovilización de las vesículas tilacoidales en agar. Producción en un sistema de flujo continuo.

Como se indicó en la Introducción, la inmovilización o el microencapsulamiento de cloroplastos o membranas tilacoidales en distintas matrices —alginato, agar, geles, albúmina— es un método comúnmente utilizado para aumentar la estabilidad de las membranas fotosintéticas (Cocquempot et al., 1981; De la Rosa et al., 1986; Gisby y Hall, 1980; Rao y Hall, 1984). Con el doble fin, pues, de mejorar la estabilidad de las vesículas tilacoidales y de alargar, por tanto, el tiempo de producción de peróxido de hidrógeno, se han lle vado a cabo algunos estudios con vesículas fijadas en agar.

En la Figura 20 se puede observar que la inmoviliza ción de las vesículas tilacoidales en agar permite alargar el período de generación de peróxido de hidrógeno, en un sis tema estanco y en presencia de riboflavina y del sistema DTE/TMPD, hasta 60 min. Los niveles de H_2O_2 que se alcanzan en este sistema son similares a los obtenidos con las vesícu

TABLA II

REDUCCION FOTOSINTETICA DE OXIGENO POR TILACOIDES DE ESPINACA, EN PRESENCIA DE RIBOFLAVINA, CON ELECTRONES CEDIDOS POR UN SISTEMA DONADOR EXOGENO

Sistema donador	Consumo de oxígeno ($\mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Ascorbato/DPIP	470
Cisteína/DPIP	190
Cisteína/TMPD	355
DTE/DPIP	520
DTE/TMPD	575
DTT/DPIP	450
DTT/TMPD	515
Glutación/DPIP	64
Glutación/TMPD	160

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 0,15 mg) em 3 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μM , CMU 7 μM y el sistema donador de electrones a las siguientes concentraciones: 5 mM (ascorbato, cisteína, DTE, DTT, glutación) y 60 μM (DPIP, TMPD). La reacción de reducción fotosintética de oxígeno comenzó al irradiar la suspensión tilacoidal con luz naranja de 150 Wm^{-2} .

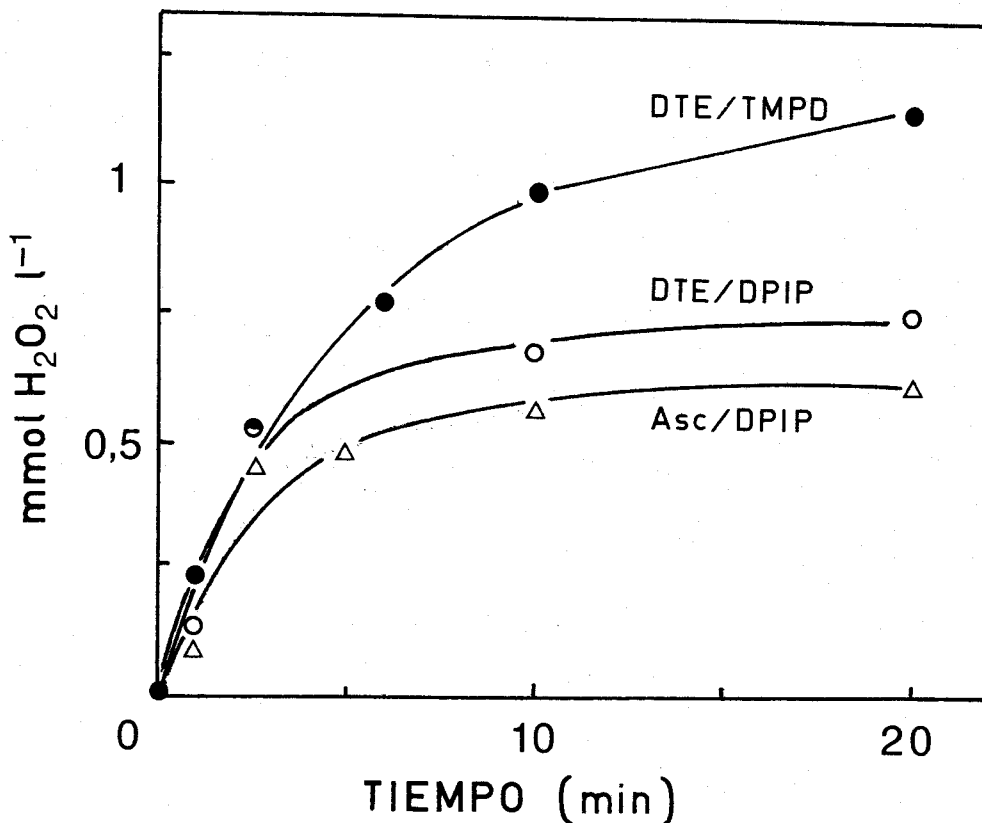


Figura 19. Cinéticas de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por tilacoides de espinaca con distintos sistemas exógenos donadores de electrones.

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales (clorofila total, 0,5 mg) en un volumen final de 30 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μM , azida 5 mM, CMU 10 μM y el sistema donador indicado a las siguientes concentraciones: 5 mM (ascorbato, DTE) y 60 μM (DPIP, TMPD). La suspensión tilacoidal se gaseó con aire a razón de 0,1 l min⁻¹ y se iluminó con luz naranja de 100 W m⁻².

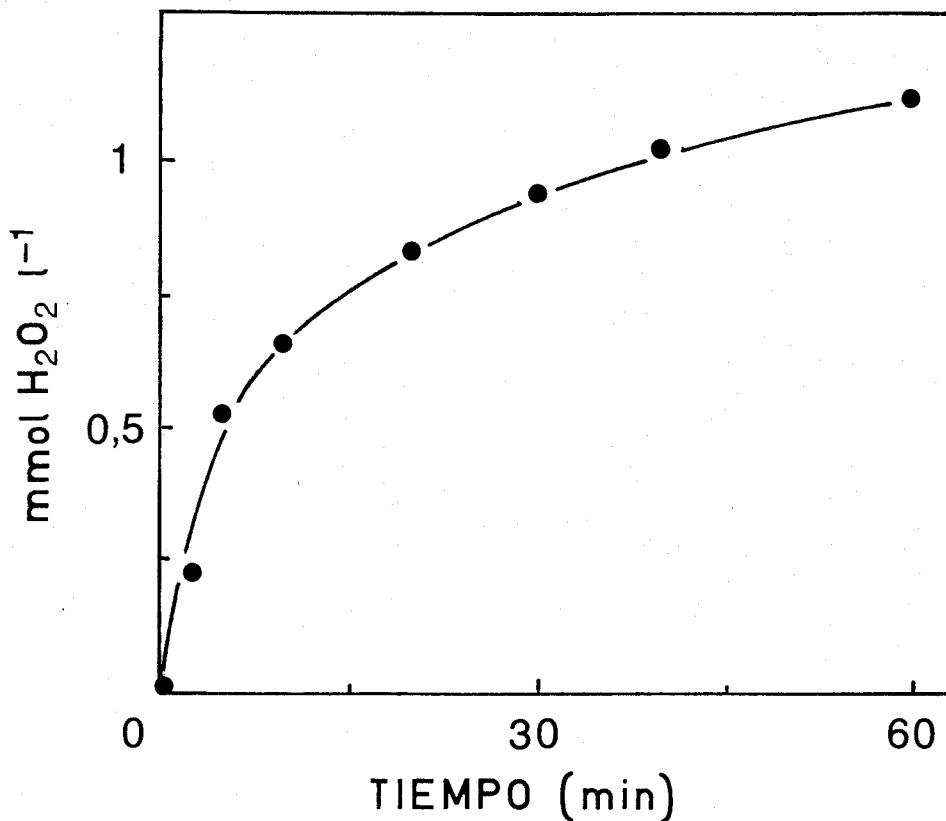


Figura 20. Producción de peróxido de hidrógeno en un sistema cerrado por tilacoides de espinaca inmovilizados en agar.

La célula de reacción contenía una suspensión de vesículas tilacoidales inmovilizadas en agar (clorofila total, 3 mg) en 30 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μ M, DTE 5 mM, TMPD 60 μ M, azida 5 mM y CMU 10 μ M. La célula de reacción se gaseó con aire a razón de 0,1 l min⁻¹ y se iluminó con luz naranja de 100 W m⁻².

las libres, si bien hay que señalar que en estos experimentos con membranas inmovilizadas, la cantidad de vesículas tilacoidales presentes en el sistema equivale a una cantidad de clorofila seis veces mayor a la utilizada en el caso de vesículas no fijadas.

Por otra parte, la inmovilización de las membranas fotosintéticas permite el diseño de sistemas de flujo continuo en los que el producto final, en este caso el peróxido de hidrógeno, es continuamente extraído de la célula de reacción, lo que, en el caso particular del H_2O_2 , presenta la ventaja adicional de evitar la exposición de las membranas a altas concentraciones de este compuesto. En la Figura 21 se recoge una cinética de producción de peróxido de hidrógeno en un sistema de flujo continuo, cuyo diseño se describe en Materiales y Métodos, con vesículas tilacoidales inmovilizadas en agar, en presencia de riboflavina y con el sistema DTE/TMPD como fuente de electrones. Como se puede apreciar en la figura, la actividad de generación de H_2O_2 con este sistema se mantiene durante al menos 4 horas, sin que se observe al cabo de este tiempo una disminución significativa de la velocidad de formación del peróxido.

A.2. Producción de peróxido de hidrógeno por partículas aisladas del fotosistema I.

Se ha estudiado también la producción de peróxido de hidrógeno mediada, no por el fotosistema I integrado en vesículas tilacoidales, sino por partículas purificadas de este fotosistema. Después del proceso de extracción de las partículas, éstas no manifiestan actividad apreciable asociada al fotosistema II, y sí una considerable actividad asociada al fotosistema I, medida como consumo de O_2 , que oscila entre 1200 y 1700 $\mu\text{mol } O_2 \text{ mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, muy superior a la ac-

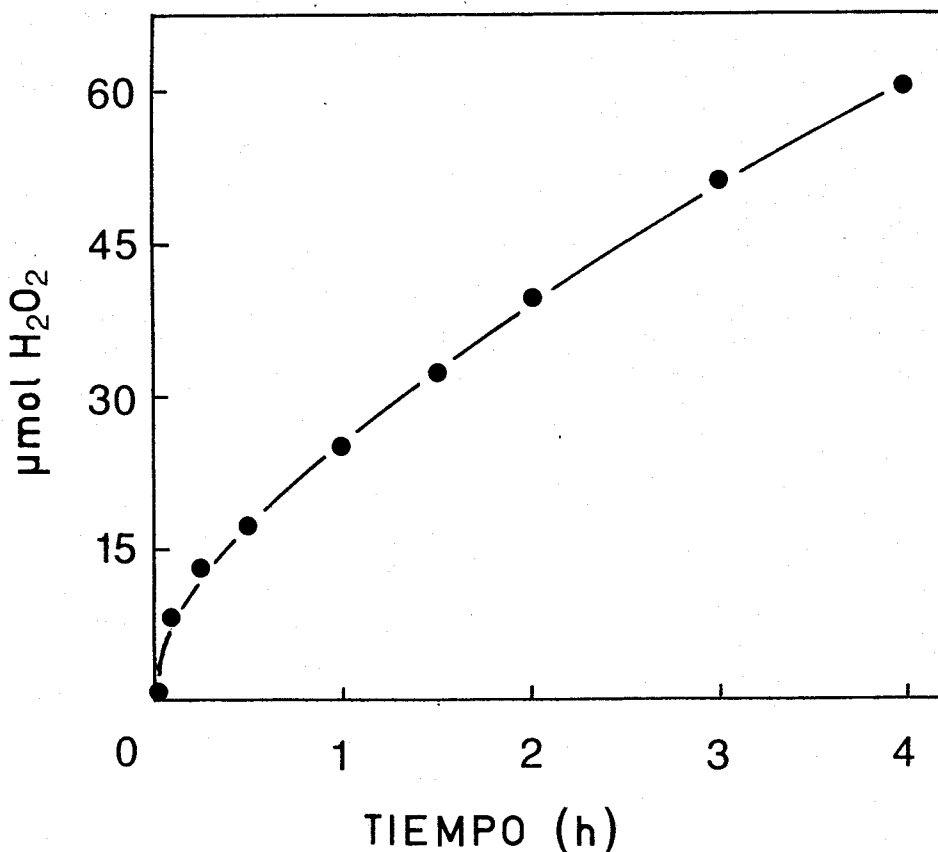


Figura 21. Producción de peróxido de hidrógeno en un sistema de flujo continuo por tilacoides de espinaca inmovilizados en agar.

Un esquema del sistema de flujo continuo utilizado se presenta en la Figura 10. El reservorio y la célula de reacción se llenaron con tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina $10 \mu\text{M}$, DTE 5 mM , TMPD $60 \mu\text{M}$, azida 5 mM y CMU $10 \mu\text{M}$. La célula de reacción (volumen total, 10 ml) también contenía las vesículas tilacoidales (clorofila total, 1 mg) inmovilizadas en agar. La reacción fotoquímica comenzó al irradiar con luz naranja de 100 W m^{-2} la célula de reacción, que simultáneamente era gaseada con aire a razón de $0,1 \text{ l min}^{-1}$. El tampón de fotoproducción fluía desde el reservorio a la célula a la velocidad de 15 ml h^{-1} , determinándose el peróxido de hidrógeno formado en el tampón que salía por el rebosadero.

tividad que se puede medir en vesículas tilacoidales completas, que es del orden de $400-500 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (datos no mostrados). En la Tabla III se presentan las velocidades iniciales de fotogeneración de H_2O_2 , así como las concentraciones finales de peróxido, que se obtienen con estas partículas del fotosistema I en presencia de riboflavina y del sistema DTE/TMPD o Asc/DPIP. Estos datos se presentan comparados a los resultados obtenidos en las mismas condiciones pero con el fotosistema I integrado en vesículas completas. Como se puede apreciar en la Tabla, las velocidades iniciales de producción de H_2O_2 son sensiblemente mayores en el caso de las partículas purificadas (hasta $1800 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$); sin embargo, los niveles finales de peróxido son similares a los que se alcanzan con las vesículas tilacoidales completas. En este sentido, hay que indicar que en presencia de las partículas del fotosistema I tiene lugar, de una forma inespecífica e independiente de la luz, una reacción de consumo o descomposición del H_2O_2 (datos no mostrados).

TABLA III

FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR PARTICULAS AISLADAS DEL FOTOSISTEMA I

Sistema exógeno donador de electrones	velocidad inicial de producción ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg (chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	concentración final ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$)
Ascorbato/DPIP	1729 (490)	560 (550)
DTE/TMPD	1835 (648)	890 (1100)

La célula de reacción contenía una suspensión de partículas aisladas del fotosistema I (clorofila total, 0,17 mg) en 10 ml del tampón de fotoproducción suplementado con riboflavina 10 μM , ascorbato o DTE 5 mM, y DPIP o TMPD 60 μM . La suspensión se gaseó con aire a razón de 0,1 l min^{-1} y se irradió con luz naranja de 100 W m^{-2} . A intervalos regulares de tiempo, se determinó la cantidad de H_2O_2 formado en pequeñas ali-
cuotas de la mezcla de reacción. A efectos comparativos, se han incluido también entre paréntesis los valores de fotoproducción de H_2O_2 por el fotosistema I integrado en tilacoides; tales datos se han calculado a partir de los resultados presentados en la Figura 19.

B. PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR SISTEMAS FOTOQUÍMICOS ARTIFICIALES.

B.1. Producción de peróxido de hidrógeno utilizando varios pigmentos como fotosensibilizadores.

Uno de los puntos críticos en el diseño de un sistema fotoquímico artificial es sin duda la elección del pigmento o fotosensibilizador de la reacción fotoquímica. Es por ello que los primeros estudios sobre sistemas artificiales sehan centrado en la selección de los pigmentos que mostraran una mayor eficiencia y estabilidad en la fotosensibilización de la reacción de formación de peróxido de hidrógeno.

En la Tabla IV se presentan los resultados de fotoproducción de H_2O_2 a pH 0, 7 y 14, utilizando algunos pigmentos que habían sido previamente descritos en ciertas reacciones fotoquímicas como eficientes fotosensibilizadores: quinonas, acridinas, lumiflavina, el complejo metálico rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) y otros. En todos los casos se utilizó se micarbazida como donador de electrones, compuesto ya empleado con anterioridad en varios sistemas fotoquímicos productores de H_2O_2 (De la Rosa et al., 1983; Fontes et al., 1981).

Entre todos los pigmentos ensayados como fotosensibilizadores en la producción mediada por luz de peróxido de hidrógeno, los valores más elevados de velocidad de producción y de concentración de peróxido se alcanzan, siempre a pH 14, con el rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo), la lumiflavina y la fenazina metosulfato. Concretamente este último pigmento proporciona la más alta velocidad inicial de formación de H_2O_2 (hasta $400 \mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}$), aunque hay que señalar, sin embargo, que la producción se detiene prácticamente a los 5 min de reacción a causa de la rápida degradación que sufre el pigmento (datos no mostrados). Por tanto, y atendien

TABLA IV

FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO CON SEMICARBAZIDA
 COMO DONADOR DE ELECTRONES Y VARIOS PIGMENTOS COMO RECEP-
 TORES DE LUZ

Fotorreceptor	velocidad inicial de producción ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$)			concentración a las dos horas ($\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$)
	pH 0	pH 7	pH 14	pH 14
Rojo de fenilo	<10	<10	11	1,36
Safranina	<10	<10	29	2,21
Procion rojo	<10	<10	22	2,72
Naranja de Acridina	<10	<10	35	2,99
2-OH-1,4-naftoquinona	ND ^{a)}	ND	39	3,92
5,8-OH-1,4-naftoquinona	ND	ND	103	8,30
Fenazina metosulfato	<10	<10	400	11,09
Ru(bipi) ₃ ²⁺	<10	<10	167	12,00
Lumiflavina	<10	46	222	20,00

El sistema completo contenía, en un volumen final de 30 ml, semicarbazida 20 mM y el pigmento fotorreceptor a la concentración de 0,1 mM. Los valores 0 y 14 de pH se consiguieron por adición de HCl y NaOH, respectivamente, a la concentración final de 1 M; a pH 7 se mantuvo un electrodo de pH inmerso en la solución con objeto de controlar el pH de forma continua y ajustarlo al valor indicado por adición de pequeñas alícuotas de las soluciones ácida y/o básica. La célula de reacción se gaseó con una corriente de oxígeno de $0,3 \text{ l min}^{-1}$ y se irradió con luz blanca de 200 Wm^{-2} . A intervalos regulares de tiempo se sacaron pequeñas alícuotas de la solución para determinar la velocidad de producción de H_2O_2 , así como su concentración final a las dos horas de reacción.

a) ND, no determinada

do a la relativamente alta estabilidad, a pH alcalino y en la luz, de la lumiflavina (De la Rosa et al., 1983) y del complejo de rutenio, el estudio acerca de la producción de peróxido de hidrógeno por sistemas fotoquímicos artificiales se ha centrado sobre estos dos pigmentos.

En las Figuras 22 y 23 se presentan los espectros de absorción en la zona visible del espectro electromagnético de ambos fotosensibilizadores, así como su estructura química. Los dos pigmentos absorben en la zona azul del espectro, con máximos de absorbancia alrededor de 440-450 nm para la flavina, según el pH, y de 452 nm para el complejo de rutenio. La lumiflavina presenta, además, un segundo pico o máximo de absorción alrededor de los 370 nm.

B.2. Producción de peróxido de hidrógeno con sistemas flavínicos.

B.2.1. Componentes del fotosistema.

El sistema flavínico para la producción de peróxido de hidrógeno contiene lumiflavina como pigmento receptor de luz, oxígeno como aceptor de electrones y semicarbazida como donador de éstos. La solución se somete a una intensa oxigenación e iluminación, con objeto de aumentar el oxígeno disuelto y de suministrar la luz adecuada, respectivamente.

Como puede apreciarse en la Tabla V, la producción de peróxido de hidrógeno es estrictamente dependiente de la presencia simultánea del donador de electrones (la semicarbazida) y del aceptor final de los mismos (el oxígeno), no observándose producción apreciable de H_2O_2 en ausencia de cualquiera de estos dos factores. En ausencia del pigmento

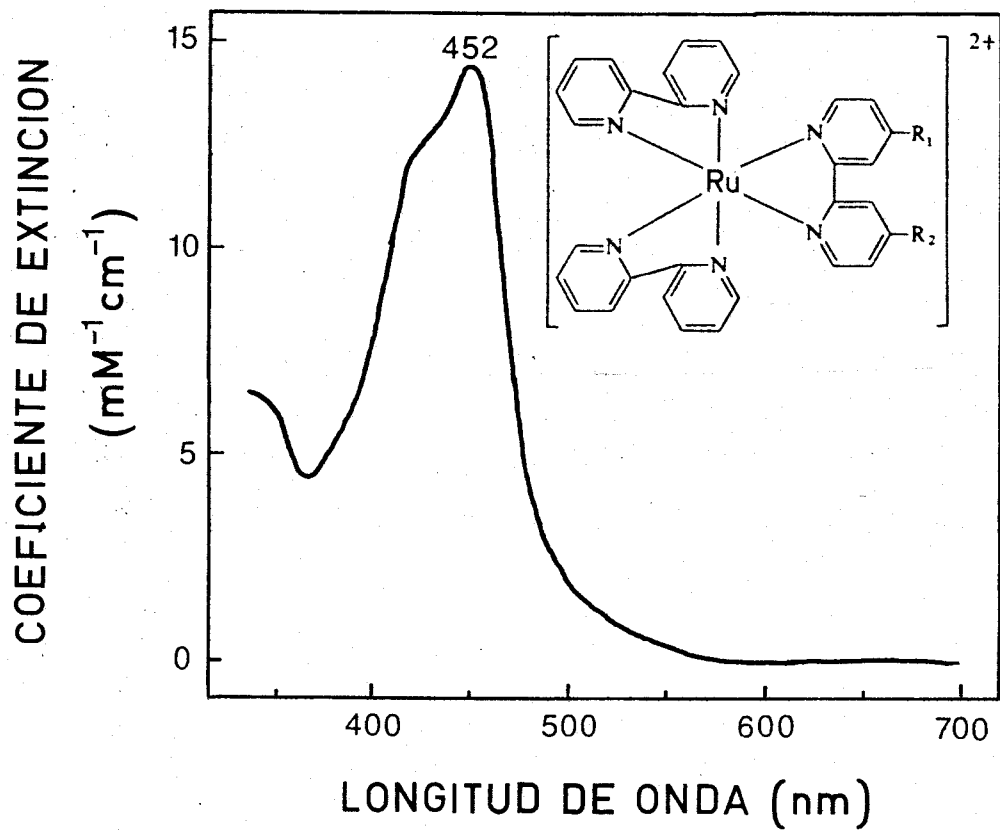


Figura 23. Espectro de absorción ultravioleta/visible del rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) en NaOH 1 M.

TABLA V

FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR EL SISTEMA
SEMICARBAZIDA/LUMIFLAVINA/OXIGENO A pH 14

Sistema de reacción	mmol H ₂ O ₂ l ⁻¹
Sistema completo	12,5
menos lumiflavina	1,2
menos semicarbazida	<0,01
menos oxígeno	<0,01
menos luz	0,9

El sistema completo contenía, en un volumen final de 50 ml, semicarbazida 20 mM, lumiflavina 0,1 mM y NaOH 1 M. La célula de reacción se irradió con luz blanca de 200 Wm⁻² y se gaseó con oxígeno a razón de 0,3 lmin⁻¹. La concentración de H₂O₂ se determinó a los 60 min de reacción.

—o, lo que es equivalente, de iluminación— la formación del peróxido decae drásticamente en un 90%, resultados que indican claramente la naturaleza fotoquímica del proceso.

B.2.2. Factores que afectan a la eficiencia del sistema.

La eficiencia de los sistemas fotoquímicos suele depender en gran medida del pH de las soluciones. En el caso concreto del sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno se ha estudiado esta dependencia dada la existencia de muy diversos equilibrios ácido-base, tanto en las especies oxidadas, excitadas y reducidas de la lumiflavina como en la propia molécula de semicarbazida. Por otra parte, estudios anteriores en los que el aire era la fuente de oxigenación habían puesto de manifiesto una posible influencia de la descomposición del peróxido de hidrógeno sobre la eficiencia global del proceso (De la Rosa et al., 1983), por lo que también se ha procedido ahora a estudiar esta reacción.

B.2.2.1. Efecto del pH.

En la Figura 24 se presenta la variación de las velocidades de producción de peróxido de hidrógeno por el fotosistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno en función del pH. En estos experimentos, y para evitar posibles interferencias de los tampones ácido-base, que por sí solos pueden actuar como donadores de electrones de la lumiflavina excitada, el pH se ajustó al valor deseado por adición de pequeñas alícuotas de soluciones concentradas de NaOH o HCl.

La velocidad inicial de formación de peróxido de hidrógeno presenta valores máximos en las zonas de pH alrededor de 4, 9-10 y 14, siendo a este último pH donde se alcanza la máxima producción. Por el contrario, los valores más bajos se obtienen a pH muy ácido (0-1), 7 y 12.

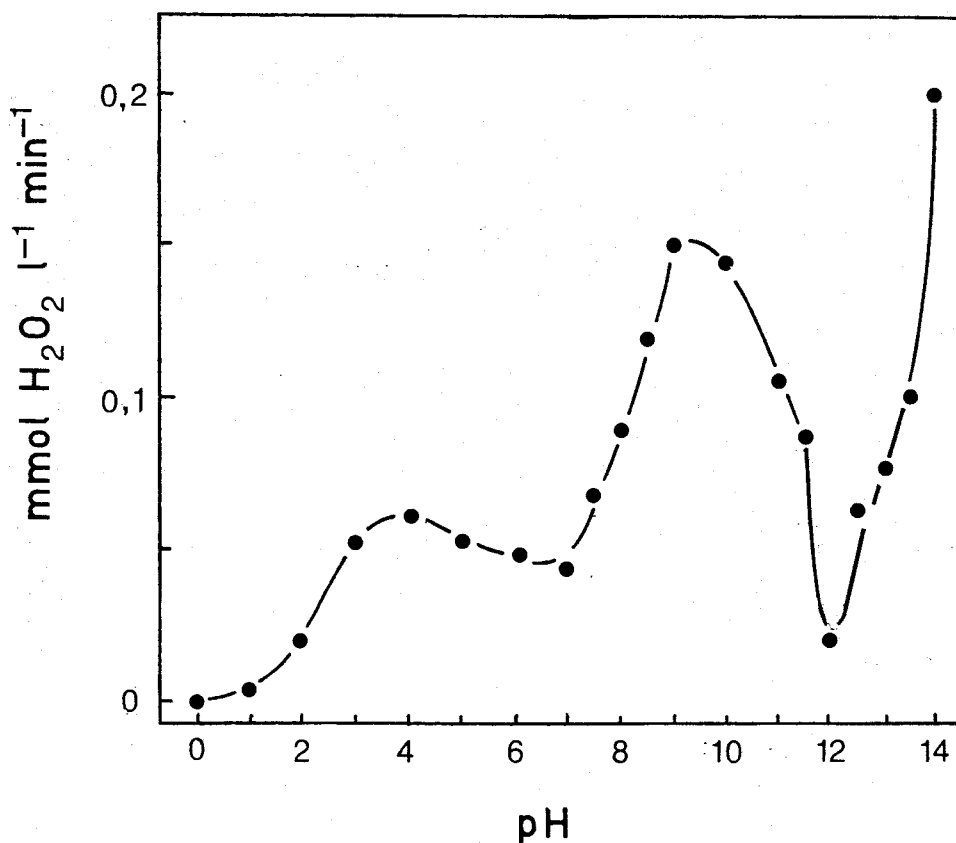


Figura 24. Efecto del pH sobre la velocidad inicial de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno.

La reacción se llevó a cabo en soluciones no tamponadas que contenían, en un volumen final de 50 ml, lumiflavina 0,1 mM y semicarbazida 20 mM. El pH se ajustó inicialmente al valor deseado con NaOH 1 M y/o HCl 1 M, y fue continuamente controlado con un pH-metro. La célula de reacción se irradió con luz blanca de $200\ W\ m^{-2}$ y se gaseó con oxígeno a razón de $0,3\ l\ min^{-1}$. En cada caso, se sacaron de la célula pequeñas alícuotas para determinar la velocidad inicial de producción de H_2O_2 .

B.2.2.2. Efecto del dióxido de carbono.

Como ya se ha indicado, en anteriores trabajos llevados a cabo por nuestro grupo se había estudiado la producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno utilizando una corriente de aire, y no de O_2 , para aumentar la concentración de oxígeno disuelto en las soluciones, obteniéndose un perfil de producción en función del pH similar al presentado en este trabajo (De la Rosa *et al.*, 1983). Sin embargo, en la Figura 25 puede observarse que el cambio en la fuente de oxigenación, de aire a oxígeno, ejerce un gran efecto sobre la producción de H_2O_2 por el fotosistema a pH 12. El gaseo con oxígeno en lugar de aire aumenta en gran medida la capacidad de producción de peróxido de hidrógeno a pH 12, pero esta misma capacidad de producción se obtiene con aire como fuente de oxigenación si a éste se le elimina previamente su contenido en CO_2 haciéndolo pasar a través de soluciones concentradas de hidróxido de bario. En vista de estos resultados, se procedió a realizar un estudio sobre la estabilidad del peróxido de hidrógeno en función del pH de las soluciones y de la naturaleza de la fuente de gaseo.

B.2.3. Factores que afectan a la estabilidad del peróxido de hidrógeno.

B.2.3.1. Efecto del pH.

Se estudió en primer lugar la descomposición del peróxido de hidrógeno en soluciones continuamente aireadas y a distintos valores de pH. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 26, en la que puede observarse cómo el peróxido se descompone con gran rapidez a pH medianamente alcalino; la máxima velocidad de desaparición de H_2O_2 se al

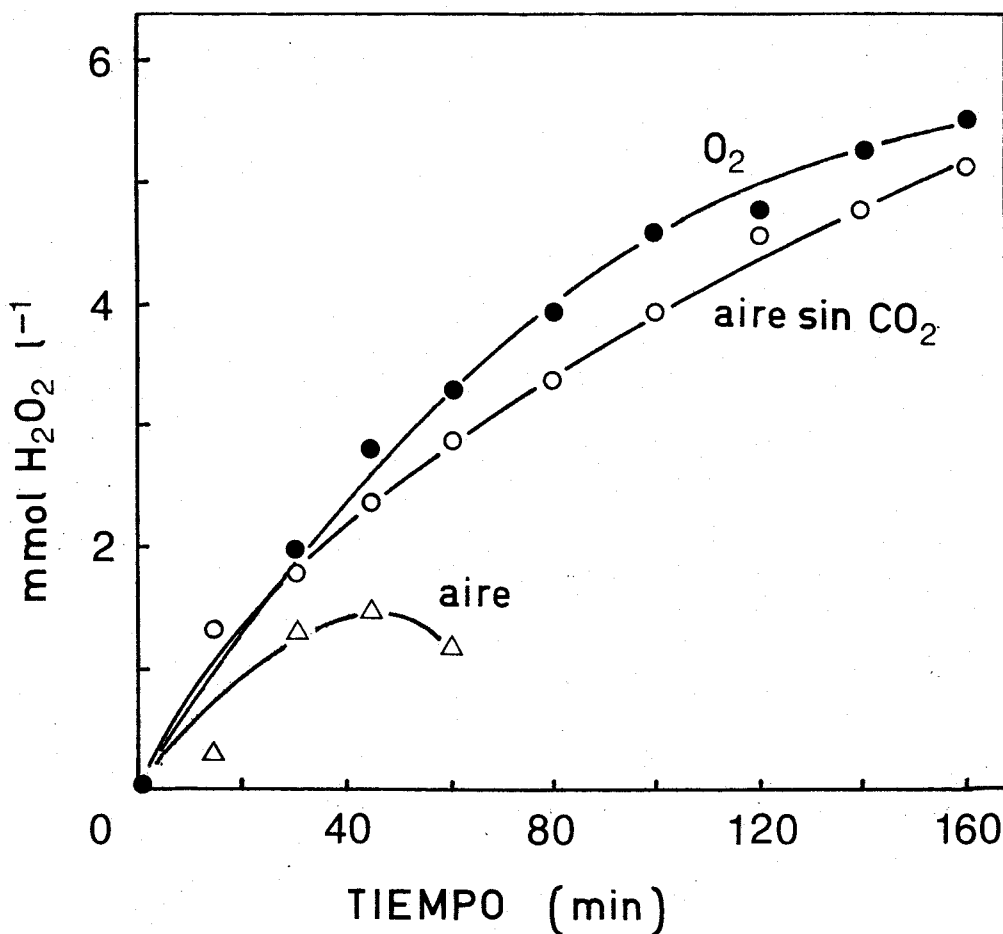


Figura 25. Efecto del dióxido de carbono sobre la foto producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno a pH 12.

Tres soluciones conteniendo semicarbazida 20 mM y lumiflavina 0,1 mM en un volumen final de 50 ml, y cuyos pHs se ajustaron inicialmente a 12, se gasearon con aire (Δ), aire desprovisto de CO₂ (O) u O₂ (●) a razón de 1 l min⁻¹. Las soluciones se irradiaron con luz blanca de 200 W m⁻² y su pH se controló continuamente a lo largo de cada experimento con un pH-metro, ajustándose de nuevo a 12 cuando era necesario por adición de pequeñas alícuotas de soluciones de HCl o NaOH 1 M. A los tiempos indicados se midió la concentración de H₂O₂.

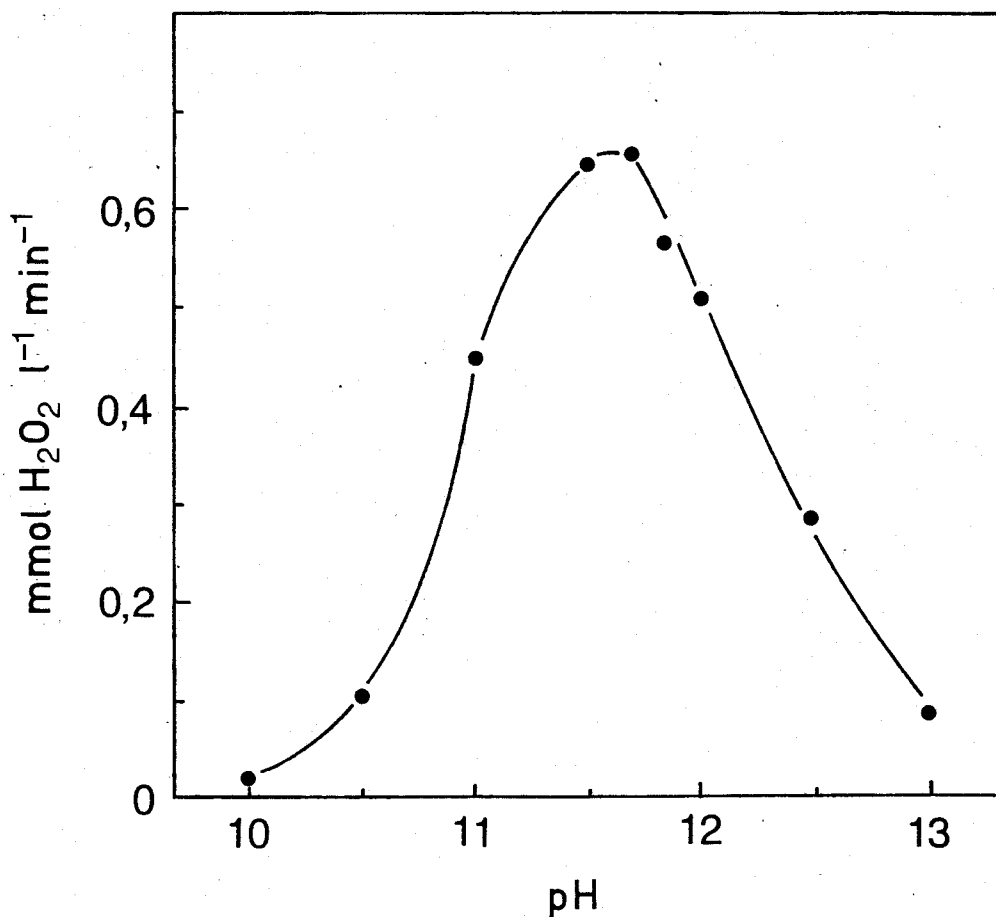


Figura 26. Efecto del pH sobre la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de dióxido de carbono.

Varias soluciones de 10 ml conteniendo H₂O₂ 20 mM al pH indicado, se gasearon ininterrumpidamente con aire a razón de 0,1 l min⁻¹. Las soluciones se encontraban tamponadas con borato (pH 10,0; 10,5 y 11,0) o con fosfato (pH 11,0; 11,5; 11,7; 12,0 y 12,5) a la concentración de 0,6 M, a excepción de la de pH 13 que sólo contenía NaOH 0,1 M. En cada caso, el pH se controló a lo largo de todo el experimento con un pH-metro, y, cuando fue necesario, se añadieron alícuotas de soluciones concentradas de NaOH o HCl a fin de mantener el pH en su valor inicial. A intervalos regulares de tiempo se midió la concentración de H₂O₂ para calcular la velocidad de descomposición del peróxido.

canza a pH 11,5-11,7. La reacción de descomposición, sin embargo, deja de ser significativa a valores de pH inferiores a 10 o superiores a 13.

B.2.3.2. Efecto del dióxido de carbono.

La descomposición del peróxido de hidrógeno que se observa a pH 12 en condiciones de continua aireación no tiene lugar, como puede apreciarse en la Figura 27, si la solución se burbujea con oxígeno o con nitrógeno, los dos componentes mayoritarios del aire, pero transcurre a gran velocidad si es dióxido de carbono el gas utilizado. En esta misma figura se observa que cuando la corriente de aire se hace pasar previamente por agua de barita para remover el dióxido de carbono del mismo, el peróxido se mantiene estable, lo que claramente sugiere un papel activo del CO_2 en la descomposición del peróxido de hidrógeno.

Para comprobar si era el CO_2 per se o alguno de los aniones HCO_3^- o CO_3^{2-} —productos del equilibrio ácido-base del CO_2 hidratado a pH básico— los implicados en la descomposición del H_2O_2 , se estudió este proceso en presencia de los aniones citados. Como se muestra en la Figura 28, la descomposición a pH 12 del peróxido no tiene lugar en soluciones carbonatadas, incluso a concentraciones elevadas, a menos que a través de éstas se haga burbujear simultáneamente una corriente de aire. Si las soluciones se gasean con aire libre de CO_2 el peróxido no se descompone. Estos resultados indican que es el propio dióxido de carbono el que juega un papel esencial en la descomposición del peróxido de hidrógeno en la zona de pH entre 10 y 13.

Con objeto de profundizar en el posible mecanismo de acción del dióxido de carbono, se realizaron los experimentos que se muestran en la Figura 29. El pH, inicialmente

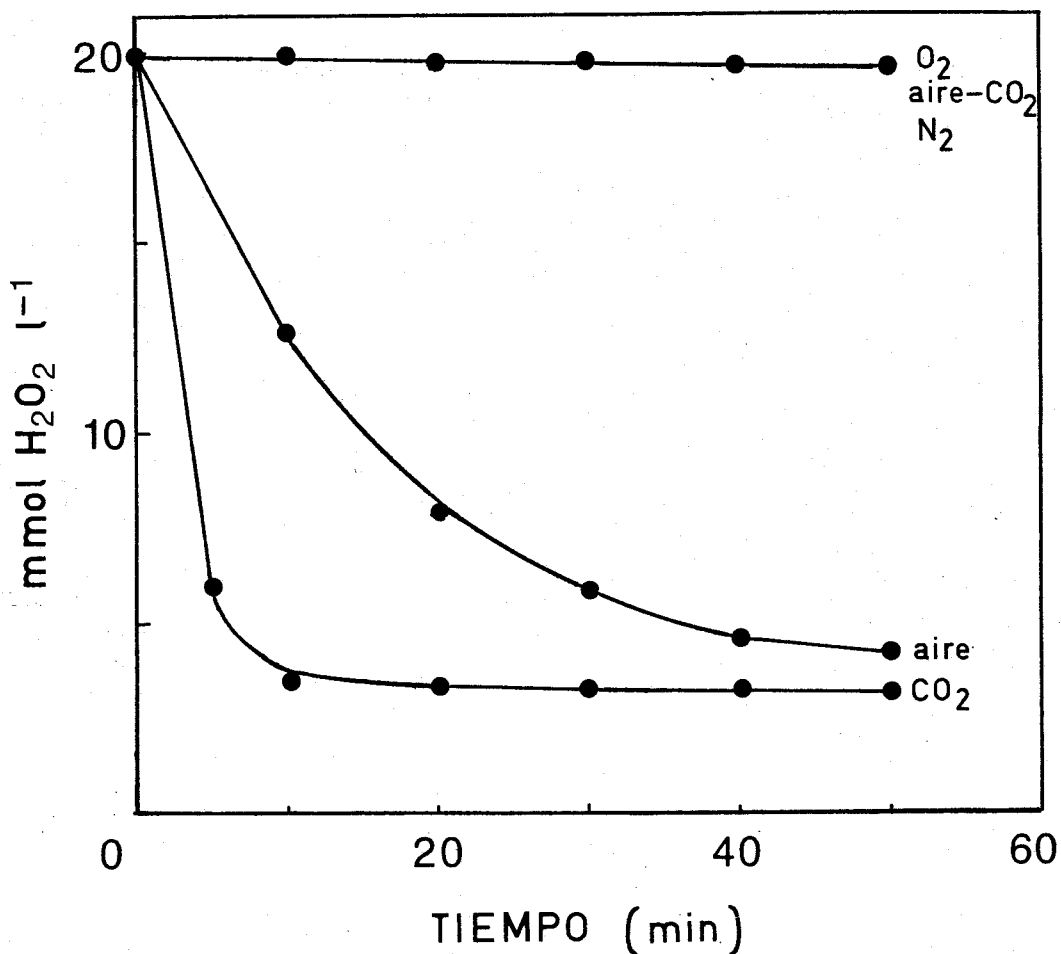


Figura 27. Cinéticas de descomposición del peróxido de hidrógeno a pH 12 bajo diferentes condiciones de gaseo.

Varias soluciones de 10 ml conteniendo H_2O_2 20 mM a pH 12, se gasearon en la oscuridad con O_2 , N_2 , CO_2 , aire o aire libre de CO_2 . El pH de las soluciones, continuamente controlado con un pH-metro, se mantuvo constante en cada experimento por adición de alícuotas de NaOH 1 M. A los tiempos indicados, se determinó la concentración del peróxido en pequeñas alícuotas de las soluciones.

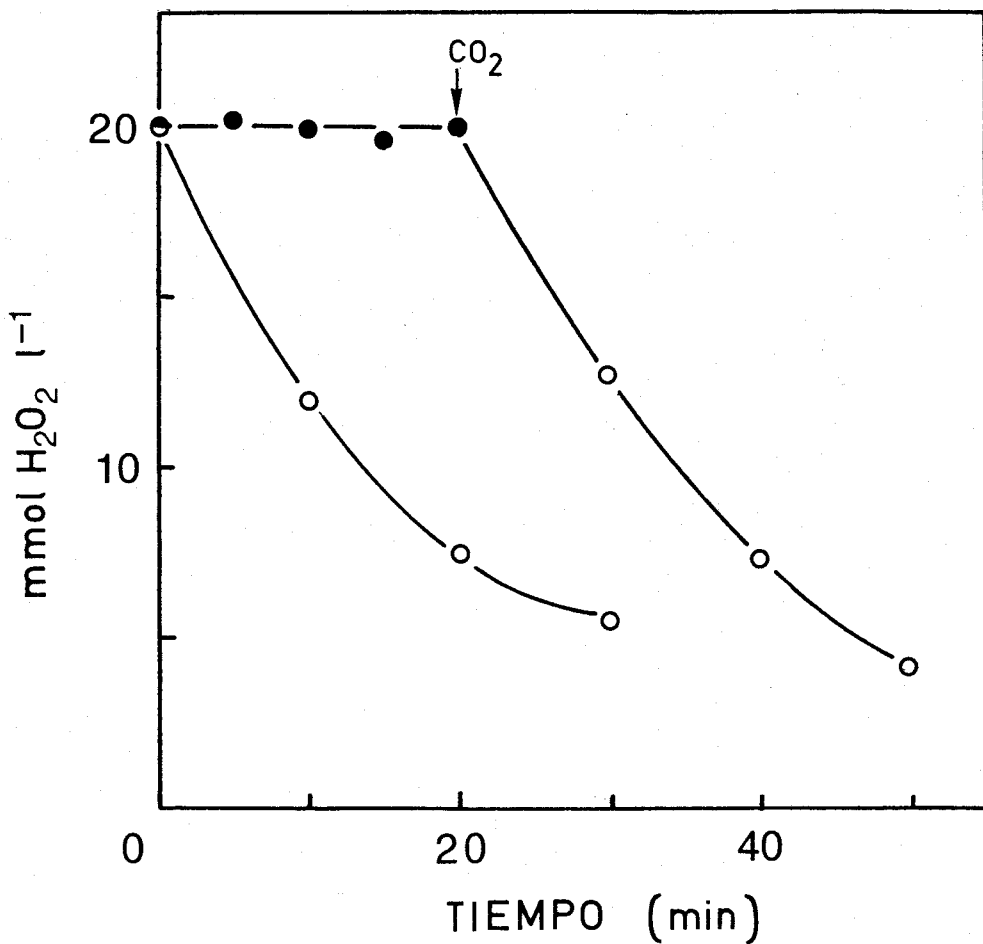


Figura 28. Cinéticas de descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de dióxido de carbono y tampón carbonato de pH 12.

Dos soluciones de 10 ml que contenían H₂O₂ 20 mM y tampón carbonato 0,5 M pH 12, se gasearon con aire (○) o con aire desprovisto de CO₂ (●). En el momento indicado por la flecha el aire, inicialmente libre de CO₂, se burbujeó directamente en la solución de H₂O₂ sin pasarlo previamente por las soluciones de hidróxido bórico. El pH se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento e igual a 12.

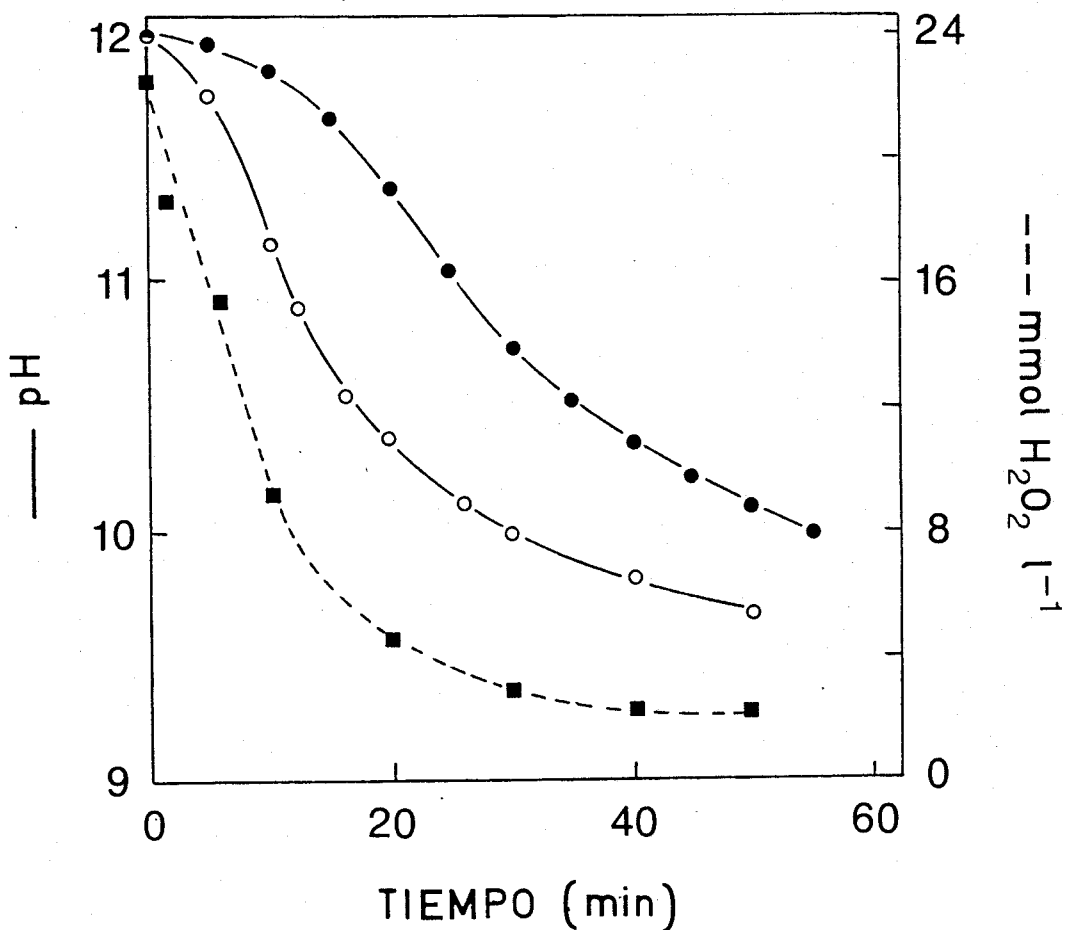


Figura 29. Variación del pH durante la descomposición del peróxido de hidrógeno, mediada por dióxido de carbono, en soluciones no tamponadas.

Una solución de 10 ml de H_2O_2 20 mM, cuyo pH se ajustó inicialmente a 12 por adición de NaOH, se gaseó con un flujo de aire de $0,1 \text{ l min}^{-1}$. A los tiempos indicados se midió la concentración de H_2O_2 (■) y el pH (○). Como control se representa la disminución del pH (●) de una solución igualmente aireada de 10 ml de agua destilada cuyo pH también se ajustó inicialmente a 12 con NaOH.

ajustado a 12, de soluciones no tamponadas conteniendo H_2O_2 y sometidas a gaseo con aire disminuye, conforme el peróxido se descompone, a una velocidad mayor que el pH de soluciones sin H_2O_2 tratadas de forma parecida, y en las que la disminución del pH se debe únicamente al CO_2 contenido en el aire utilizado para burbujear las soluciones. Esto pone claramente de manifiesto que la reacción de descomposición del H_2O_2 va acompañada por una acidulación de la solución.

B.2.3.3. Efecto de los iones metálicos.

La posibilidad de que la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de dióxido de carbono esté además catalizada por iones metálicos también se investigó. Para ello, la reacción se estudió a pH 12 en soluciones que contenían, además de H_2O_2 , silicato de magnesio o EDTA, conocidos agentes quelantes de iones metálicos, observándose que en estas condiciones el H_2O_2 es estable (datos no mostrados).

B.2.4. Estudios sobre el mecanismo del proceso fotoquímico.

B.2.4.1. Cambios inducidos por la luz y el oxígeno en el potencial redox de las soluciones.

Una vez observado el bajo rendimiento del fotosistema a pH 12, incluso cuando la solución se burbujea con oxígeno y, por lo tanto, el dióxido de carbono no interfiere en la formación de peróxido de hidrógeno, parecía lógico suponer que alguna otra causa, además de la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de CO_2 , debería encontrarse actuando para que la producción de H_2O_2 por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno fuera tan baja.

Así, las reacciones a través de las cuales la lumiflavina se reduce con semicarbazida y se oxida, posteriormente, con oxígeno, se estudiaron en función del pH, para lo cual se realizaron los estudios potenciométricos que a continuación se detallan.

En primer lugar, se determinaron a distintos pHs las velocidades de disminución del potencial redox al iluminar soluciones anaeróbicas de semicarbazida y lumiflavina. Posteriormente, cuando el potencial redox se había estabilizado, se midió la velocidad de aumento del potencial redox al inyectar aire en las soluciones. En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos en ambos casos, pudiéndose observar que la velocidad de aumento del potencial va ría en gran medida con el pH de las soluciones. Así, mientras el potencial disminuye muy rápidamente a pH 4-5 y tam bién, aunque más lentamente, a pH 9 y pH 13-14, las velocidades más lentas de disminución del potencial se observan a pH 0, 7,5 y 12.

La velocidad de aumento del potencial de las soluciones tras la inyección de aire se incrementa gradualmente conforme lo hace el pH, con una velocidad mínima a pH 0 y máxima a pH 14, acelerándose este aumento a partir de pH 7. Como se mues tra en la Figura 30, el producto de las dos velocidades de variación del potencial —la de disminución en luz y anaero biosis y la de aumento tras la inyección de aire— dan lugar a un perfil dependiente de pH que se corresponde con bastante aproximación con el de producción de H_2O_2 que se presenta en la Figura 24, con máximos a pH 4-5, 9 y 14, y con valores mínimos a pH 7 y 12.

En la Figura 31 se recogen, como ejemplo representativo, las cinéticas de cambio del potencial redox a pH 4 y 11. Como puede apreciarse en la figura, mientras que a pH

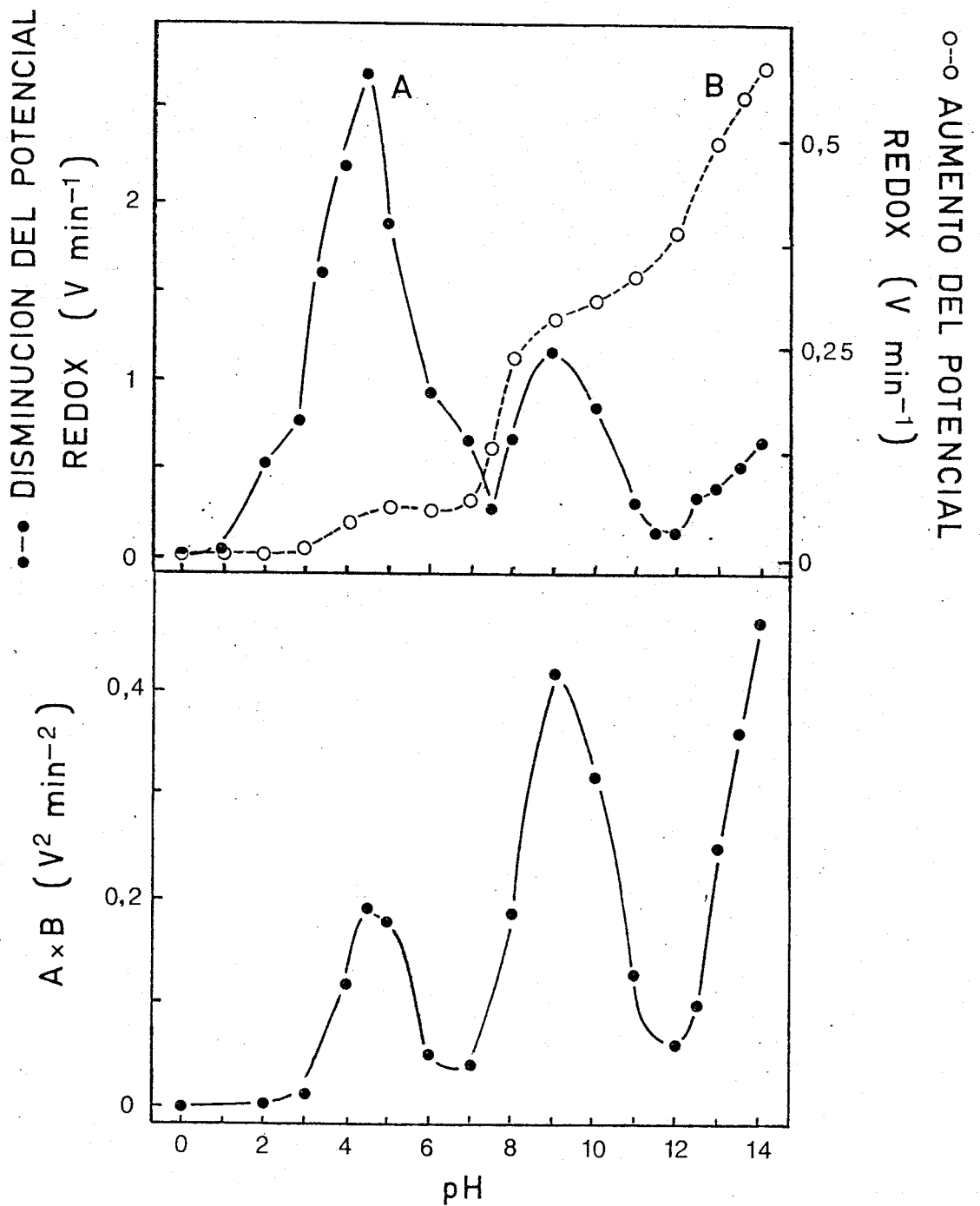


Figura 30. Efecto del pH sobre las variaciones del potencial redox, inducidas por la luz y el oxígeno, en soluciones de lumiflavina y semicarbazida.

La célula de reacción contenía, en un volumen final de 10 ml, lumiflavina 0,1 mM y semicarbazida 20 mM. El pH se ajustó inicialmente al valor deseado y se mantuvo constante por adición de pequeñas alícuotas de NaOH o HCl 1M. En todos los casos, la mezcla de reacción se gaseaba con N_2 en la oscuridad durante 60 min y, a continuación, se registraba la disminución del potencial redox (A) inducido por irradiación con luz blanca de 200 W m^{-2} . Una vez estabilizado, se registraba el aumento del potencial tras la inyección de 1 ml de aire en la célula de reacción (B). La gráfica inferior representa el producto (AxB) de las dos velocidades de variación del potencial a cada pH.

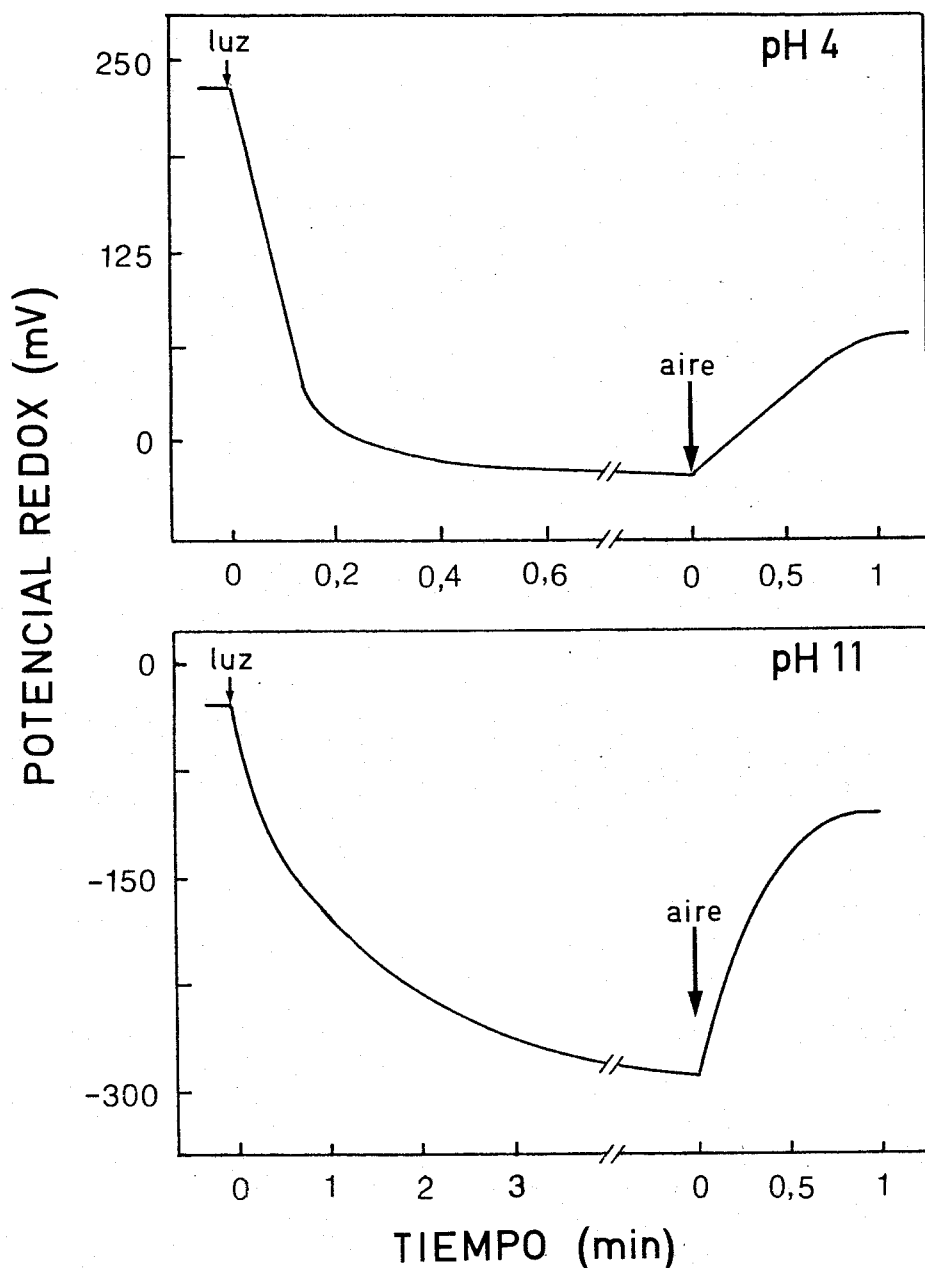


Figura 31. Cinéticas de variación del potencial redox, inducida por la luz y el oxígeno, en soluciones de lumiflavina y semicarbazida a pH 4 y 11.

Dos soluciones de 10 ml que contenían lumiflavina 0,1 mM y semicarbazida 20 mM, y cuyos pHs se ajustaron inicialmente a 4 y 11, respectivamente, manteniéndose constantes por adición de alícuotas de NaOH o HCl 1 M, se gasearon durante 60 min con N_2 en la oscuridad. A continuación, las soluciones se irradiaron con luz blanca de 200 W m^{-2} , registrándose la disminución del potencial redox inducida por la iluminación. Una vez estabilizado el potencial, se registró su aumento tras la inyección de 1 ml de aire en la célula de reacción. El dispositivo experimental se describe en Materiales y Métodos.

4 la disminución del potencial con la iluminación es muy rápida en comparación con la cinética de caída observada a pH 11, el aumento de potencial tras la inyección de aire es mucho más acusado a pH 11 que a pH 4.

B.2.4.2. Análisis por espectroscopía de excitación con láser.

B.2.4.2.1. Identificación de las especies flavínicas implicadas.

En la Figura 32 se muestran los espectros de absorción diferencial de la lumiflavina en agua y en presencia de semicarbazida, tanto en el momento de ser excitada por el láser (tiempo cero) como 4 μ s después. El espectro inicial, registrado a tiempo cero, corresponde al espectro diferencial del triplete excitado de la lumiflavina respecto al estado basal de la misma; en el rango estudiado de longitudes de onda, dicho espectro presenta una disminución de la absorbancia en la zona de 410-470 nm, con un mínimo a 450 nm, y una extensa zona de mayor absorbancia entre 470-660 nm. Por el contrario, el espectro registrado a los 4 μ s de la excitación corresponde a la forma neutra del radical semiquinona de la lumiflavina (Heelis et al., 1978, 1979; Palmer y Massey, 1968; Vaish y Tollin, 1970), ya que presenta una mayor disminución de la absorbancia respecto a la forma basal de la lumiflavina en la zona de 400-450 nm, es prácticamente idéntico al espectro del triplete en el rango de 450 a 470 nm, y presenta una menor absorbancia respecto del triplete, pero mayor en referencia a la forma basal, entre 470-640 nm, con máximos a 500 y 550 nm.

En la Figura 33 se recogen los espectros registrados en similares condiciones pero a pH 14 —esto es, en NaOH 1 M—, pudiéndose observar un espectro inicial, a tiempo cero,

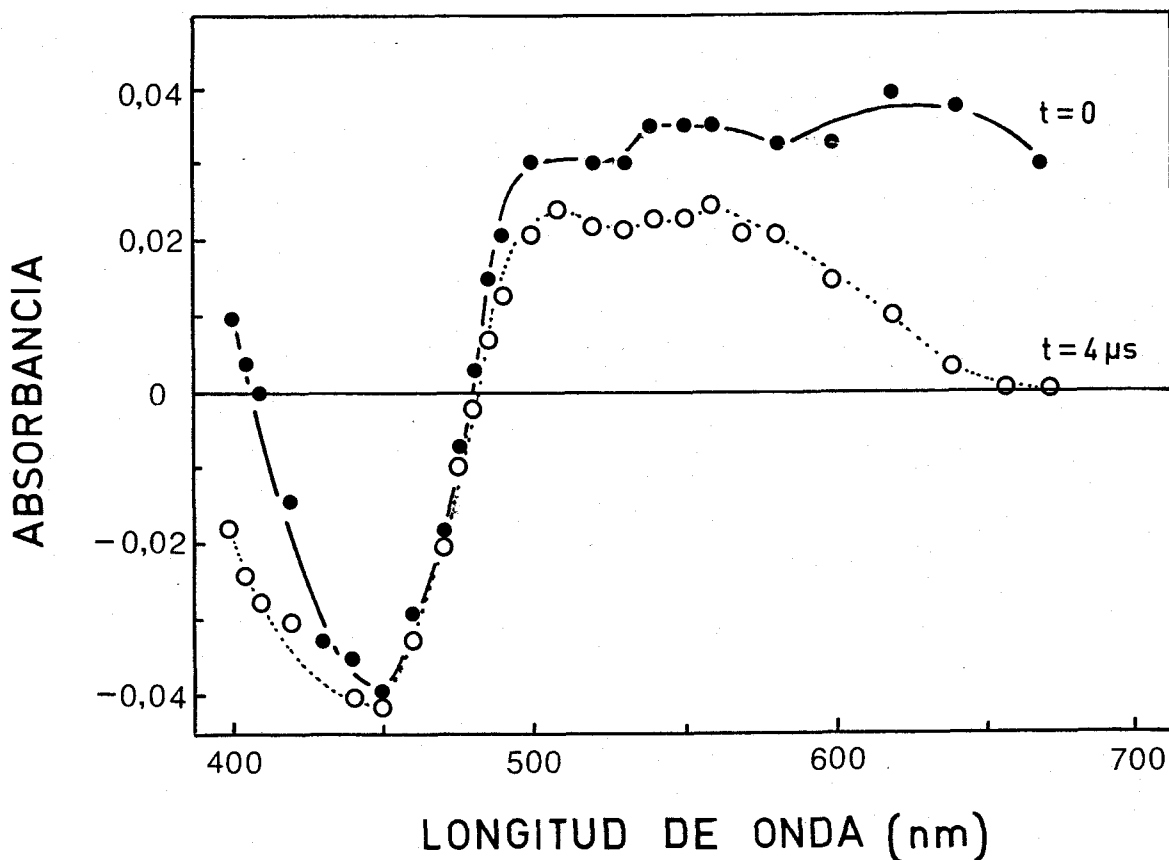


Figura 32. Espectro de absorción diferencial del estado triplete y radical semiquinona de la lumiflavina en agua.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución en agua de lumiflavina $25 \mu M$ y semicarbazida (previamente neutralizada con NaOH) 5 mM. Después de 1 h de gaseo con N_2 en la oscuridad, la cubeta se colocó en el compartimento de muestras del equipo de espectrofotometría de excitación por láser. La absorción diferencial a distintas longitudes de onda se registró inmediatamente (\bullet) y a los $4 \mu s$ (\circ) después de la excitación con el pulso de láser de 347 nm. El equipo utilizado y otros detalles se describen en Materiales y Métodos.

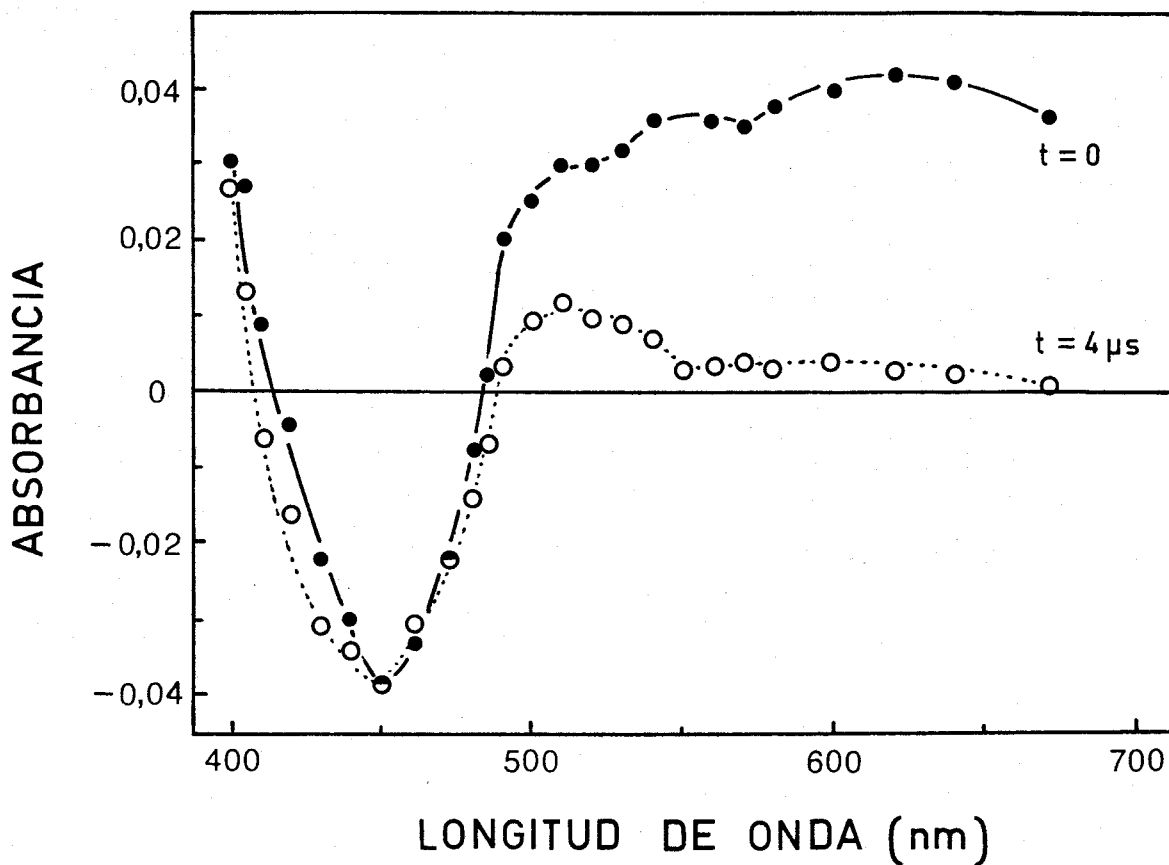


Figura 33. Espectro de absorción diferencial del estado triple y radical semiquinona de la lumiflavina en NaOH 1 M.

Las condiciones experimentales son las descritas en la figura anterior, excepto que la solución conteniendo lumiflavina y semicarbazida se preparó en NaOH 1 M.

prácticamente idéntico al que se registra a pH neutro. Sin embargo, el espectro recogido a los 4 μ s es similar al registrado con anterioridad hasta los 480 nm, pero difiere en la menor absorbancia que presenta en el rango entre 480 y 660 nm. Este último espectro se corresponde, pues, con la forma flavosemiquinona, semirreducida, de la lumiflavina, pero ahora en su estado disociado o aniónico (Heelis *et al.*, 1979, 1985; Palmer y Massey, 1968).

En la Figura 34 se muestran los espectros diferenciales obtenidos a distintos tiempos tras la excitación con el láser de soluciones de lumiflavina a pH neutro, en ausencia de semicarbazida y presencia de oxígeno. En este caso, el espectro inicial vuelve a ser el del triplete del pigmento, el cual, a diferencia de lo que ocurre en presencia de semicarbazida y en anaerobiosis, desaparece rápidamente sin que se forme la especie semiquinona.

B.2.4.2.2. Desactivación del estado triplete de la flavina.

Efecto del pH y de la adición de semicarbazida.

La cinética de desaparición del estado triplete de la lumiflavina, aparecido tras la excitación del pigmento por el láser, se determinó a partir de la caída de la absorbancia diferencial de la solución a 640 nm donde, como se puede observar en las Figuras 32 y 33, el estado triplete presenta un máximo de absorción respecto al estado basal y en donde no hay interferencias de la semiquinona.

En las Figuras 35 y 36 se presentan las cinéticas de desaparición del estado triplete de la lumiflavina tras su excitación por el láser en soluciones anaeróbicas a distintos pHs, tanto en ausencia como en presencia de semicarbazida. En todos los casos las cinéticas se ajustan a una reacción de primer orden en ausencia de semicarbazida y de

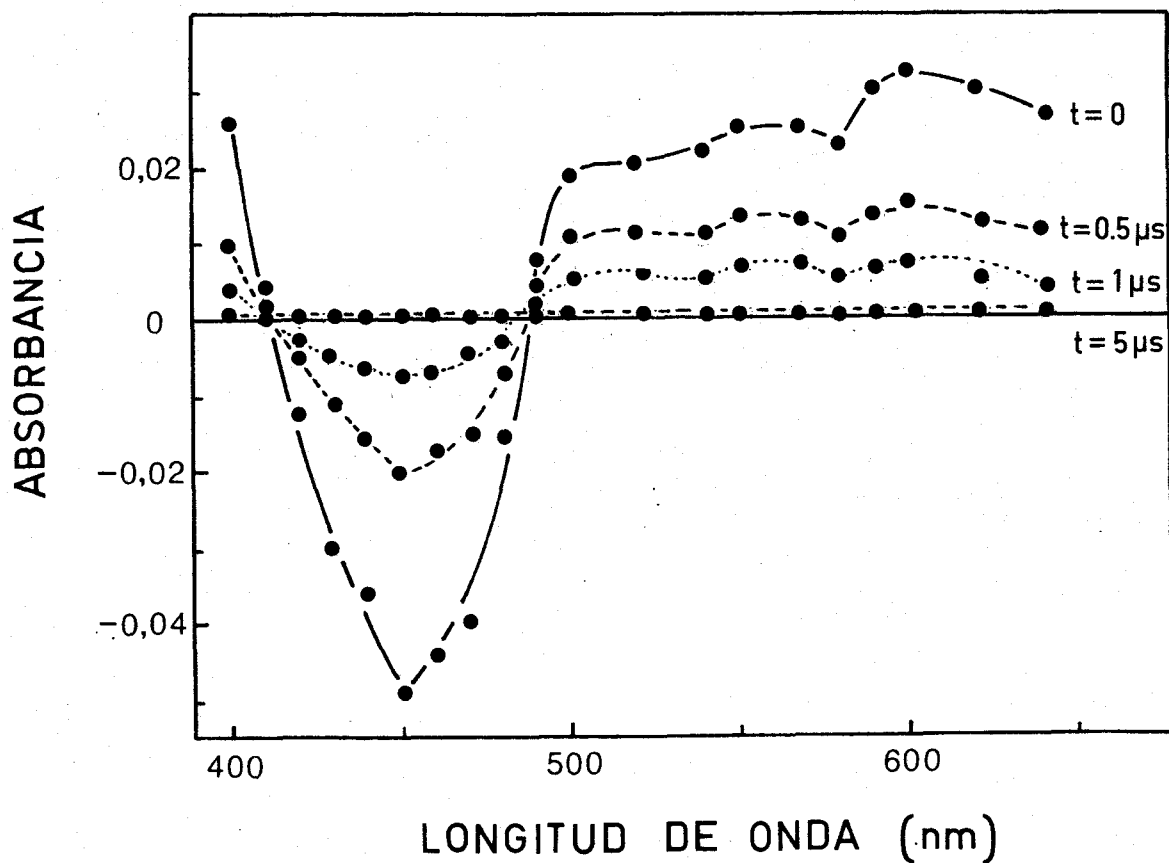


Figura 34. Desaparición del estado triplete de la lumiflavina en presencia de oxígeno.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución de lumiflavina 25 μM en agua. Tras 1 h de gaseo con O_2 en la oscuridad, se registró el espectro de absorción diferencial de la solución a distintos tiempos después de la excitación con el pulso de láser de 347 nm. El equipo utilizado y otros detalles se describen en Materiales y Métodos.

$\lambda = 640 \text{ nm}$

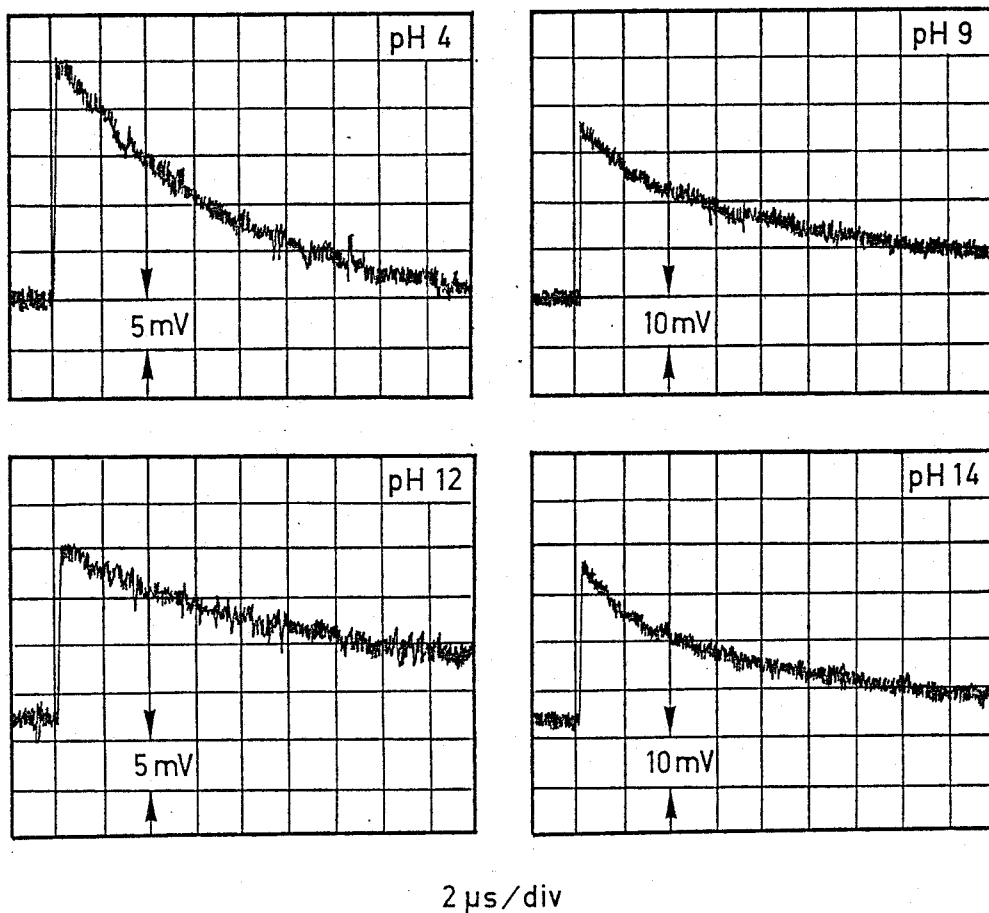


Figura 35. Cinéticas de desaparición espontánea del estado triplete de la lumiflavina a varios pHs.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución acuosa de lumiflavina $25 \mu\text{M}$ cuyo pH fue ajustado al valor indicado con NaOH o HCl. Después de 1 h de gaseo con N_2 en la oscuridad, se registró a 640 nm la cinética de desaparición del estado triplete de la lumiflavina tras la excitación con un pulso de láser de 347 nm.

$\lambda = 640 \text{ nm}$

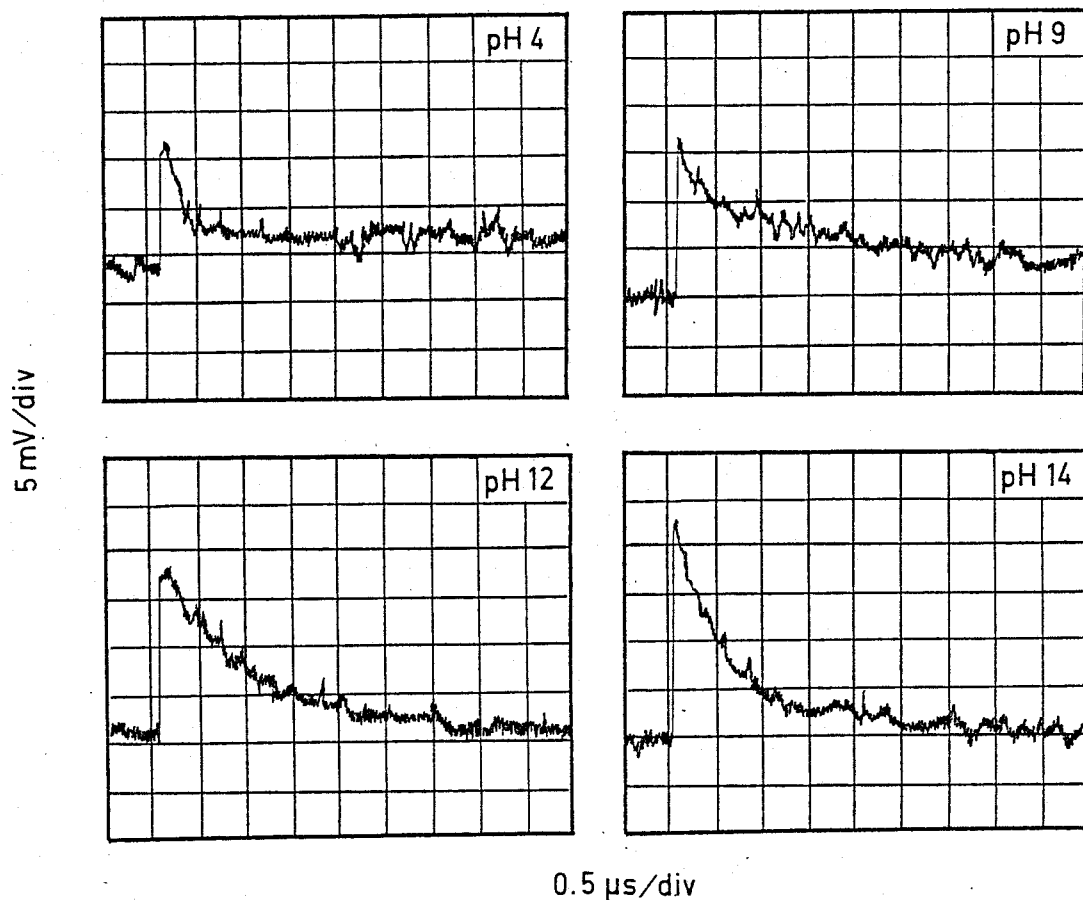


Figura 36. Cinéticas de desaparición del estado triplete de la lumiflavina, en presencia de semicarbazida, a varios pHs.

Las condiciones experimentales son las descritas en la figura anterior, excepto que la solución de lumiflavina contenía además semicarbazida 20 mM.

(pseudo)-primer orden en presencia del agente amortiguador. A partir de estas cinéticas ha sido posible calcular el valor de las constantes de velocidad de la reacción de desaparición del estado triplete de la lumiflavina (k), así como determinar los tiempos de vida del estado excitado. Los valores calculados se recogen en la Tabla VI, donde puede observarse que la constante k es mayor a pH 4 y 14 en comparación a los valores determinados a pH 9 y 12. La presencia de semicarbazida provoca un aumento en el valor de la constante k de un orden de magnitud y, consiguientemente, disminuye el tiempo de vida del estado excitado.

A partir de los valores de la constante k en presencia y en ausencia del agente amortiguador es posible calcular la constante de la reacción bimolecular, de segundo orden, entre el estado triplete excitado de la lumiflavina y la semicarbazida. El valor de esta constante, k_q , es mayor a pH 4 que a pH 12, y alcanza valores intermedios a pH 9 y 14 (Tabla VI).

B.2.4.2.3. Oxidación con oxígeno de la flavosemiquinona.

Tanto la aparición inicial de la flavosemiquinona, tras la excitación por láser de la lumiflavina en presencia de semicarbazida, como la posterior oxidación de la especie semirreducida con oxígeno, se estudiaron midiendo la desaparición de la absorbancia diferencial a aquellas longitudes de onda donde el estado triplete y la flavina basal tienen un punto isosbético y, por tanto, no existe cambio de absorbancia a tiempo cero; la absorbancia diferencial que aparece a continuación se debe a la formación de la especie flavosemiquinona. En la Figura 37 se recogen los trazos registrados en el osciloscopio mostrando las cinéticas de aparición de la forma semiquinona a varios pHs —por reducción de la especie oxidada con semicarbazida— y su posterior desaparición por oxidación con oxígeno.

TABLA VI

PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE DESAPARICION DEL
ESTADO TRIPLETE DE LA LUMIFLAVINA A VARIOS VALORES DE pH

pH	k (s ⁻¹)		τ (μs)		k _q (M ⁻¹ s ⁻¹)
	-SC	+SC	-SC	+SC	
4	1,70 · 10 ⁵	4,0 · 10 ⁶	5,9	0,25	1,90 · 10 ⁸
9	0,87 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁶	11,5	0,67	0,71 · 10 ⁸
12	0,69 · 10 ⁵	1,1 · 10 ⁶	14,5	0,93	0,50 · 10 ⁸
14	1,25 · 10 ⁵	1,7 · 10 ⁶	8,0	0,58	0,79 · 10 ⁸

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los resultados experimentales presentados en las Figuras 35 y 36. Las cinéticas de desaparición del triplete correspondieron a una reacción de (pseudo)-primer orden, calculándose sus constantes de velocidad (k) a partir de la recta obtenida al representar el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo. La constante de velocidad de la reacción bimolecular (k_q) entre el triplete y la semicarbazida se calculó según se describe en Materiales y Métodos. SC, semicarbazida; τ, tiempo de vida.

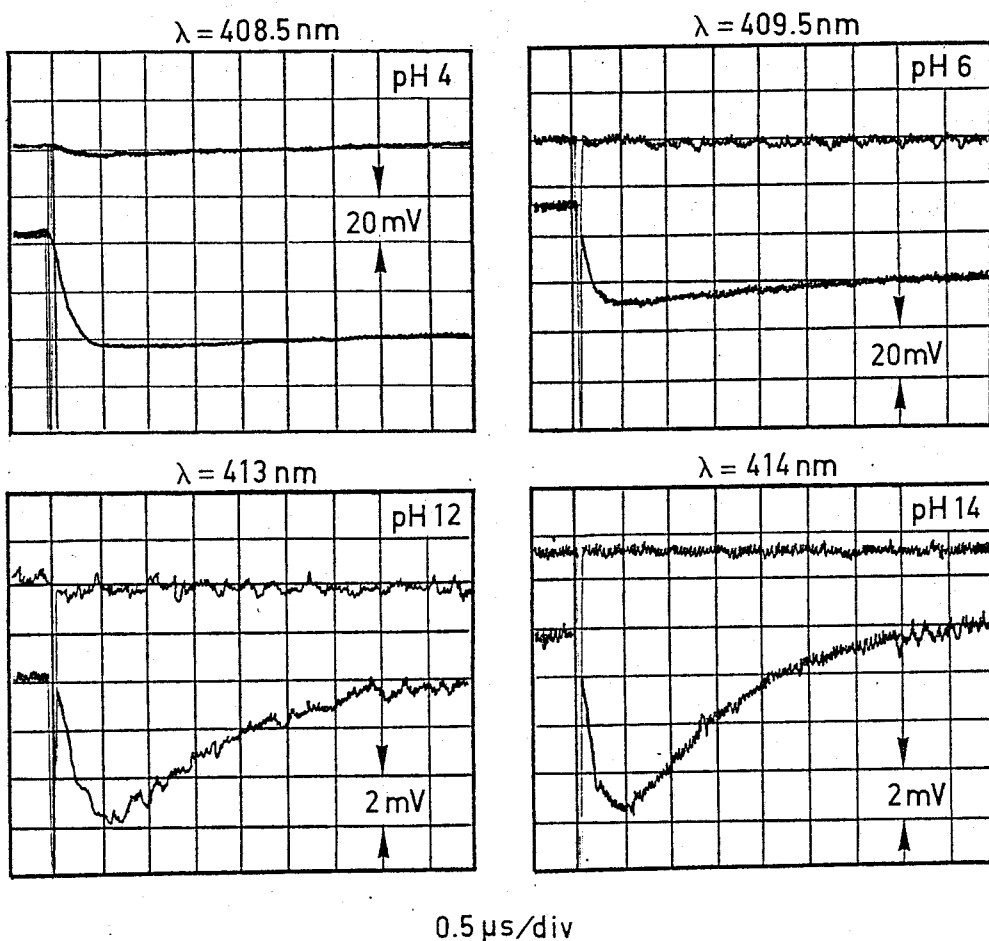


Figura 37. Cinéticas de oxidación con oxígeno del radical semiquinona de la lumiflavina a varios pHs.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución acuosa de lumiflavina 25 μ M, cuyo pH fue ajustado al valor indicado con NaOH o HCl. Después de 1 h de gaseo con O₂ en la oscuridad, se colocó la cubeta en el compartimento de muestras del equipo de espectrofotometría de excitación por láser. A cada valor de pH se ajustó la longitud de onda del monocromador en la zona inferior del espectro visible hasta conseguir que el trazo registrado en el osciloscopio tras la excitación por el láser no sufriera cambio alguno, correspondiendo entonces la longitud de onda seleccionada a un punto isobéptico entre los espectros de la flavina basal y su estado triplete (trazos superiores). A continuación, se inyectaron en la cubeta 40 μ l de una solución de semicarbazida 2 M cuyo pH se había ajustado previamente al mismo valor que el de la cubeta de reacción, registrándose el nuevo trazo obtenido tras la excitación con el láser (trazos inferiores).

Todas las cinéticas se ajustaron a una reacción de (pseudo)-primer orden, recogién^{do}se en la Tabla VII los valores estimados para la constante de velocidad, k , de la reacción de desaparición de la semiquinona a cada pH, así como el tiempo de vida en cada caso de la especie semirreducida. El valor de esta constante k aumenta según lo hace el pH de las soluciones, pasando de un valor de $0,38 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ a pH 4, hasta $9,3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ a pH 14. Por otra parte, el tiempo de vida de la forma semiquinona pasa de ser de 26 μs a pH 4 a 1 μs a pH 14.

B.2.5. Producción de peróxido de hidrógeno en células fotoelectroquímicas.

Utilizando como base la célula fotoelectroquímica descrita por Yamase (1981) para la producción de hidrógeno con FMN y EDTA, se ha diseñado una célula similar (véase Materiales y Métodos) para la fotoproducción de peróxido de hidrógeno. El compartimento anódico, parcialmente desoxigenado, contenía el fotosistema donador de electrones (una flavina como fotosensibilizador y un compuesto nitrogenado como donador de electrones), mientras que en el compartimento catódico, con un alto contenido en oxígeno, tenía lugar la reducción del O_2 a H_2O_2 .

B.2.5.1. Efecto de la naturaleza de los electrodos.

De acuerdo con la célula de Yamase (1981), se utilizó en principio EDTA y FMN como sistema donador de electrones, sistema de conocida eficiencia, por otra parte, en la producción de H_2O_2 en solución homogénea (Fontes et al., 1981). Electrodos fijos de distintos metales, como platino, plata y mercurio, se utilizaron como ánodo y cátodo. En la

TABLA VII

PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE OXIDACION CON
OXIGENO DEL RADICAL SEMIQUINONA DE LA LUMIFLAVINA A
VARIOS pHs

pH	$k(s^{-1})$	$\tau(\mu s)$
4	$0,38 \cdot 10^5$	26,2
6	$0,75 \cdot 10^5$	13,3
9	$7,80 \cdot 10^5$	1,28
12	$8,10 \cdot 10^5$	1,23
14	$9,30 \cdot 10^5$	1,07

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los resultados experimentales presentados en la Figura 37. Las cinéticas de oxidación con oxígeno del radical semiquinona de la lumiflavina se ajustaron a una reacción de pseudo-primer orden, determinándose la constante de velocidad (k) a partir de la recta obtenida al representar el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo. τ , tiempo de vida.

Tabla VIII se recogen los resultados obtenidos al ensayar varias combinaciones de electrodos. Es interesante resaltar que la mayor parte de estas combinaciones son efectivas, en mayor o menor grado, a excepción de aquellas en las que se utiliza un cátodo de platino, obteniéndose en estos casos producciones de H_2O_2 inferiores a $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Tabla VIII). Todos estos ensayos se hicieron con las dos hemicélulas a pH 7,5.

Entre todas las combinaciones de electrodos fijos, una de las más eficaces es aquella en la que el ánodo es de platino y el cátodo de mercurio. La Figura 38 muestra la cinética típica de producción fotoelectroquímica de peróxido de hidrógeno utilizando los electrodos citados, y FMN-EDTA como fotosistema donador de electrones. La velocidad de producción es del orden de $40 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$.

B.2.5.2. Efecto del pH y de los distintos fotosistemas donadores.

Según se muestra en la Tabla IX, la eliminación del pigmento hace que la producción de peróxido de hidrógeno por el sistema decaiga en más de un 60%, disminución similar a la que se observa cuando la reacción de formación de H_2O_2 se lleva a cabo en la oscuridad. Si se elimina el EDTA, compuesto donador de electrones, o el circuito externo, que actúa como conductor de los mismos, la producción de H_2O_2 , incluso al cabo de dos horas, queda fuera de los límites de detección del método de ensayo del peróxido.

La utilización de células fotoelectroquímicas, como las descritas en este trabajo, permite estudiar y seleccionar independientemente las condiciones óptimas para que transcurran eficazmente las reacciones, tanto de oxidación anódica de la flavina fotorreducida, como de reducción catódica del

TABLA VIII

EFICIENCIA DE UNA CELULA FOTOELECTROQUIMICA PRODUCTORA DE PEROXIDO DE HIDROGENO CON DISTINTOS METALES COMO ELECTRODOS

Anodo	Cátodo	producción de H ₂ O ₂
Pt	Pt	-
Ag	Ag	+
Ag	Pt	-
Pt	Ag	+
Pt	Hg	+
Hg	Hg	+

El compartimento anódico contenía, en un volumen final de 40 ml, FMN 0,1 mM, EDTA 20 mM y fosfato potásico 0,5 M (pH 7,5), mientras que la solución catódica estaba constituida simplemente por 40 ml del tampón citado a la concentración de 0,25 M. Ambos compartimentos se conectaron a través de electrodos fijos de los metales indicados, cerrándose el circuito con un puente salino. La solución anódica fue desoxigenada al burbujear ininterrumpidamente una corriente de N₂ a su través desde 45 minutos antes de comenzar el experimento, mientras que, por el contrario, el contenido en oxígeno de la solución catódica se incrementó haciendo circular por la solución una corriente de este gas. La reacción fotoquímica de producción de H₂O₂ comenzó al irradiar el compartimento anódico con luz blanca de 200 Wm⁻², sacándose a partir de entonces alícuotas de la solución catódica para determinar la cantidad de peróxido producido. El signo + recoge aquellas combinaciones de electrodos que permitieron obtener una producción de H₂O₂ superior a 10 μmol l⁻¹ h⁻¹, poniéndose el signo - en caso contrario.

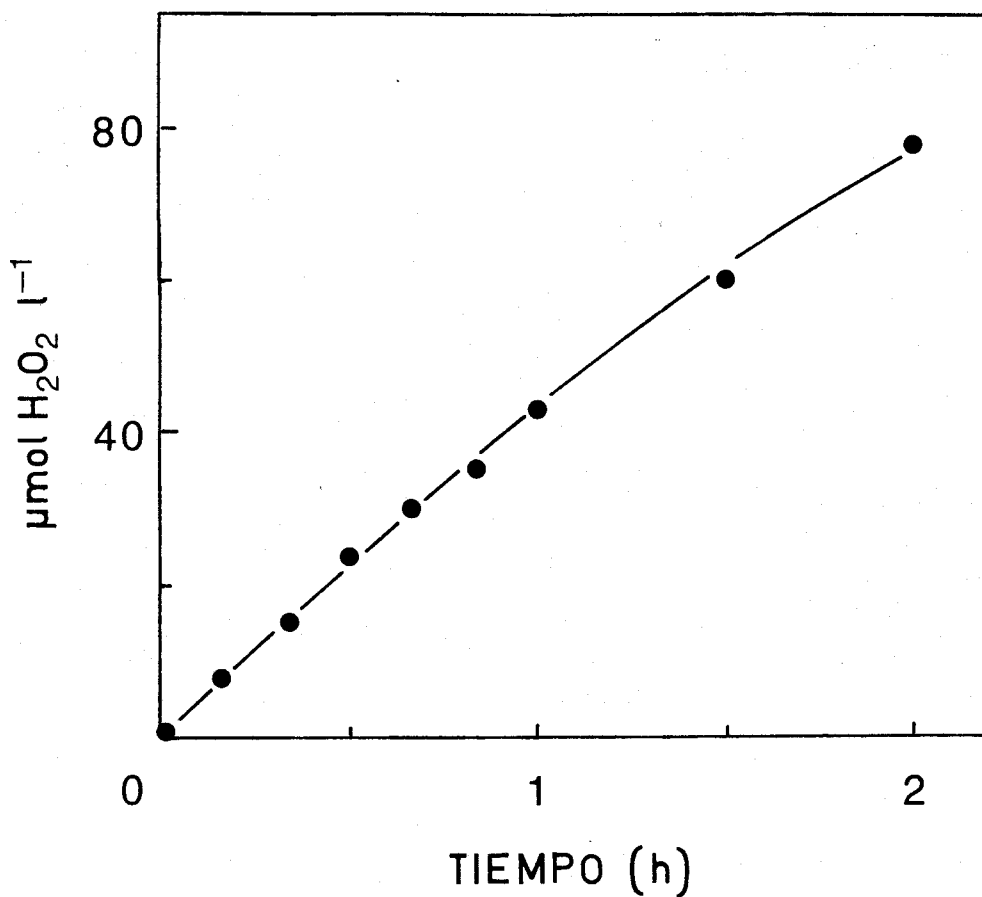


Figura 38. Cinética de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema EDTA/FMN/oxígeno en una célula fotoelectroquímica.

Las condiciones experimentales fueron las descritas en la tabla anterior. Los electrodos utilizados fueron de platino (ánodo) y de mercurio (cátodo).

TABLA IX

PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO CON EL SISTEMA
EDTA/FMN/OXIGENO EN UNA CELULA FOTOELECTROQUIMICA

Condiciones	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$
Sistema completo	75
menos luz	32
menos FMN	26
menos EDTA	<10
menos circuito exterior de cobre	<10

Las condiciones experimentales correspondientes al sistema completo fueron las descritas en la Tabla VIII, siendo los electrodos utilizados de platino (ánodo) y de mercurio (cátodo). El contenido en H_2O_2 se determinó al cabo de dos horas en la célula fotoelectroquímica completa y en ausencia de los factores indicados.

TABLA X

EFFECTO DEL pH, DE LOS METALES UTILIZADOS COMO ELECTRODOS Y DE LA NATURALEZA DEL FOTOSISTEMA DONADOR DE ELECTRONES SOBRE LA PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO CON UNA CELULA FOTOELECTROQUIMICA

pH		Electrodos		Fotosistema donador de electrones	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ l}^{-1}$
Solución anódica	Solución catódica	Anodo	Cátodo		
7,5	7,5	Pt	Hg	EDTA/FMN	75
14	7,5	Hg	Hg	EDTA/FMN	55
14	14	Pt	Hg	SC/LF	<10
7,5	7,5	Pt	Hg	SC/LF	50
14	7,5	Pt	Hg	SC/LF	130
14	7,5	Hg	Hg	SC/LF	200
14	1	Hg	Hg	SC/LF	358
14	1	Hg	Hg	HA/LF	400
14	1	Hg	Hg (gota)	HA/LF	420

Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Tabla VIII con las siguientes modificaciones: a) cuando el pH de las soluciones anódicas o catódicas fue distinto de 7,5, se sustituyó el tampón fosfato por NaOH 1 M (pH 14) o HClO₄ 0,1 M (pH 1); b) los electrodos fueron fijos y del metal indicado, a excepción del último caso en el que se utilizó un electrodo de gota de mercurio; y c) además del fotosistema EDTA/FMN se utilizaron otros en los que la lumiflavina (LF) actuaba como fotosensibilizador, y la semicarbazida (SC) o la hidroxilamina (HA) como donador de electrones. La concentración de H₂O₂ en la solución catódica se determinó al cabo de dos horas.

oxígeno molecular. La Tabla X recoge los resultados obtenidos al estudiar la producción fotoelectroquímica de peróxido de hidrógeno utilizando varios fotosistemas donadores de electrones, diversos electrodos, y distintos valores de pH en las dos hemicélulas. Entre todas las combinaciones ensayadas, cuando se utiliza hidroxilamina como fotosustrato, lumiflavina como pigmento fotorreceptor, ambos electrodos de mercurio —el ánodo, fijo; el cátodo, fijo o de gota— y pH 14 en el compartimento anódico y pH 1 en el catódico, se obtiene la máxima velocidad de formación del peróxido de hidrógeno, alcanzándose concentraciones de éste superiores a $0,4 \text{ mmol l}^{-1}$ en dos horas.

Puesto que ya se ha observado anteriormente que la hidroxilamina por sí sola es capaz de reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno a pH 14 (Roncel, 1983), se estudió también ahora si la hidroxilamina, en ausencia de lumiflavina iluminada, es capaz igualmente de producir H_2O_2 en la célula electroquímica. La Figura 39 muestra la cinética de producción de peróxido de hidrógeno, en las condiciones que de la Tabla X se desprenden como óptimas, y donde puede observarse que la eliminación de la lumiflavina del sistema conduce a una reducción de la velocidad de producción del peróxido de casi el 50%. No obstante, hay que hacer notar que se consigue una considerable producción de H_2O_2 poniendo como reactivos sólo NaOH 1 M en la hemicélula anódica y HClO_4 0,1 M en la catódica, y manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales.

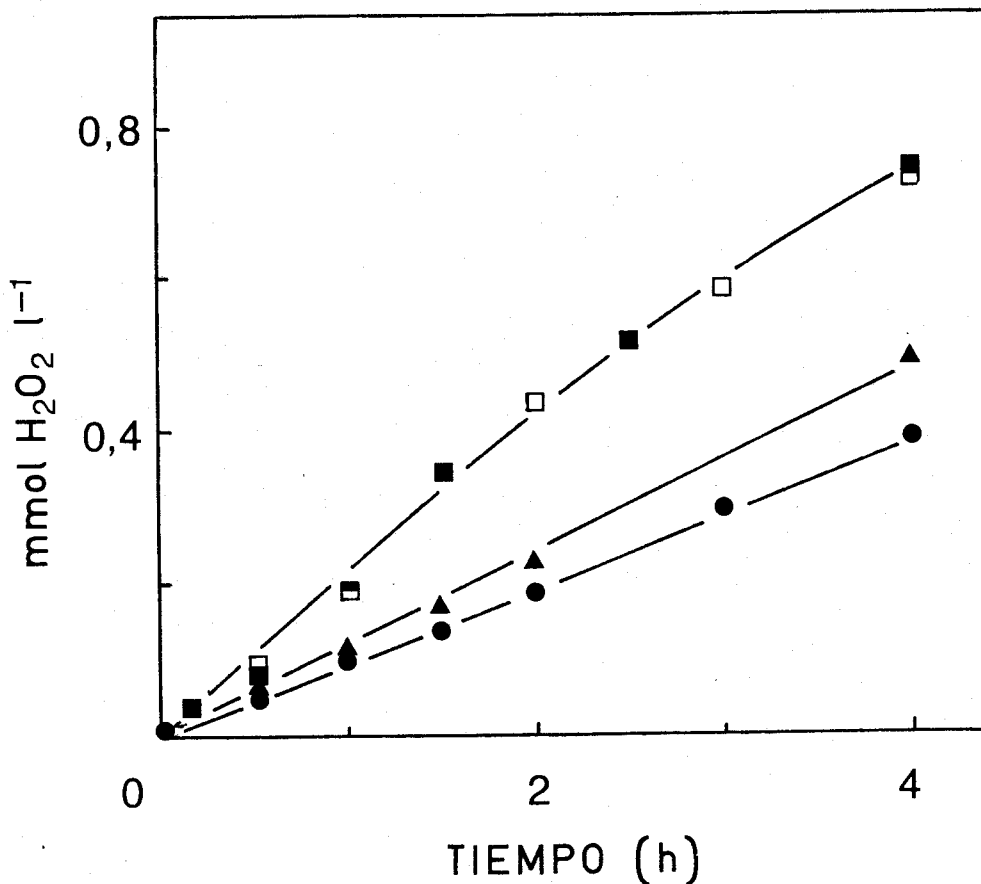


Figura 39. Cinéticas de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema hidroxilamina/lumiflavina/oxígeno en una célula fotoelectroquímica.

El compartimento anódico contenía, en un volumen final de 40 ml, hidroxilamina 20 mM, lumiflavina 0,1 mM y NaOH 1 M, con un electrodo fijo de mercurio. El compartimento catódico estaba constituido por 40 ml de una solución de HClO₄ 0,1 M, con un electrodo de mercurio fijo (■) o de gota (□). La solución anódica se gaseó con N₂ desde 45 min antes de comenzar el experimento, mientras que la solución catódica se gaseó con O₂. La reacción de producción del peróxido de hidrógeno comenzó al iluminar el compartimento anódico con luz blanca de 200 W m⁻². Como control se estudió la producción de H₂O₂ sin lumiflavina (▲) y sin lumiflavina ni hidroxilamina (●).

B.3. Producción de peróxido de hidrógeno con rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) como fotorreceptor.

B.3.1. Componentes del fotosistema.

Este otro sistema fotoquímico para la producción de peróxido de hidrógeno se basa en la utilización del complejo metálico rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) como fotorreceptor, actuando el oxígeno y la semicarbazida —al igual que en los fotosistemas flavínicos— como aceptor y donador de electrones, respectivamente. Las soluciones se sometieron asimismo a una intensa oxigenación e iluminación.

Como se recoge en la Tabla XI, la producción de peróxido de hidrógeno a pH 14 es estrictamente dependiente de la presencia simultánea del donador de electrones y del oxígeno en la célula de reacción, no observándose producción apreciable de H_2O_2 en ausencia de alguno de estos dos compuestos. Por el contrario, en ausencia del pigmento o en la oscuridad, tiene lugar la formación de una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno.

B.3.2. Factores que afectan a la eficiencia del sistema.

B.3.2.1. Efecto del pH.

En la Figura 40 se presenta la velocidad inicial de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/ $Ru(bipy)_3^{2+}$ /oxígeno en función del pH de las soluciones. La producción de peróxido es prácticamente nula a pH ácido, neutro o medianamente alcalino, pero se incrementa gradualmente al aumentar la concentración de iones hidroxilo hasta alcanzarse el máximo de producción a pH 14.

TABLA XI

FOTOPRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO POR EL SISTEMA
SEMICARBAZIDA/Ru(bipi)₃²⁺/OXIGENO A pH 14

Sistema de reacción	mmol H ₂ O ₂ l ⁻¹
Sistema completo	12
menos Ru(bipi) ₃ ²⁺	1,3
menos semicarbazida	<0,01
menos oxígeno	<0,01
menos luz	1,0

El sistema completo contenía, en un volumen final de 50 ml, Ru(bipi)₃²⁺ 0,1 mM, semicarbazida 20 mM y NaOH 1 M. La célula de reacción se irradió con luz blanca de 200 Wm⁻² y se gaseó con oxígeno a razón de 0,3 l min⁻¹. La concentración de H₂O₂ se determinó a los 60 minutos de reacción, tanto en el sistema completo como en ausencia de los factores indicados.

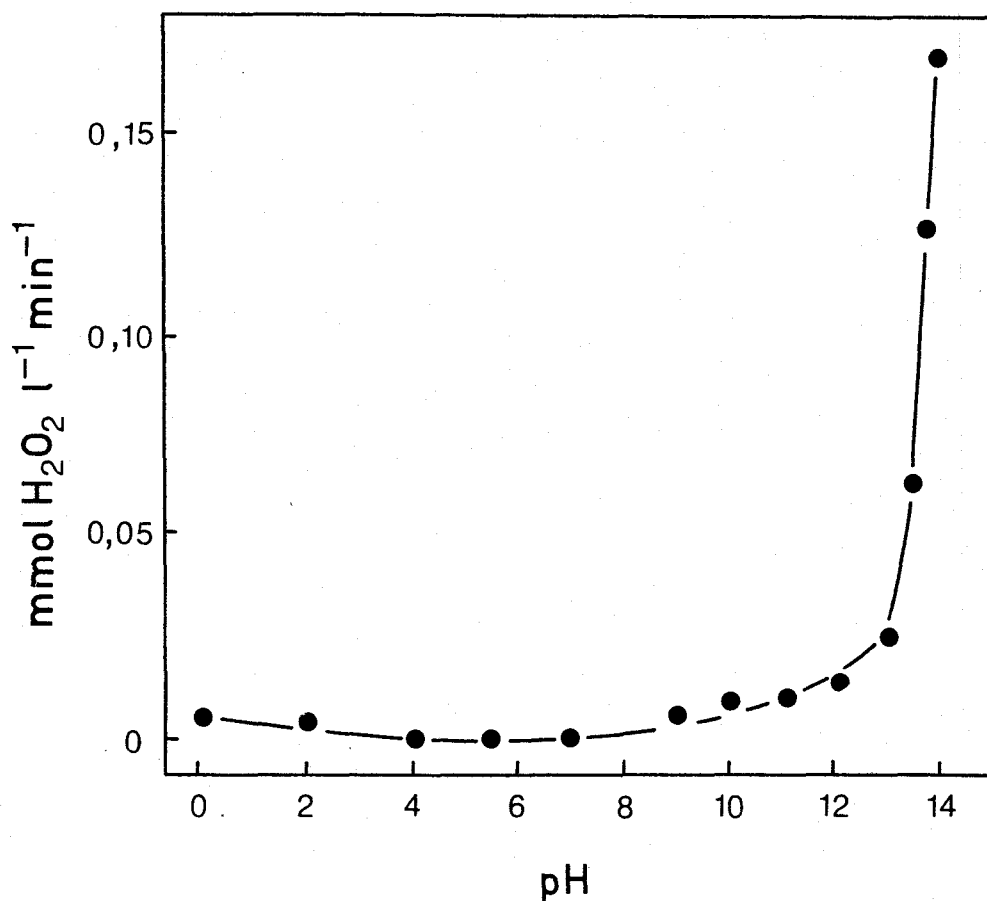


Figura 40. Efecto del pH sobre la velocidad inicial de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno.

La reacción se llevó a cabo en soluciones no tamponadas que contenían en un volumen final de 50 ml, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 0,1 mM y semicarbazida 20 mM. El pH se ajustó al valor deseado con NaOH o HCl 1 M, y fue continuamente controlado con un pH-metro. La célula de reacción se irradió con luz blanca de 200 W m^{-2} y se gaseó con oxígeno a razón de $0,3 \text{ l min}^{-1}$. A intervalos regulares de tiempo se sacaron pequeñas alícuotas para determinar la velocidad de producción de H_2O_2 .

B.3.2.2. Estabilidad del complejo de rutenio.

El $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se fotodegrada, aunque lentamente, a lo largo de la reacción de fotoproducción de H_2O_2 . En la Figura 41 se muestran varias cinéticas de degradación del pigmento a pH 14 y en distintas condiciones, siguiéndose esta degradación como una disminución de la absorbancia de las soluciones a 450 nm, longitud de onda de máxima absorción del complejo de rutenio en la zona visible del espectro.

La máxima velocidad de degradación del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se observa cuando, en presencia de semicarbazida, la solución se burbujea con nitrógeno, desapareciendo prácticamente toda la absorbancia de la solución a 450 nm a las cuatro horas de iluminación. La estabilidad del pigmento, por otra parte, aumenta en gran medida cuando, en presencia del donador, la solución se burbujea con oxígeno, manteniéndose en este caso más del 50% de la absorbancia a 450 nm tras cinco horas de iluminación. Velocidades intermedias se obtienen en ausencia de semicarbazida, tanto si se burbujea la solución con nitrógeno como con oxígeno.

B.3.2.3. Concentración del pigmento y del donador de electrones.

Un parámetro muy importante para determinar la eficacia de un sistema fotoquímico es la elección de las concentraciones óptimas del pigmento fotosensibilizador y del donador de electrones, de forma que la relación entre ambas concentraciones asegure un óptimo aprovechamiento de la energía luminosa incidente sobre el sistema y una máxima velocidad de producción del compuesto de interés, sin que haya desperdicio de material.

En la Figura 42 se recoge la variación de la velo-

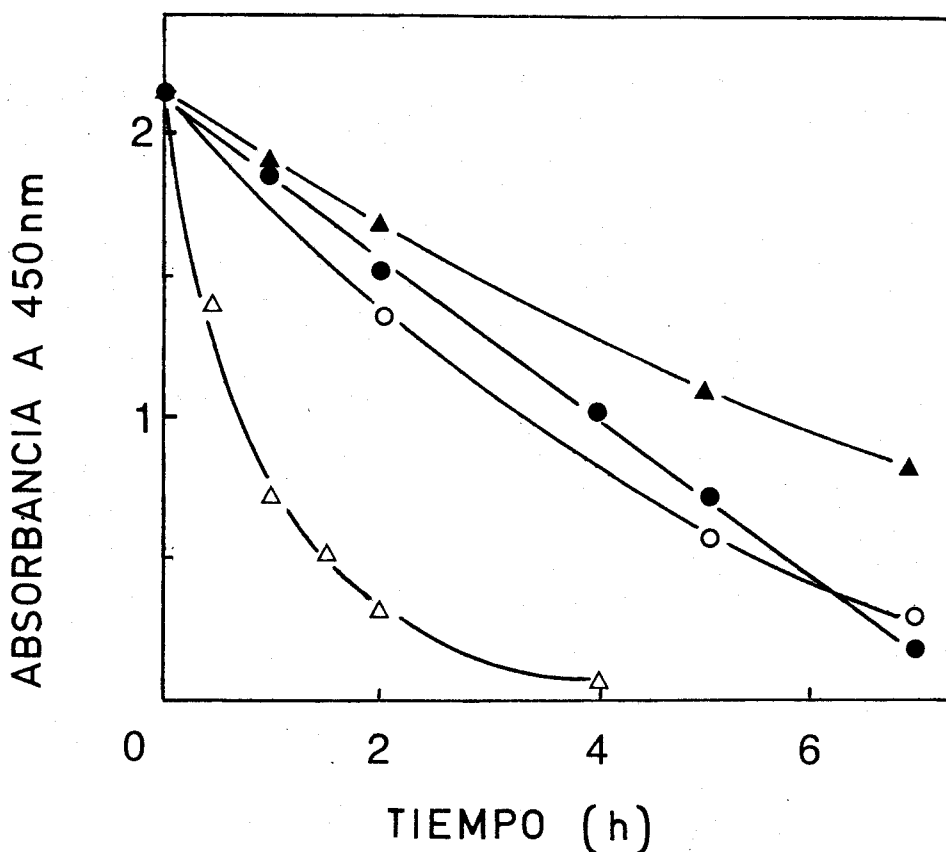


Figura 41. Fotodegradación a pH 14 del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en presencia o ausencia de semicarbazida y oxígeno.

Varias soluciones de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 0,15 mM en 50 ml de NaOH 1 M, con (triángulos) o sin (círculos) semicarbazida 20 mM, se gasearon con N_2 (símbolos vacíos) o con O_2 (símbolos llenos) a razón de $0,5 \text{ l min}^{-1}$ y, simultáneamente, se irradiaron con luz blanca de 200 W m^{-2} . A los tiempos indicados se sacaron alícuotas de 1 ml para determinar su absorbancia a 450 nm.

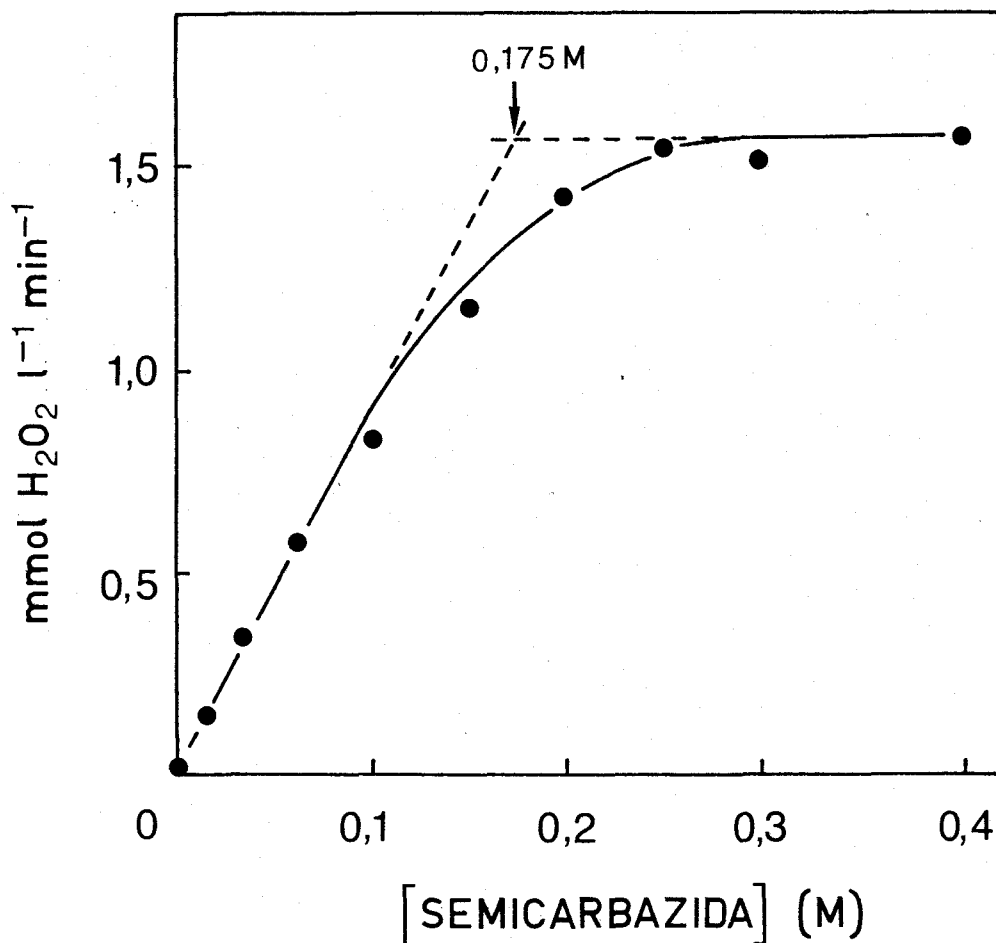


Figura 42. Efecto de la concentración de semicarbazida sobre la producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/Ru(bipi)₃²⁺/oxígeno.

La célula de reacción contenía, en un volumen final de 50 ml, Ru(bipi)₃²⁺ 0,1 mM, NaOH 1 M y semicarbazida (previamente neutralizada con NaOH) a las concentraciones indicadas. Las soluciones se gasearon con O₂ a razón de 0,3 l min⁻¹ y, simultáneamente, se irradiaron con luz blanca de 200 W m⁻². A intervalos regulares de tiempo se sacaron pequeñas alícuotas de las soluciones para determinar la velocidad inicial de producción de H₂O₂.

cidad inicial de producción de H_2O_2 por el fotosistema semicarbazida/ $Ru(bipy)_3^{2+}$ /oxígeno a pH 14 en función de la concentración del donador. La producción de peróxido de hidrógeno se incrementa conforme aumenta la concentración de semicarbazida hasta llegar a estabilizarse a concentraciones superiores a 0,2-0,3 M. Por extrapolación, y según se recoge en la figura, se seleccionó como óptima la concentración de 0,175 M.

En la Figura 43 se representa la velocidad de producción de H_2O_2 por el mismo fotosistema en función de la concentración de $Ru(bipy)_3^{2+}$, manteniendo constante la concentración inicial de semicarbazida en 0,175 M. La producción de peróxido de hidrógeno aumenta conforme se incrementa la concentración del pigmento, pero se estabiliza a concentraciones del mismo superiores a 100 μM . La concentración óptima del complejo de rutenio resulta ser de 25 μM .

En la Figura 44 se muestran las cinéticas de producción de peróxido de hidrógeno y de fotodegradación del pigmento, medida como disminución de la absorbancia de la solución a 452 nm, por el sistema semicarbazida/ $Ru(bipy)_3^{2+}$ /oxígeno para las concentraciones óptimas seleccionadas con anterioridad. La velocidad de formación de H_2O_2 es de 0,85 $mmol\ l^{-1}\ min^{-1}$ y, como se observa en la figura, la producción de peróxido de hidrógeno llega a alcanzar valores finales prácticamente iguales a la concentración de semicarbazida inicialmente presente en el sistema. Sin embargo, conforme aumenta la concentración de H_2O_2 formado, el pigmento se fotodegrada de forma paralela, de tal manera que tras seis horas de reacción fotoquímica de producción de H_2O_2 , y cuando se ha consumido prácticamente todo el donador de electrones, solo resta algo menos de la mitad de la absorbancia inicial a 452 nm de la solución.

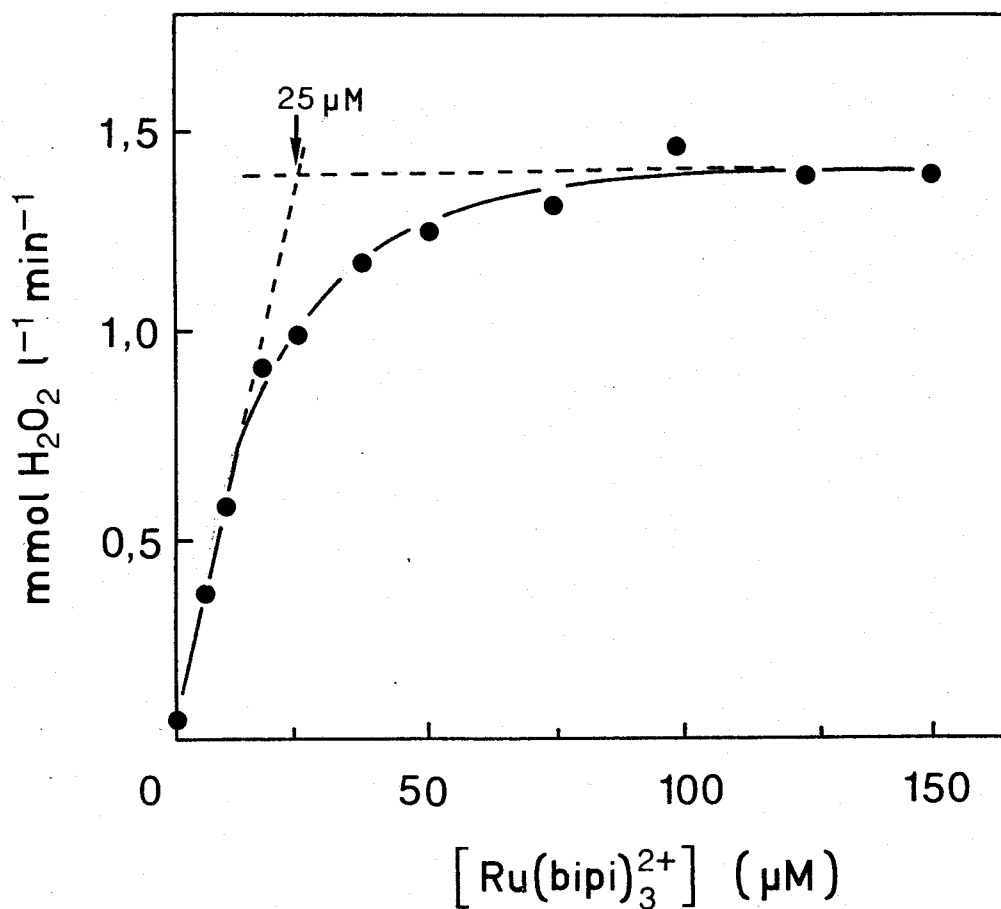


Figura 43. Efecto de la concentración de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ sobre la producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno.

La célula de reacción contenía, en un volumen final de 50 ml, NaOH 1 M, semicarbazida (previamente neutralizada con NaOH) 0,175 M y distintas concentraciones de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$. Las soluciones se gasearon con oxígeno a razón de 0,3 l min^{-1} y, simultáneamente, se irradiaron con luz blanca de 200 W m^{-2} . A intervalos regulares de tiempo se sacaron pequeñas alícuotas de la célula de reacción para determinar la velocidad inicial de producción de H_2O_2 .

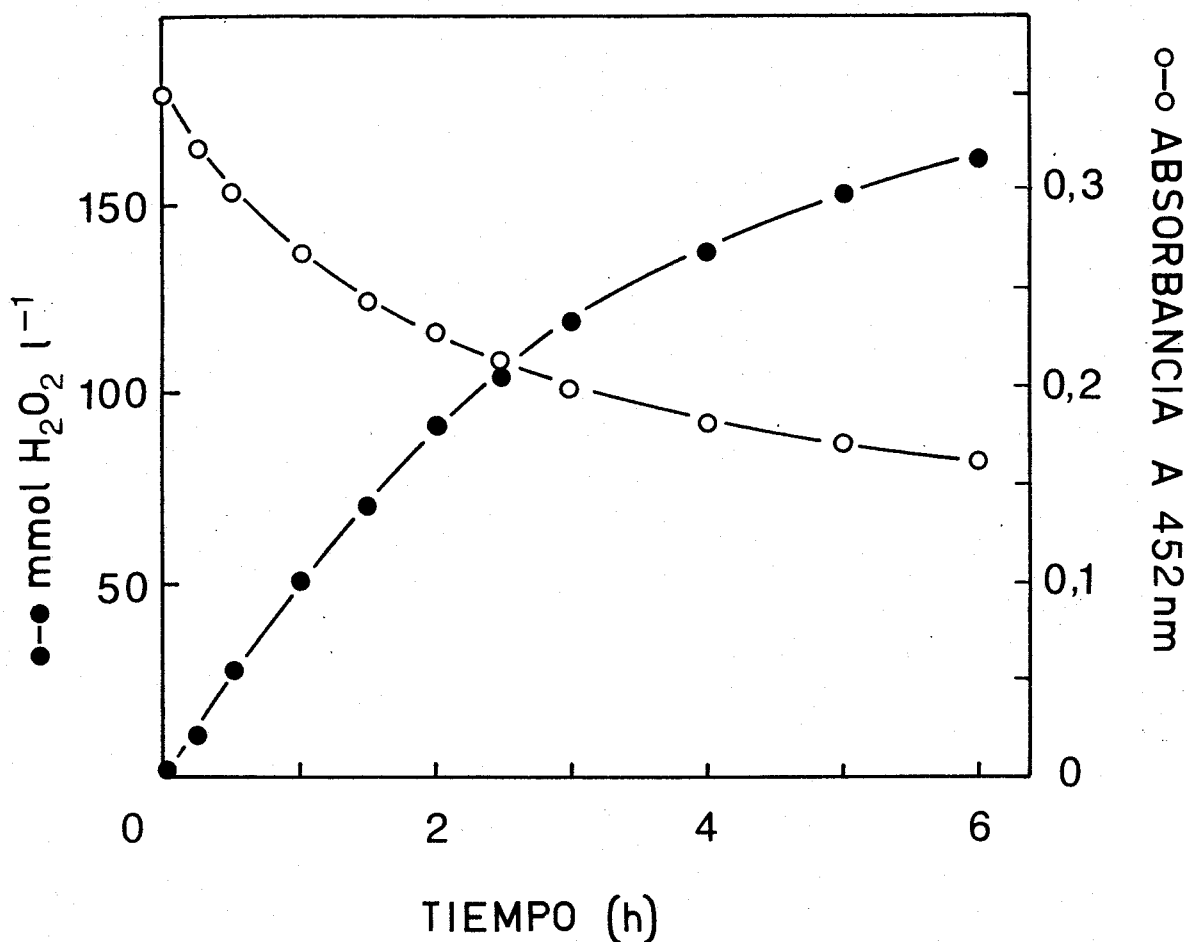


Figura 44. Cinéticas de fotoproducción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno y degradación del complejo metálico.

La célula de reacción contenía, en un volumen final de 50 ml, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 25 μM , NaOH 1 M y semicarbazida (previamente neutralizada con NaOH) a la concentración de 0,175 M. La reacción fotoquímica comenzó al irradiar la solución con luz blanca de 200 W m^{-2} , mientras que simultáneamente se pasaba a su través un flujo de oxígeno de $0,3 \text{ l min}^{-1}$. A los tiempos indicados se determinó el contenido en H_2O_2 y la absorbancia a 452 nm de la solución.

B.3.3. Inmovilización del complejo de rutenio en Nafion.
Producción en un sistema de flujo continuo.

Al igual que en el caso de los sistemas fotobiológicos inmovilizados, los sistemas continuos con el pigmento inmovilizado sobre un soporte presentan algunas ventajas respecto a los sistemas en solución homogénea. Así, el producto final de la reacción fotoquímica puede ser extraído de forma continua de la célula de reacción, y su posterior purificación del resto de los componentes del fotosistema es, por tanto, más fácil. La inmovilización, además, generalmente aumenta la estabilidad del fotosensibilizador, con lo que la producción del compuesto de interés se alarga más en el tiempo.

En la Figura 45 se muestran las cinéticas de producción de H_2O_2 por un sistema de flujo continuo (cuyo diseño se describe en Materiales y Métodos) por el sistema semicarbazida/ $Ru(bipi)_3^{2+}$ /oxígeno a pH 14 con el pigmento inmovilizado en Nafion, un polímero de perfluorosulfonato. Como puede observarse en la figura, la producción de H_2O_2 se incrementa gradualmente con el tiempo durante un período de al menos 33 h de iluminación. De igual manera, el nivel de peróxido de hidrógeno en la célula de reacción aumenta inicialmente de una manera rápida para estabilizarse, posteriormente, a las 10 h de reacción, manteniéndose entonces en la concentración alcanzada (más de 6 mM) durante al menos 22 h más. Transcurridas un total de 33 h de iluminación se logra recuperar por extracción con acetona (véase Materiales y Métodos) aproximadamente un 50% del pigmento inicialmente presente (datos no mostrados).

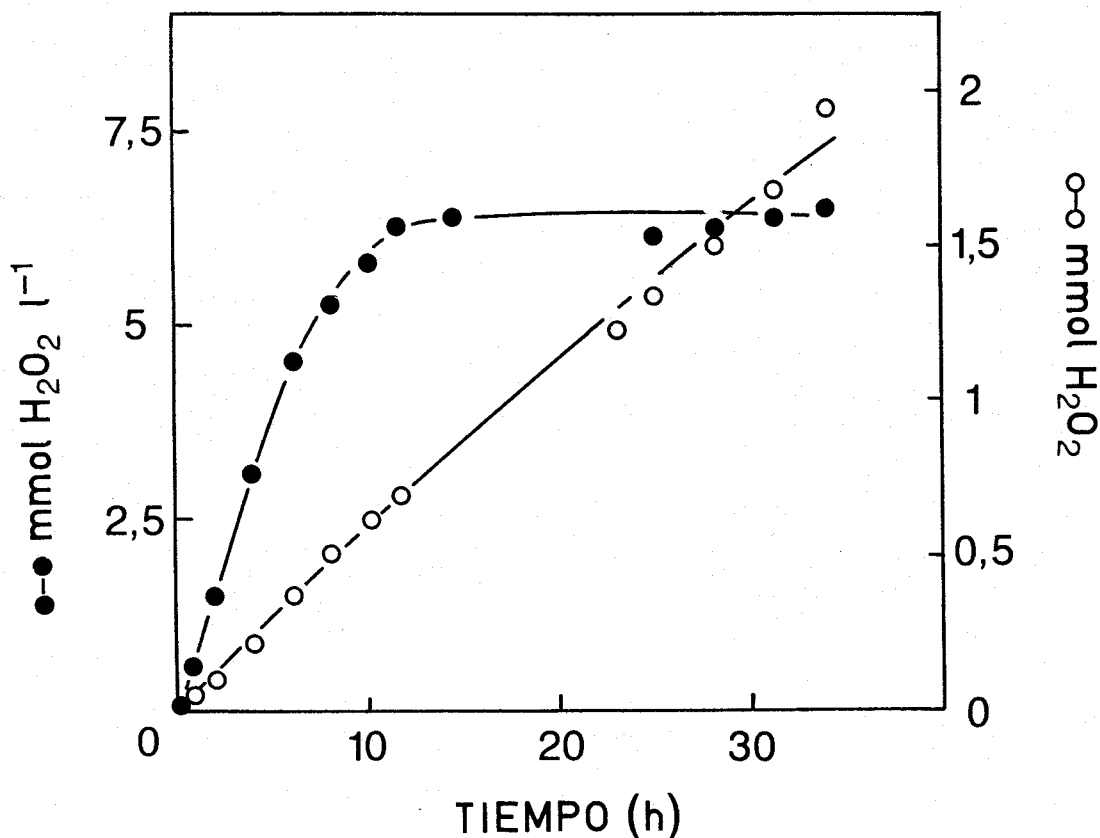


Figura 45. Producción de peróxido de hidrógeno, en un sistema de flujo continuo, por el fotosistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno.

Un esquema del sistema de flujo continuo utilizado se presenta en la Figura 10. El reservorio y la célula de reacción se llenaron con una solución que contenía semicarbazida 20 mM y NaOH 1 M. La célula de reacción (volumen total, 60 ml) también contenía dos discos sobre cuya superficie se habían adsorbido 10 μmol de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ inmovilizado en Nafion. La reacción fotoquímica comenzó al irradiar con luz blanca de 200 W m^{-2} la célula de reacción, que, simultáneamente, era gaseada con oxígeno a razón de $0,2 \text{ l min}^{-1}$. El medio de fotoproducción fluía desde el reservorio a la célula a la velocidad de $8,5 \text{ ml h}^{-1}$, determinándose el peróxido de hidrógeno formado en el medio que salía por el rebosadero así como su nivel en la célula de reacción.

B.3.4. Estudios sobre el mecanismo del proceso fotoquímico.

B.3.4.1. Efecto de la semicarbazida y del oxígeno sobre la emisión de fluorescencia del complejo de rutenio.

Se ha demostrado —a causa de la similaridad de sus tiempos de vida así como por su reactividad con distintos agentes— que el estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se corresponde con el estado luminiscente del complejo de rutenio (Bensasson *et al.*, 1976; Creutz *et al.*, 1980; Kalyanasundaram, 1982).

En los estudios de emisión de fluorescencia se excitó el pigmento a 450 nm, donde el complejo de rutenio presenta su máximo de absorbancia, y se registró el espectro de emisión de fluorescencia, eligiéndose la longitud de onda de 610 nm para los estudios de la misma por corresponder a un máximo de emisión.

En la Figura 46 se muestra la representación de Stern-Volmer para la disminución de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en presencia de oxígeno como agente amortiguador, tanto a pH neutro como a pH 14. A partir de las rectas obtenidas es posible el cálculo de la constante de Stern-Volmer, K_{SV} (ver Materiales y Métodos). Los valores determinados son del mismo orden en ambos casos, aunque la disminución de la luminiscencia es algo más acusada en agua ($K_{SV} = 1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) que a pH 14 ($K_{SV} = 1,25 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). En la Figura 47 se recoge la representación de Stern-Volmer para la desaparición de la fluorescencia del complejo de rutenio con semicarbazida como agente amortiguador a pH 14 y en ausencia de oxígeno. En este caso la constante K_{SV} es sensiblemente menor a la que se obtiene con O_2 como agente amortiguador ($K_{SV} = 1,1 \text{ M}^{-1}$), concretamente del orden de 1000 veces menor. Hay que indicar, en este sentido, que a pH neutro no se aprecia desaparición signi-

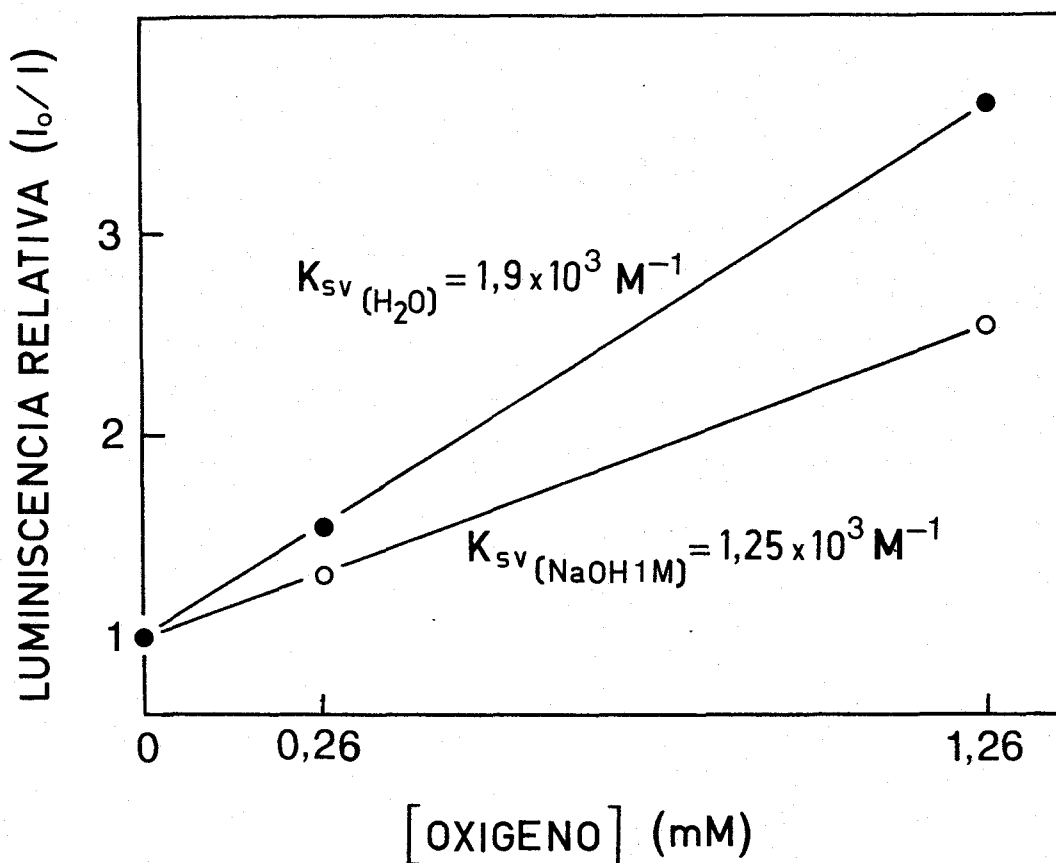


Figura 46. Efecto de la concentración de oxígeno sobre la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{bip})_3^{2+}$.

La cubeta de muestra del espectrofluorímetro contenía 3 ml de una solución de $\text{Ru}(\text{bip})_3^{2+}$ 25 μM en agua (●) o en NaOH 1 M (○). Después de 1 h de gaseo con N_2 , aire u O_2 a temperatura ambiente, se registró la emisión de luz de la solución a 612 nm tras su excitación a 450 nm. La concentración de oxígeno disuelto se consideró igual a 0,26 y 1,26 mM en las soluciones equilibradas con aire y oxígeno, respectivamente.

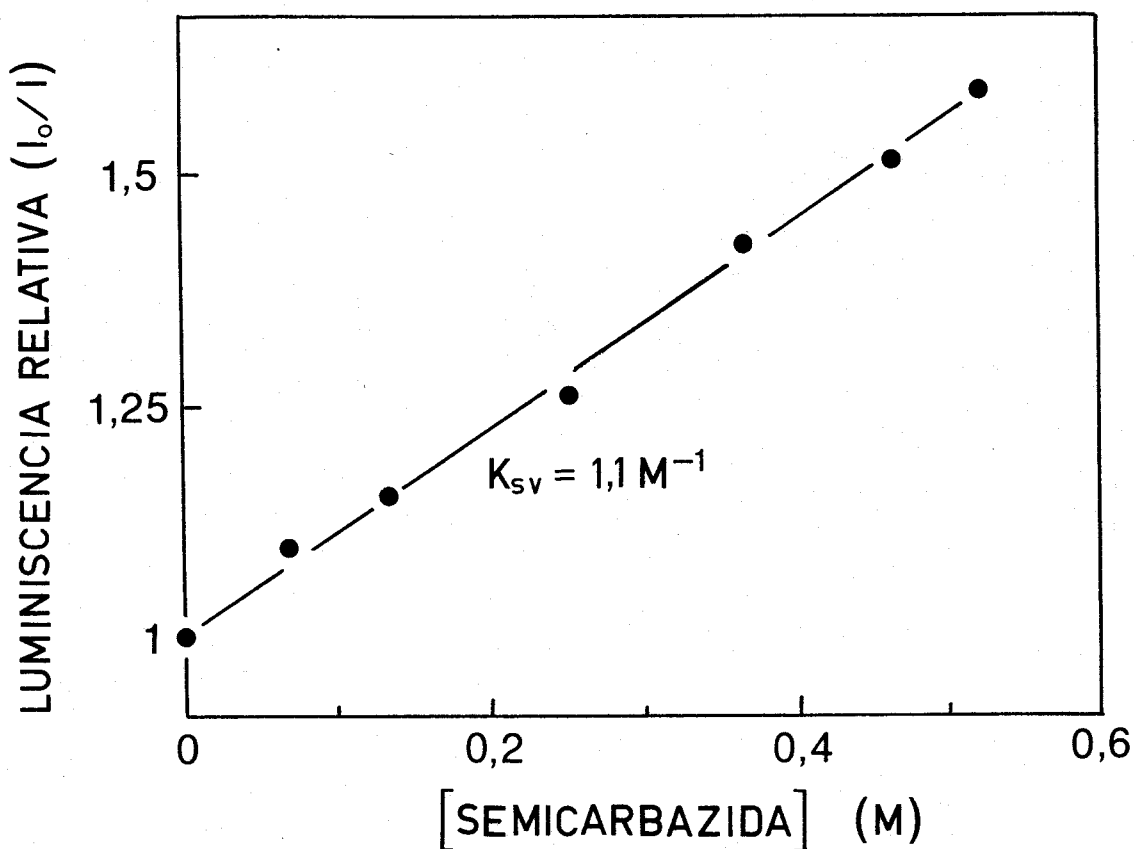


Figura 47. Efecto de la concentración de semicarbazida sobre la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$.

La cubeta de muestra del espectrofluorímetro contenía, en un volumen final de 3 ml, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 25 μM , NaOH 1 M y semicarbazida (neutralizada con NaOH) a las concentraciones indicadas. Después de 1 h de gaseo con N_2 , se registró la emisión de luz de la solución a 612 nm tras su excitación a 450 nm.

ficativa de fluorescencia en presencia de semicarbazida, incluso a concentraciones superiores a 0,5 M (datos no mostrados).

B.3.4.2. Análisis por espectroscopía de excitación con láser.

B.3.4.2.1. Identificación de las diversas especies implicadas.

En la Figura 48 se presentan los espectros de absorción diferencial, respecto del estado basal del complejo de rutenio, de una solución anaeróbica de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a pH 14 tras su excitación por el láser de rubí. El espectro registrado inicialmente (tiempo cero) presenta una disminución de la absorbancia con respecto al estado basal del pigmento en la zona entre 420-490 y 560-650 nm, y un aumento de dicha absorbancia en la zona entre 490-560 nm, que claramente corresponde al estado excitado, o triplete, del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ (Creutz et al., 1980; Kalyanasundaram, 1982). El espectro diferencial registrado 5 μs después de la excitación con el láser —esto es, cuando todo el triplete se ha desactivado— presenta una absorbancia negativa entre 420-480 nm, que corresponde al complejo de rutenio oxidado (número de oxidación 3+, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$), y una absorbancia positiva entre 480-560 nm, que corresponde al complejo reducido (número de oxidación 1+, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$) (Creutz et al., 1980; Kalyanasundaram, 1982).

En la Figura 49 se recogen nuevamente los espectros de absorción diferencial del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ tras la excitación con el láser, pero en una solución del pigmento altamente saturada de oxígeno. El espectro registrado a tiempo cero es el mismo que el obtenido en anaerobiosis. Sin embargo, el espectro registrado a los 5 μs de la excitación, aunque mantiene su aumento de absorbancia diferencial a 440 nm, debida como ya se ha citado a la aparición de la especie oxidada del

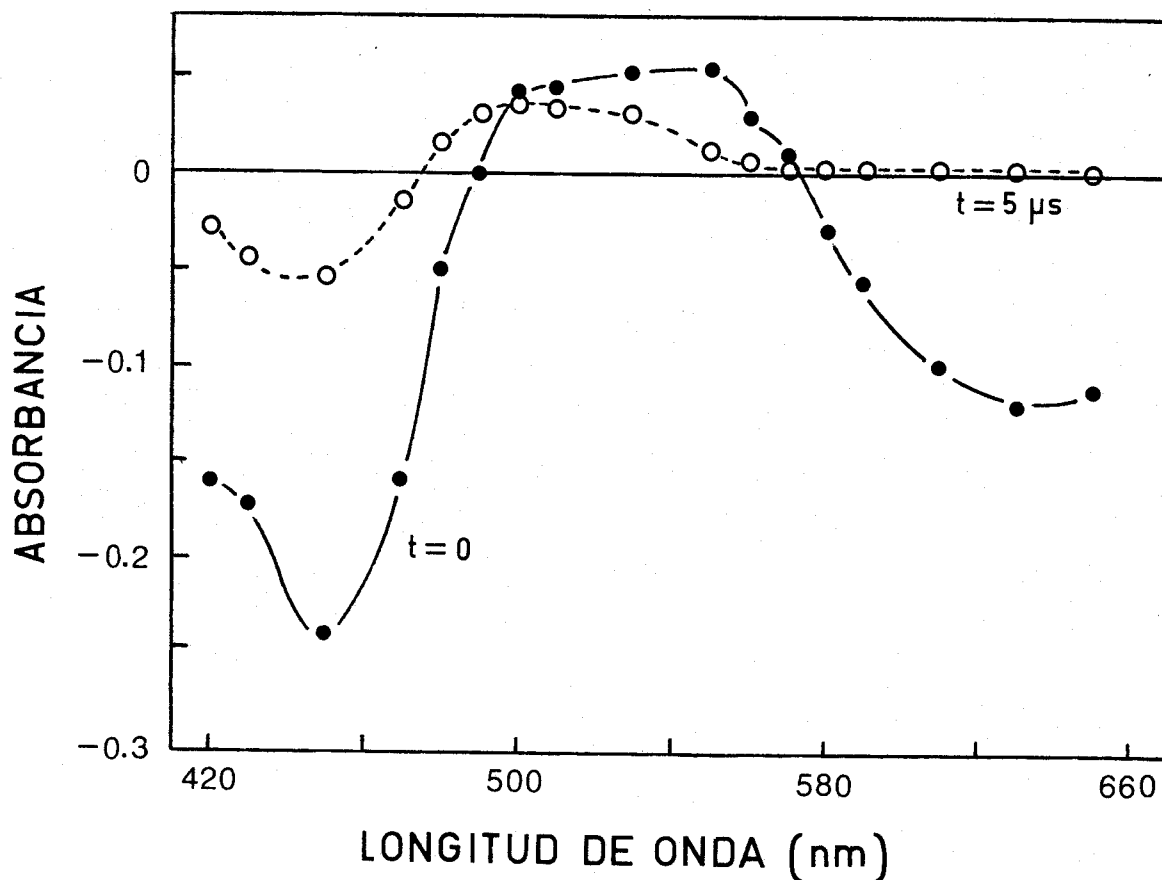


Figura 48. Espectros de absorción diferencial de una solución anaeróbica de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en NaOH 1 M tras su excitación con el láser de 347 nm.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 50 μM en NaOH 1 M. Después de 1 h de gaseo con N_2 en la oscuridad, la cubeta se colocó en el compartimento de muestras del equipo de espectrofotometría de excitación por láser. La absorción diferencial a distintas longitudes de onda se registró inmediatamente después (●) y a los 5 μs (○) de la excitación con el pulso de láser de 347 nm.

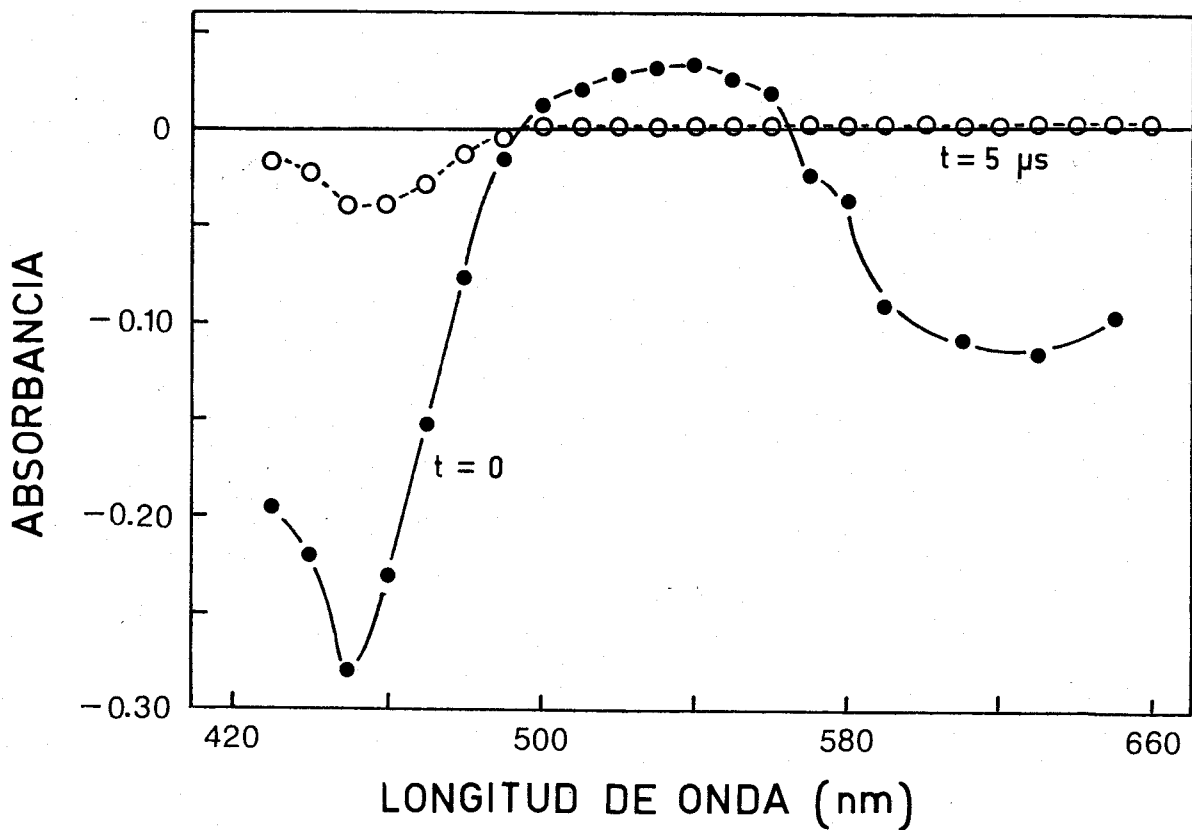


Figura 49. Espectros de absorción diferencial de una solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en NaOH 1 M y en presencia de oxígeno tras su excitación con el láser de 347 nm.

Las condiciones experimentales son las descritas en la figura anterior, excepto que la solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se gaseó con O_2 en vez de N_2 .

complejo metálico, no presenta la absorción diferencial en la zona del verde que aparece en ausencia de O_2 y que corresponde a la especie reducida del complejo de rutenio.

B.3.4.2.2. Cinéticas de desactivación del estado triplete.
Efecto del oxígeno y de la concentración de hidroxilo.

En la Figura 50 se presentan las cinéticas de desactivación —medidas como recuperación de la absorbancia basal a 610 nm tras la excitación con el láser— del triplete excitado del $Ru(bipy)_3^{2+}$ a pH 14, tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, observándose que el O_2 acelera en gran medida la desaparición del triplete del pigmento. Por el contrario, la cinética de desactivación no se afecta por la semicarbazida a la concentración de 20 mM (datos no mostrados). Cinéticas similares se obtuvieron a pH neutro.

En la Figura 51 se recogen nuevamente las cinéticas de desaparición de la especie excitada del complejo de rutenio a pH 14, pero ahora medidas como recuperación de la absorbancia basal a 452 nm, en presencia de oxígeno y en presencia o ausencia de semicarbazida (fase rápida inicial). A esta longitud de onda, tanto el triplete excitado como la especie oxidada del pigmento presentan una absorbancia diferencial negativa respecto a la forma basal del complejo de rutenio. Por tanto, las cinéticas se han registrado a esta longitud de onda a dos escalas distintas de tiempo, una rápida, a fin de estudiar la desaparición del estado excitado, y otra más lenta, para observar la aparición y posterior caída de la especie oxidada del pigmento. Como puede observarse en la figura, las cinéticas de desaparición de la especie excitada (fase rápida) son similares tanto en presencia como en ausencia de semicarbazida.

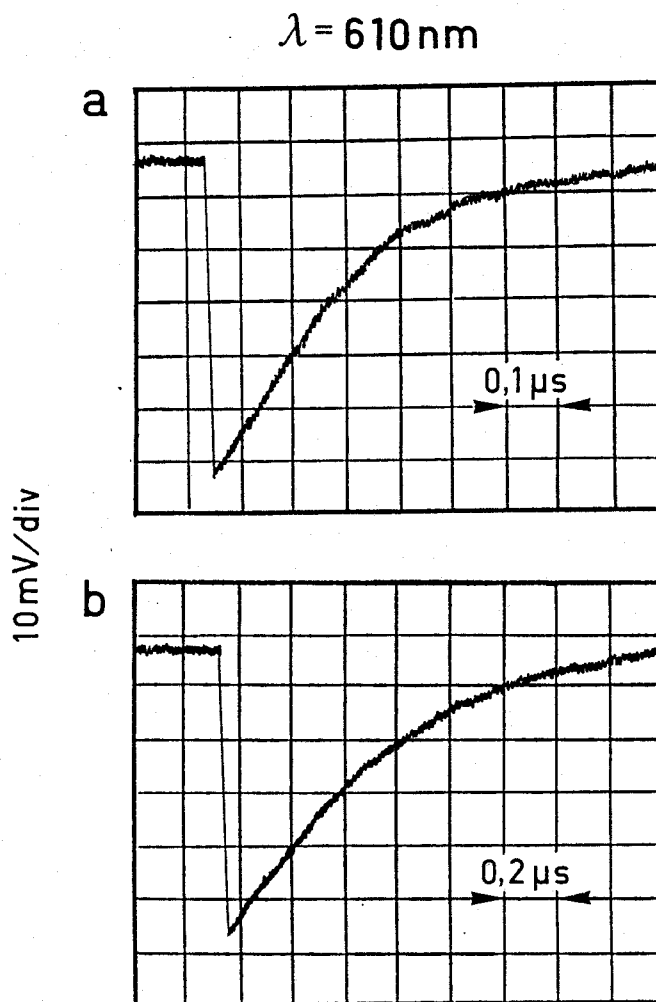


Figura 50. Cinéticas de desaparición del estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en NaOH 1 M.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 50 μM en NaOH 1 M. Después de 1 h de gaseo con O_2 (a) o N_2 (b) en oscuridad, se colocó la cubeta en el compartimento de muestras del equipo de espectrofotometría de excitación por láser, registrándose a 610 nm las cinéticas de desaparición de la forma excitada del pigmento tras la excitación con un pulso láser de 347 nm. Para una mejor comprensión de la figura, véase el texto.

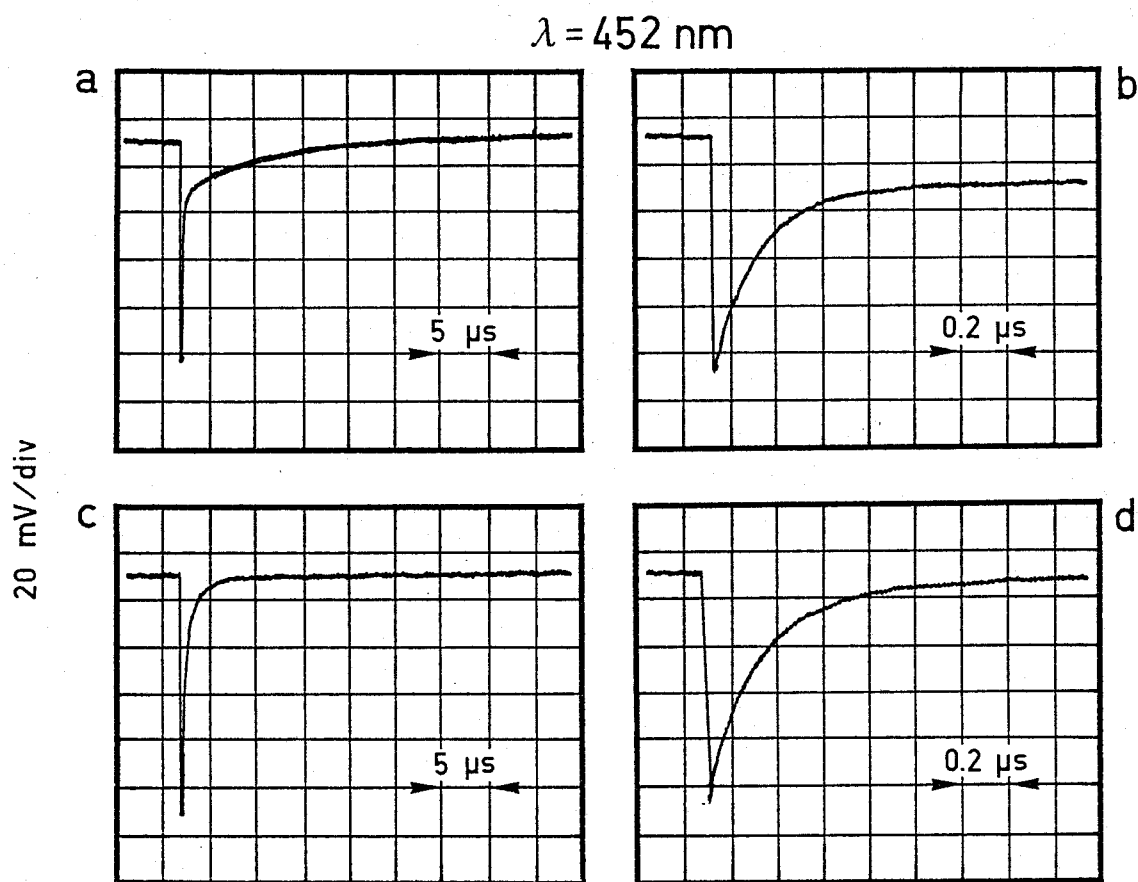


Figura 51. Efecto de la semicarbazida sobre la recuperación de la forma basal del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, tras la excitación con el láser de 347 nm de una solución enriquecida en O_2 del complejo metálico en NaOH 1 M.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 50 μM en NaOH 1 M. Después de 1 h de gaseo con O_2 en la oscuridad, se registró a 452 nm la cinética de recuperación de la forma basal del pigmento tras la excitación con un pulso láser de 347 nm y a distintas escalas de tiempo (a, b). A continuación, se inyectaron en la cubeta 40 μl de una solución de semicarbazida 2 M, registrándose los nuevos trazos tras la excitación con el láser (c, d). Para una mejor comprensión de la figura, véase el texto.

A partir de estas cinéticas ha sido posible calcular las constantes de velocidad de la reacción de desaparición, espontánea o inducida por el oxígeno, del estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, así como los tiempos de vida del mismo. En todos los casos la reacción de desaparición del estado excitado se ajustó a una cinética de primer orden (desaparición espontánea) o de (pseudo)-primer orden (desactivación inducida). En la Tabla XII se presentan los valores calculados de tiempos de vida y de las constantes de velocidad, k , de la reacción de desaparición del estado excitado en NaOH 1 M, estudiada a 610 y a 452 nm. Tanto a una como a otra longitud de onda, los valores de la constante k y del tiempo de vida son similares en las mismas condiciones experimentales. De los datos presentados en la Tabla se puede deducir que el estado excitado decae o desaparece con más rapidez en presencia de oxígeno, pero que esta desaparición no se ve afectada por la presencia de semicarbazida.

A partir de los valores de la constante k en presencia y en ausencia de O_2 , es posible calcular el valor de la constante bimolecular, k_q , de la reacción que tiene lugar entre el estado triplete del pigmento y el oxígeno (véase Materiales y Métodos). Así, asumiendo una concentración de oxígeno de 1,26 mM en las soluciones saturadas, la constante k_q es igual a $2,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 14.

En la Figura 52 se recogen las cinéticas registradas en las mismas condiciones que en la Figura 51, excepto que los experimentos se llevaron a cabo en agua y no en NaOH 1 M. En la Tabla XIII se presentan los parámetros cinéticos obtenidos a partir de estas cinéticas y de las cinéticas de desaparición del estado excitado registradas a 610 nm, tanto en presencia como en ausencia de semicarbazida (datos no mostrados). Los resultados son bastante similares a los obtenidos a pH 14, con excepción de que las constantes k son algo

TABLA XII

PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE DESAPARICION DEL ESTADO EXCITADO DEL $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ EN NaOH 1 M, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SEMICARBAZIDA Y OXIGENO

A. CONSTANTES DE VELOCIDAD

Condiciones	$k(\text{s}^{-1})$		
	452 nm	610 nm	media
N_2	$1,7 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$
O_2	$4,5 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
N_2 (+SC, 20 mM)	$2,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$
O_2 (+SC, 20 mM)	$4,2 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$

B. TIEMPOS DE VIDA

Condiciones	$\tau(\mu\text{s})$		
	452 nm	610 nm	media
N_2	0,57	0,67	0,62
O_2	0,22	0,18	0,20
N_2 (+SC, 20 mM)	0,50	0,55	0,52
O_2 (+SC, 20 mM)	0,24	0,21	0,22

Las constantes de velocidad y tiempos de vida se calcularon, según se describe en Materiales y Métodos, a partir de las cinéticas de desaparición del estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 452 nm (primera fase, en la Figura 51) y 610 nm (no mostrados). En todas las condiciones experimentales arriba indicadas, las cinéticas correspondieron a una reacción de (pseudo)-primer orden, calculándose su constante de velocidad (k) a partir de la recta obtenida al representar el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo. SC, semicarbazida; τ , tiempo de vida.

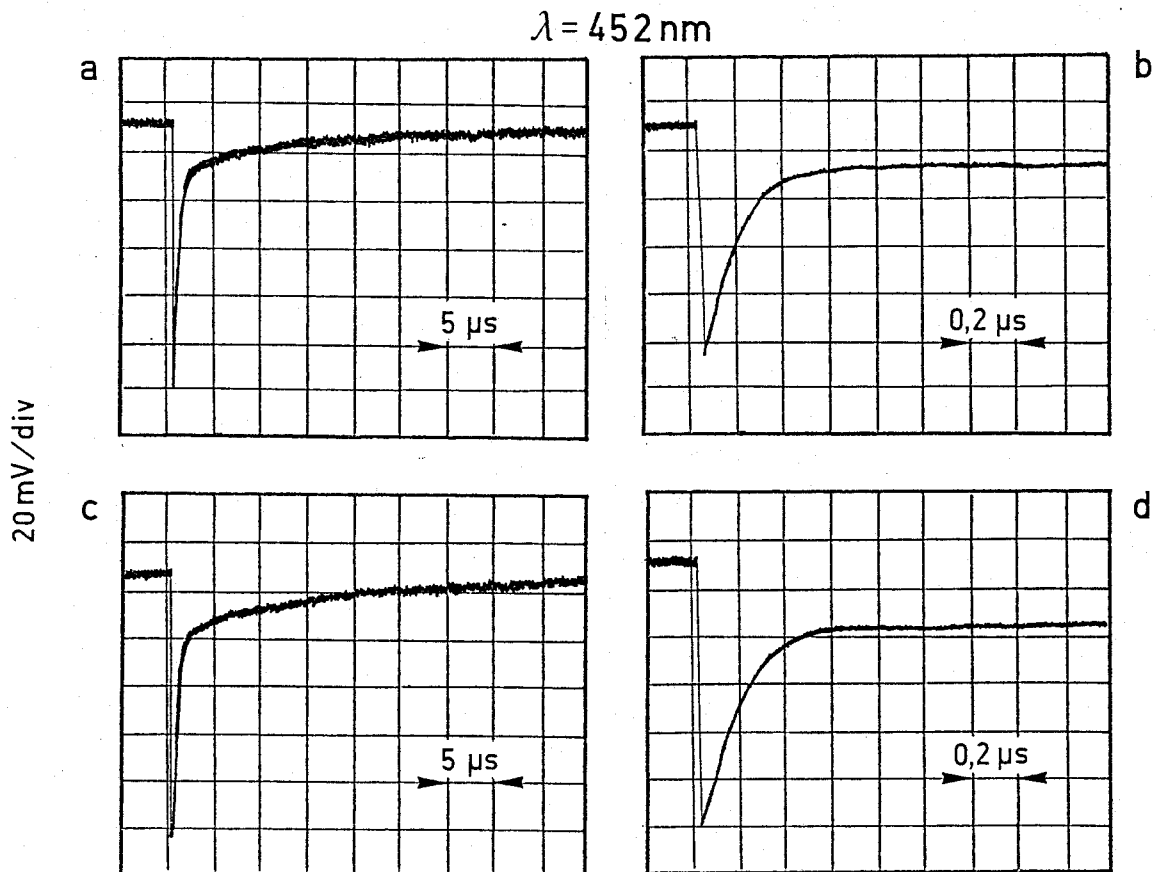


Figura 52. Efecto de la semicarbazida sobre la recuperación de la forma basal del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, tras la excitación con el láser de 347 nm de una solución enriquecida en O_2 del complejo metálico en agua.

Las condiciones experimentales son las descritas en la figura anterior, excepto que la solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se preparó en agua en vez de en NaOH. La semicarbazida se neutralizó con NaOH antes de su adición. a y b, sin semicarbazida; c y d, con semicarbazida.

TABLA XIII

PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE DESAPARICION DEL ESTADO EXCITADO DEL $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ EN AGUA, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SEMICARBAZIDA Y OXIGENO

A. CONSTANTES DE VELOCIDAD

Condiciones	$k (\text{s}^{-1})$		
	452 nm	610 nm	media
N_2	$1,4 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,35 \cdot 10^6$
O_2	$6,0 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	$5,75 \cdot 10^6$
N_2 (+SC, 20 mM)	$1,4 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,45 \cdot 10^6$
O_2 (+SC, 20 mM)	$6,1 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$5,85 \cdot 10^6$

B. TIEMPOS DE VIDA

Condiciones	$\tau (\mu\text{s})$		
	452 nm	610 nm	media
N_2	0,73	0,75	0,74
O_2	0,17	0,18	0,175
N_2 (+SC, 20 mM)	0,70	0,68	0,69
O_2 (+SC, 20 mM)	0,16	0,18	0,17

Las constantes de velocidad y tiempos de vida se calcularon, según se describe en Materiales y Métodos, a partir de las cinéticas de desaparición del estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a 452 nm (primera fase, en la Figura 52) y 610 nm (no mostrados). En todas las condiciones experimentales arriba indicadas, las cinéticas correspondieron a una reacción de (pseudo)-primer orden, calculándose su constante de velocidad (k) a partir de la recta obtenida al representar el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo. SC, semicarbazida; τ , tiempo de vida.

menores en ausencia de oxígeno, y algo mayores en su presencia, a pH neutro, lo que indica que en esta zona de pH —en comparación a lo observado a pH 14— el estado excitado es algo más estable en condiciones anaeróbicas y se desactiva más rápidamente por el oxígeno. La constante k_q de la reacción bimolecular entre el oxígeno y el estado excitado del complejo de rutenio es $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

B.3.4.2.3. Oxidación por oxígeno del complejo Tris(2,2'-bipiridilo).

En la Figura 53 se presentan las cinéticas de recuperación de la forma basal del complejo de rutenio a pH 14, en ausencia y en presencia de O_2 , registradas como recuperación de la absorbancia basal a 520 nm donde, como se vio con anterioridad, absorben diferencialmente respecto al estado basal tanto la forma excitada como la especie reducida, o $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$, del pigmento. En ausencia de oxígeno, la recuperación de la absorbancia basal a 520 nm sigue claramente una cinética bifásica, con una rápida caída inicial y una segunda fase más lenta. En presencia de oxígeno, sin embargo, tan sólo es posible observar la cinética rápida de caída de la absorbancia, de tal forma que la absorbancia basal se recupera totalmente a los 0,4 μs tras la excitación con el láser, lo que indica que, mientras en condiciones anaeróbicas se forman tanto la especie excitada, que desaparece con rapidez, y la reducida, que cae con más lentitud, por el contrario, en soluciones saturadas de oxígeno solo se forma la especie excitada, que decae rápidamente.

B.3.4.2.4. Reducción con semicarbazida del complejo rutenio (III)-Tris(2,2'-bipiridilo).

La segunda fase de las cinéticas que se presentan en la Figura 51 corresponde a la desaparición por reducción

$\lambda = 520 \text{ nm}$

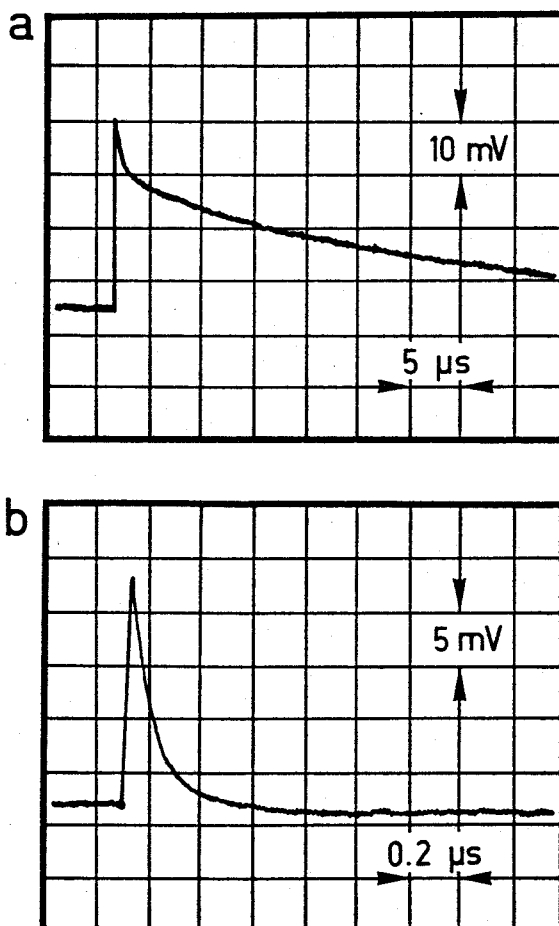


Figura 53. Cinéticas de recuperación de la forma basal del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, en presencia o ausencia de oxígeno, en NaOH 1 M.

La cubeta de reacción contenía 4 ml de una solución de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ 50 μM en NaOH 1 M. Después de 1 h de gaseo con N_2 (a) u O_2 (b) en la oscuridad, se colocó la cubeta en el compartimento de muestras del equipo de espectrofotometría de excitación por láser, registrándose a 520 nm las cinéticas de recuperación de la forma basal del pigmento tras la excitación con un pulso láser de 347 nm. Para una mejor comprensión de la figura, véase el texto.

de la forma oxidada del complejo de rutenio —formada por la reacción del estado excitado con el oxígeno en la primera fase— en NaOH 1 M. En ausencia de semicarbazida se observa una cinética claramente bifásica: la primera fase corresponde a la desactivación, acelerada por oxígeno, del estado excitado, con la consiguiente formación del complejo oxidado; en la segunda fase, el complejo oxidado es lentamente reducido hasta alcanzarse el nivel inicial de absorbancia. Por el contrario, en presencia de semicarbazida no se aprecia la diferencia entre las dos fases, observándose una cinética rápida, aparentemente única, de desaparición del estado excitado del pigmento.

En la Figura 52 se recogen los resultados de un experimento realizado en condiciones similares, pero a pH neutro en lugar de a pH 14. En este caso, la cinética bifásica se observa tanto en ausencia como en presencia de semicarbazida, con una fase rápida inicial de desactivación del estado excitado del complejo de rutenio, y una segunda fase lenta de reducción de la forma oxidada del pigmento.

En la Tabla XIV se presentan las constantes de velocidad de la reacción de (pseudo)-primer orden de reducción del estado oxidado del pigmento, tanto a pH neutro como en NaOH 1 M, calculadas a partir de la fase lenta de recuperación de la absorbancia basal a 452 nm en presencia (Figuras 51 y 52) o en ausencia (datos no mostrados) de oxigeno.

En ausencia de oxígeno y de semicarbazida, tanto a pH neutro como a pH 14 se obtienen valores parecidos de la constante k , del orden de $0,3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, y del tiempo de vida de la forma oxidada (30 μs). Sin embargo, en soluciones saturadas de oxígeno, pero en ausencia del donador, los valores de la constante de velocidad aumentan a la vez

TABLA XIV

PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE REDUCCION CON SEMI
CARBAZIDA DEL $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$

Condiciones	pH 7		pH 14	
	$k(\text{s}^{-1})$	$\tau(\mu\text{s})$	$k(\text{s}^{-1})$	$\tau(\mu\text{s})$
	N_2	$0,31 \cdot 10^5$	32,5	$0,33 \cdot 10^5$
O_2	$1,25 \cdot 10^5$	8,0	$0,63 \cdot 10^5$	16,0
N_2 (+SC, 20 mM)	$0,58 \cdot 10^5$	17,2	-	-
O_2 (+SC, 20 mM)	$1,00 \cdot 10^5$	10,0	-	-

Los parámetros cinéticos corresponden a la segunda fase, o fase lenta, de las cinéticas presentadas en las Figuras 51 y 52. En todos los casos, dichas cinéticas se ajustaron a una reacción de pseudo-primer orden y se calculó su constante de velocidad (k) al representar el logaritmo de la absorbancia frente al tiempo. SC, semicarbazida; τ , tiempo de vida.

que disminuyen los tiempos de vida del estado oxidado ($k = 1,25 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $\tau = 8 \mu\text{s}$, pH neutro; $k = 0,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $\tau = 16 \mu\text{s}$, pH 14), lo que indica que la forma oxidada del pigmento desaparece con más rapidez en presencia de oxígeno que en su ausencia, seguramente a causa de la reacción reversa entre la especie oxidada del complejo de rutenio y los radicales superóxido formados en la interacción entre el pigmento y el oxígeno.

En presencia de semicarbazida, tanto en soluciones anaeróbicas o saturadas de oxígeno, los valores de la constante k de reducción de la especie oxidada del complejo de rutenio, a pH neutro, son del mismo orden que los que se obtienen en ausencia del donador. A pH 14, sin embargo, no se pueden determinar estos valores dado que esta segunda fase se confunde con la primera (véase la Figura 51).

IV. DISCUSSION.

Como ya se ha indicado en la Introducción, la fotogeneración de peróxido de hidrógeno por cloroplastos aislados o vesículas tilacoidales está bien establecida y se conoce como "reacción de Mehler", habiendo quedado demostrado que la producción de H_2O_2 tiene lugar mediante la reducción del oxígeno molecular con los electrones suministrados por el aparato fotosintético vegetal (Good y Hill, 1955; Mehler, 1951). En ausencia de mediadores redox exógenos, el oxígeno puede interactuar directamente con los componentes de la cadena fotosintética de transporte en una reacción de transferencia de un solo electrón, con la consiguiente formación de radicales superóxido (O_2^-) que, por dismutación posterior, conducen a la producción de H_2O_2 (Allen, 1977). Desde un punto de vista termodinámico, el oxígeno puede aceptar electrones de ambos fotosistemas, aunque la reducción del O_2 por el fotosistema I parece ser el mecanismo predominante de generación de radicales superóxido y, en consecuencia, de formación de peróxido de hidrógeno (Herber y French, 1968; Sayre y Homann, 1979). En este sentido, se ha postulado que el oxígeno puede aceptar electrones tanto del aceptor primario del fotosistema I como de la ferredoxina reducida (Asada y Nakano, 1978; Misra y Fridovich, 1971; Telfer et al., 1970).

La reacción de reducción fotosintética de oxígeno puede ser potenciada en gran medida por la adición de ciertos mediadores redox, artificiales o naturales, tales como viológenos, flavinas o quinonas, que actúan como aceptores de electrones a nivel del sitio reductor del fotosistema I para, posteriormente, transferir estos electrones al oxígeno, con la consiguiente formación de radicales superóxido y, consecuentemente, de peróxido de hidrógeno (Allen, 1977; Elstner, 1982; Halliwell, 1981). Elstner y Frommeyer, sin embargo, han descrito la formación de H_2O_2 por reducción directa, con dos

electrones, del oxígeno en presencia de ciertas quinonas sin téticas que interaccionan directamente con el sitio reduc- tor del fotosistema II (Elstner y Frommeyer, 1978 a,b; Gould e Izawa, 1973).

Teniendo, pues, en cuenta estos antecedentes, el primer paso en el estudio del aprovechamiento de la energía solar mediante la producción de peróxido de hidrógeno por el aparato fotosintético de espinacas, consistió en la selección del mediador redox más eficaz a la hora de potenciar la fotogeneración de H_2O_2 en suspensiones de vesículas tilacoidales. Entre los distintos mediadores ensayados, la riboflavina ha demostrado ser el intermediario redox más eficaz, tanto en aumentar la velocidad de formación de H_2O_2 como en obtener los niveles finales de peróxido más elevados. La adición de riboflavina en cantidades catalíticas estimula del orden de 17 veces la velocidad inicial de producción de H_2O_2 y multiplica por cuatro el nivel final de peróxido formado, todo ello en comparación a los valores obtenidos con vesículas tilacoidales en ausencia de mediadores añadidos. El efecto que ejerce el CMU, inhibiendo tanto la producción de peróxido de hidrógeno como el consumo fotosintético de O_2 , indica claramente que los electrones necesarios para la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno provienen, en último término, de la fotooxidación por el fotosistema II de la molécula de agua.

La producción de peróxido de hidrógeno por vesículas tilacoidales, en presencia de riboflavina, sigue típicamente una cinética que presenta una fase inicial de rápida formación de H_2O_2 seguida de una estabilización a los 10 min de iluminación. Esta detención en la producción de H_2O_2 puede relacionarse con una fotoinhibición de la actividad fotosintética, causada por la acción de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies activas de oxígeno (oxí-

geno singlete, radicales hidroxilo) que se forman durante las reacciones de reducción fotosintética del oxígeno o por su interacción con los estados excitados de los pigmentos. De hecho, el oxígeno y sus especies activas son consideradas como altamente tóxicas por causar daños irreparables en las estructuras biológicas (Elstner, 1982; Michelson et al., 1977). En este sentido, se ha observado que la inclusión de agentes sequestradores de oxígeno en los sistemas de fotoproducción de hidrógeno por cloroplastos aislados protege al fotosistema de la inactivación, prolongando de esta forma el período de fotoproducción (Rao y Hall, 1979; 1983)

De la Rosa et al. (1986) han descrito en el fotosistema tilacoides/riboflavina, productor de H_2O_2 , que mientras la actividad asociada al fotosistema I no disminuía apreciablemente después de 15 min de iluminación, la actividad asociada al fotosistema II, por el contrario, se inhibía totalmente en este lapso de tiempo. Estos resultados coinciden con los publicados con anterioridad respecto a los sistemas de producción de hidrógeno y que indican una inhibición de la actividad fotosintética más acusada en el caso del fotosistema II (Cornic y Miginiac-Maslow, 1985; Gisby et al., 1982; Morris et al., 1982; Santos y Hall, 1982). Todo ello se ajusta al hecho de que la actividad de formación de H_2O_2 se reanuda, tras la estabilización del nivel de peróxido formado, al añadir a la suspensión tilacoidal el sistema ascorbato/DPIP, que introduce electrones en la cadena de transporte a nivel del fotosistema I. La adición del sistema exógeno donador acelera, asimismo, el consumo fotosintético de oxígeno en presencia de riboflavina, lo que, en unión del resultado anterior, indica claramente que este intermediario acepta los electrones necesarios para la reducción del O_2 a H_2O_2 a nivel del fotosistema I, actuando por tanto el fotosistema II solamente como fuente de electrones para este fotosistema, pudiendo ser sustituido por otro sistema donador, en este caso DPIP reduci

do con ascorbato.

Como ya se ha discutido, el fotosistema I presenta una mayor resistencia ante la fotoinactivación respecto al fotosistema II, por lo que, con vistas a un amento de la estabilidad funcional del sistema de fotoproducción de peróxido de hidrógeno, se ha estudiado la producción de este compuesto por el fotosistema I, y a partir de los electrones suministrados por donadores exógenos artificiales. Con este fin se han ensayado distintos sistemas donadores —todos ellos ampliamente descritos como fuentes alternativas de electrones al fotosistema II (Trebst y Avron, 1977)— en los que el DPIP o el TMPD actúan como intermediarios cediendo electrones al fotosistema I y, una vez oxidados, son reducidos por ascorbato, DTE, DTT, cisteína o glutatión. El TMPD se comporta como más eficaz intermediario que el DPIP ya que, a igualdad de donador final, se obtienen mayores consumos fotosintéticos de oxígeno y más altas producciones de peróxido de hidrógeno cuando es este compuesto el intermediario en la reducción del fotosistema I. El sistema DTE/TMPD ha permitido, entre todos los ensayados, alcanzar las más elevadas velocidades de consumo de oxígeno y los mayores niveles de producción de peróxido de hidrógeno. Con este sistema como donador de electrones para la reducción del O_2 a H_2O_2 mediada por el fotosistema I, el período de producción de peróxido de hidrógeno, en presencia de riboflavina, se alarga hasta alcanzarse 20 min de reacción de formación de H_2O_2 , tras los cuales el nivel de peróxido se estabiliza, presumiblemente por la inactivación del fotosistema I causada por el acúmulo de las especies activas de oxígeno que se forman en el transcurso de las reacciones fotosintéticas de reducción de este compuesto.

La inmovilización de los tilacoides ha sido una estrategia ampliamente utilizada para aumentar la estabilidad funcional de las membranas fotosintéticas. Con este fin se han empleado matrices de diferente naturaleza, obteniéndose en cada caso grandes variaciones en la actividad fotosintética y estabilidad de las membranas (Cocquempot et al., 1981; Gisby y Hall, 1980; Rao y Hall, 1984). En los sistemas biológicos productores de hidrógeno, la inmovilización o el microencapsulamiento de los cloroplastos permite alargar el período de producción hasta 7-8 h, aunque hay que señalar que en estos casos la tasa de formación de hidrógeno es generalmente más reducida en relación a los sistemas libres (Gisby y Hall, 1980; Hall et al., 1984).

De la Rosa et al. (1986) han descrito, entre varios soportes, al agar como matriz más eficaz en preservar una alta actividad de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema tilacoides/riboflavina en presencia del sistema ascorbato/DPIP como fuente de electrones. En nuestro caso la inmovilización en agar de las vesículas tilacoidales ha permitido alargar la duración de la reacción de fotogeneración de H_2O_2 durante al menos 60 min, en un sistema cerrado en presencia de riboflavina y con el sistema DTE/TMPD como fuente de electrones. Hay que señalar, sin embargo, que si bien con los tilacoides inmovilizados se obtienen niveles de H_2O_2 similares a los alcanzados en los sistemas libres, el método de inmovilización reduce significativamente la actividad de formación del peróxido, ya que estos niveles de H_2O_2 se alcanzan empleando en estos experimentos cantidades de vesículas tilacoidales equivalentes a 6 veces la cantidad de clorofila empleada en los ensayos con membranas fotosintéticas libres.

La inmovilización de las vesículas tilacoidales en agar ha permitido, además, el diseñar un sistema de flujo continuo para la producción de peróxido de hidrógeno. En este sistema el peróxido es continuamente retirado de la célula de reacción —evitando la exposición de las membranas fotosintéticas a altos niveles de H_2O_2 —, al mismo tiempo que se introduce, también continuamente, medio fresco de fotoproducción conteniendo el sistema donador (DTE/TMPD) y riboflavina. Con este sistema, tras una primera fase inicial de rápida formación de H_2O_2 , se alcanza una fase estable de producción de peróxido de hidrógeno que se mantiene durante las cuatro horas estudiadas de reacción de fotogeneración de H_2O_2 , sin que se observe un descenso en la velocidad de producción.

Estos resultados representan una importante mejora en el diseño de un sistema biológico de formación de peróxido de hidrógeno, especialmente con vistas a obtener una estabilidad operacional. La estabilización por inmovilización permite construir fotobiorreactores que faciliten la extracción y purificación del producto final, así como, debido a la posibilidad de incrementar la densidad de los tilacoides en el sistema inmovilizado, acelerar la reacción de formación de H_2O_2 .

Se ha sugerido, en los sistemas de fotoproducción de hidrógeno por el fotosistema I de membranas tilacoidales con sistemas exógenos donadores, que el flujo cíclico de electrones alrededor de este fotosistema podría limitar la reducción del mediador redox a partir de las membranas fotosintéticas y, por lo tanto, disminuir la tasa de producción de hidrógeno (Krasnovsky *et al.*, 1980; Rosen y Krasna, 1980). Peters *et al.* (1984) han estudiado la producción de hidrógeno por partículas purificadas del fotosistema I en

presencia del sistema combinado DTE/ascorbato como donador y metilviológeno como mediador redox, obteniendo velocidades de producción de H_2 de hasta $120 \mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que son del mismo orden a las que se alcanzan en condiciones similares con el fotosistema I integrado en cloroplastos. Según estos autores, el paso limitante en el proceso de formación de hidrógeno es la oxidación del metilviológeno, previamente reducido con electrones suministrados por las membranas fotosintéticas, y que los autores asumieron deberse, más que a su interacción con componentes de la cadena de transporte electrónico previa al fotosistema I, a la reacción con los donadores y sus formas oxidadas.

En nuestro caso se ha estudiado la producción de H_2O_2 por partículas del fotosistema I purificadas según el método de Peters et al (1983). Estos autores han descrito que el resultado final de la purificación es la obtención de una población homogénea de vesículas unilamelares, conteniendo el fotosistema I así como otros componentes asociados a la fotofosforilación cíclica y a la transferencia electrónica asociada a este fotosistema —plastocianina y el complejo b-f—. La preparación contiene, además, bajos niveles con taminantes del fotosistema II, pero no actividad apreciable asociada a este fotosistema, tal vez por su inactivación durante el proceso de purificación.

Las velocidades iniciales de fotoproducción de peróxido de hidrógeno que se alcanzan con las partículas purificadas, en presencia de riboflavina y de los sistemas donadores DTE/TMPD o ascorbato/DPIP, fueron del orden de $1800 \mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, de cuatro a seis veces mayores a los valores que se alcanzan con el fotosistema I integrado en las vesículas tilacoidales. No obstante, los niveles finales de peróxido alcanzados en ambos sistemas son similares, debido a la existencia de una reacción inespecífica de consumo de H_2O_2

por parte del sistema. Esta reacción tiene lugar tanto en condiciones de iluminación como en oscuridad y no conduce a la inactivación del fotosistema I, lo que indica la existencia de una reacción inespecífica del peróxido de hidrógeno con alguno de los componentes del sistema, tal vez con los productos de la oxidación del DTE o con los lípidos de la membrana fotosintética; de hecho, la peroxidación de lípidos es una reacción bien conocida en las membranas biológicas (Halliwell, 1981).

Una alternativa a los sistemas fotobiológicos es la utilización de sistemas fotoquímicos, totalmente artificiales, que por su propia naturaleza son susceptibles de alcanzar mayores niveles de estabilidad y continuidad funcional, así como similares, si no mayores, eficiencias.

Una cuestión fundamental en el diseño de un fotosistema artificial para la producción de un compuesto de interés energético, en este caso el peróxido de hidrógeno, es la elección del pigmento más adecuado en fotosensibilizar la reacción fotoquímica. En este sentido, el pigmento debe captar la luz visible con una alta eficiencia; debe, además, al iluminarse ser capaz de llevar a cabo la reacción de producción de H_2O_2 con eficacia; y, por último, debe de ser lo bastante estable en las condiciones de fotoproducción para mantener su actividad fotoquímica durante prolongados períodos de tiempo.

En este trabajo se han ensayado varios pigmentos como fotosensibilizadores, empleando en todos los casos semicarbazida —compuesto descrito con anterioridad como un

eficaz donador de electrones en la producción de H_2O_2 mediada por flavinas (Fontes et al., 1981; De la Rosa et al., 1983)— como compuesto reductor y actuando el oxígeno como aceptor final de electrones. Los experimentos de fotoproducción se han llevado a cabo a pH 0, 7 y 14, con la intención de cubrir la escala de pH, factor que suele afectar sensiblemente la eficiencia de los sistemas fotoquímicos, como se discutirá posteriormente. En general, los niveles máselevados de producción de H_2O_2 se alcanzan, en todos los sistemas ensayados, al pH alcalino, lo cual podría explicarse en parte asumiendo que el potencial reductor de la semicarbazida, que disocia sus dos protones con pK_a s de 3,7 y aproximadamente 13, aumenta conforme lo hace el pH.

La lumiflavina y el $Ru(bipy)_3^{2+}$ son los pigmentos fotosensibilizadores que han mostrado poseer las más altas capacidades de formación de H_2O_2 en relación a una relativamente elevada estabilidad fotoquímica. Ambos pigmentos presentan, además, una buena absorción de energía luminosa en la zona visible del espectro electromagnético, con máximos de absorbancia alrededor de los 450 nm. La lumiflavina ha sido descrita con anterioridad por De la Rosa et al. (1983) como un eficaz fotosensibilizador en la reacción de generación de peróxido de hidrógeno con semicarbazida como compuesto donador de electrones, presentando una alta estabilidad a pH fuertemente alcalino. El complejo de rutenio, por otra parte, ha sido ampliamente estudiado en los sistemas productores de hidrógeno, tanto a partir de compuestos artificiales donadores de electrones como en los sistemas de fotooxidación de agua catalizada por óxidos metálicos (Connolly, 1981; Borgarello et al., 1981; Grätzel, 1983; Kalyanasundaram et al., 1978; Kiwi et al., 1980).

La producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno ha demostrado depender en gran medida del pH del medio, siendo el perfil de producción en función de este factor similar al obtenido por De la Rosa et al. (1983) con aire, en vez de oxígeno, como fuente de oxigenación de las soluciones. En general, la producción aumenta con el pH, con la excepción de la zona alrededor de pH 12, donde puede observarse una drástica bajada en la eficacia del sistema. La máxima producción de H_2O_2 se alcanza a pH 14, donde estos autores han descrito que la lumiflavina es perfectamente estable, y donde no se aprecia fotodegradación significativa del pigmento incluso tras varias horas de producción de H_2O_2 (De la Rosa et al., 1983).

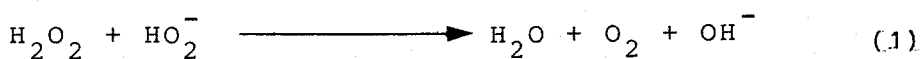
Estos mismos autores habían atribuido la disminución en la producción de peróxido de hidrógeno a pH 12, con aire como fuente de oxigenación, a una reacción de descomposición, mediada por el dióxido de carbono del aire, del peróxido de hidrógeno formado por el sistema. La descomposición mediada por CO_2 ha sido aquí reinvestigada con la intención de esclarecer su mecanismo y de estudiar su influencia sobre la eficiencia del sistema a pH 12.

De los resultados presentados en este trabajo puede deducirse que, efectivamente, la eficiencia del sistema aumenta al eliminar el dióxido de carbono de la fuente de gaseo, ya sea burbujeando la solución con oxígeno o con aire libre de CO_2 . Sin embargo, el nivel de producción de H_2O_2 en ausencia de CO_2 no alcanza los valores que se obtienen a pH 10 ó 14. Posteriormente, se discutirá el perfil de producción de peróxido de hidrógeno con el pH en función de las reacciones de óxido-reducción inducidas por la luz que tienen lugar en el fotosistema.

Como se indicó en la Introducción, el peróxido de hidrógeno es un compuesto relativamente inestable, capaz

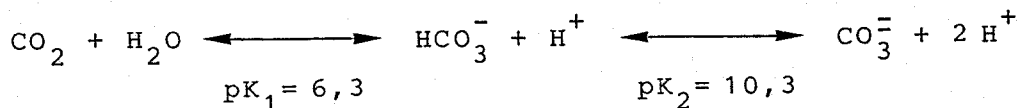
de descomponerse espontáneamente hasta agua y oxígeno con liberación de energía. La reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno se ha descrito que se acelera en presencia de ciertos compuestos que actúan como catalizadores: iones de metales de transición (Fe, Cu, Mn) (Jaiswal et al., 1982, Spalek et al., 1982; Richter y Waddell, 1982), óxidos de osmio o rutenio (Nagy et al., 1982), complejos metálicos (metaloporfirinas, Fe-EDTA) (Mochida et al., 1982; Rizkalla et al., 1982) o enzimas (catalasa, peroxidasa) (Barman, 1969) sin que el mecanismo haya sido aún completamente aclarado.

El peróxido de hidrógeno se descompone con rapidez en el rango de pH entre 10 y 13 en soluciones gaseadas con aire. El valor de máxima descomposición se alcanza a pH 11,5-11,7, coincidiendo con el valor del primer pK_a del peróxido (Fee y Valentine, 1977), lo que sugiere que la descomposición de peróxido de hidrógeno tiene lugar con mayor velocidad cuando coinciden simultáneamente las formas protonada (H_2O_2) y desprotonada (HO_2^-) de este compuesto. El requerimiento de las dos formas del peróxido fue postulado ya por Abel en 1952 para explicar la descomposición no catalizada del H_2O_2 en soluciones alcalinas, según la siguiente reacción:



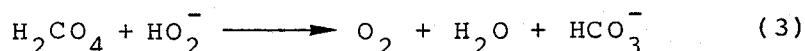
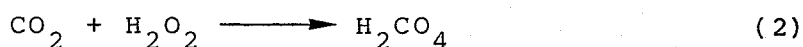
El que en soluciones gaseadas con aire o con CO_2 puro la descomposición del H_2O_2 sea comparativamente mayor en relación a las soluciones burbujeadas con N_2 , O_2 o aire desprovisto de dióxido de carbono, pone de manifiesto que éste desempeña un papel fundamental en la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno a pH 12. Ahora bien, teniendo en cuenta que el dióxido de carbono se hidrata en soluciones acuosas hasta H_2CO_3 , que disocia protones según el siguiente

equilibrio (Guerrero et al., 1974):

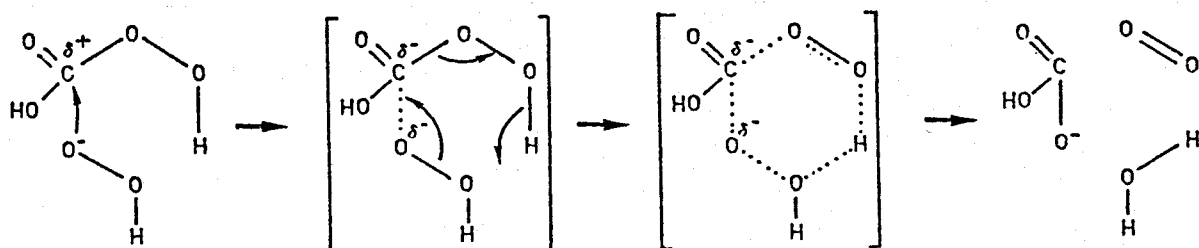


se investigó el efecto que la adición de estos aniones (carbonato y bicarbonato) ejerce sobre la descomposición del peróxido de hidrógeno a pH 12, observándose que si no es presencia del CO_2 tal cual el peróxido no se descompone, incluso en presencia de altas concentraciones de carbonato. Este resultado indica que es el CO_2 , y no alguno de los productos de su disociación, el que influye directamente en la reacción de descomposición del H_2O_2 .

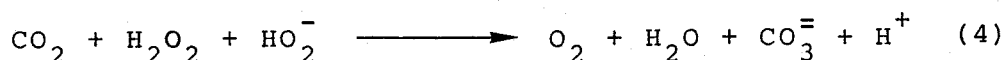
Sobre la base de los resultados ya comentados proponemos un posible mecanismo para la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno basado en la oxidación del ión perhidroxilo (HO_2^-) con ácido percarbónico, formado a su vez por la reacción del CO_2 con el peróxido de hidrógeno no disociado:



Esta última reacción sería el resultado de un ataque nucleofílico del anión perhidroxilo sobre el ácido percarbónico, según se representa en el siguiente esquema:



El mecanismo propuesto explica, por otra parte, la liberación de protones que puede observarse a lo largo de la reacción de descomposición del H_2O_2 , ya que el bicarbonato formado en la reacción tiende a soltar un protón y quedar como carbonato. De esta forma, la reacción global sería:



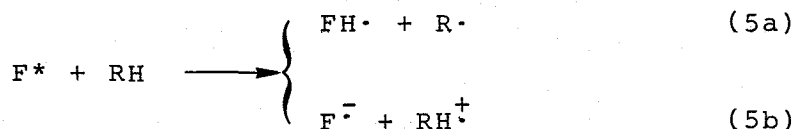
Por otra parte, la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno parece estar catalizada, además de por el CO_2 , por iones metálicos libres en el medio, seguramente provenientes del hidróxido sódico empleado para ajustar el pH a 12, ya que tanto el silicato de magnesio como el EDTA —conocidos agentes quelantes, o secuestradores de iones metálicos (Crampton *et al.*, 1977)— evitan la descomposición del peróxido. De hecho, según Spalek *et al.* (1982), el peróxido de hidrógeno se descompone en soluciones alcalinas siguiendo dos vías con cinéticas diferentes, incrementándose la velocidad de una de ellas en presencia de iones metálicos.

Es interesante hacer notar que Csány y Galbács (1985), a la vista de nuestros resultados, han propuesto un mecanismo alternativo para explicar la descomposición del CO_2 . Según estos autores, la rápida descomposición del H_2O_2 en soluciones alcalinas aireadas podría inducirse por el CO_2 cuando las impurezas metálicas presentes en la solución, cuya actividad catalítica depende en gran medida del grado de agregación, son transformadas desde su estado normal, formando complejos polinucleares, o complejos carbonatados con un menor grado de agregación.

Si se observa el perfil de la curva de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno en función del pH, no deja de sorprender la drástica caída de la fotoproducción de H_2O_2 en la zona de pH alrededor de 12, incluso en soluciones gaseadas con O_2 en las que no hay CO_2 que pueda catalizar la descomposición del peróxido formado. Con objeto de esclarecer, pues, el mecanismo del proceso fotoquímico conducente a la formación de H_2O_2 se han estudiado las reacciones de óxido-reducción que tienen lugar en el fotosistema.

Como ya se indicó en la Introducción, las flavinas constituyen un claro ejemplo de par redox del tipo de forma oxidada energizada (Losada, 1979; Losada et al., 1983) en las que el potencial se hace más positivo tras la excitación por luz de la forma oxidada del par. Las flavinas iluminadas, por lo tanto, pueden actuar aceptando electrones, cedidos por donadores adecuados, a un potencial muy positivo para cederlos, posteriormente, a aceptores con potenciales más negativos (De la Rosa et al., 1985; Losada, 1979; Losada et al., 1983).

El mecanismo de fotorreducción de las flavinas (F) implica la transferencia inicial de un electrón, o de un átomo de hidrógeno, desde un donador de electrones (RH) al estado excitado triplete del pigmento (F^*), con la consiguiente formación del radical flavosemiquinona ($FH\cdot$ o $F^{\cdot-}$), o flavina semirreducida (Heelis, 1982):

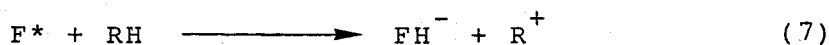


La especie hidroquinona (FH_2), o flavina totalmente reducida, se formaría a partir de la dismutación del

propio radical semiquinona (Heelis, 1982; Vaish y Tollin, 1970;1971):



No obstante, algunos autores han sugerido que la fotorreducción de las flavinas podría seguir un mecanismo de transferencia directa de dos electrones —o mejor dicho, de un ión hidruro (H^-)—, con la consiguiente formación de la flavohidroquinona (FH^-) (Heelis, 1982; Hemmerich et al., 1980):

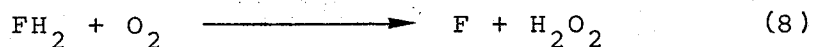


De hecho, mientras que hay claras evidencias a favor del mecanismo de fotorreducción por transferencia de un solo electrón (reacción 5) desde gran número de sustratos (EDTA, aminoácidos, indoles) a las flavinas (Heelis et al., 1979 a,b;1981;1985; Vaish y Tollin, 1970;1971), la transferencia de dos electrones para la formación directa de la especie hidroquinona (reacción 7) tan solo se ha demostrado con borohidruro como donador (Hemmerich et al., 1980).

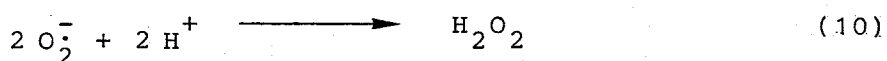
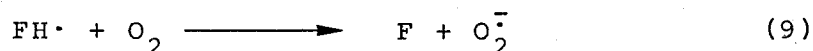
En cualquier caso, se sabe que la especie reactiva en las reacciones de fotorreducción de las flavinas se corresponde con el estado excitado triplete del pigmento. A esta conclusión se llega a partir del hecho de que la reacción de fotorreducción de las flavinas se inhibe en presencia de agentes amortiguadores del estado triplete (Heelis, 1982; Penzer y Radda, 1971), aunque en algunos casos se ha descrito una reacción de transferencia de carga entre ciertos donadores y el estado singlete de las flavinas (Karen et al., 1983).

Una vez reducidas, ya sea en forma de semiquinona o de hidroquinona, las flavinas pueden reaccionar con el oxígeno molecular en una serie de reacciones de óxido-reducción que conducen, finalmente, a la formación de peróxido de hi-

drógeno, bien por reducción directa del O_2 a partir de la hidroquinona:



bien por la transferencia de un solo electrón a partir de la semiquinona para formar radicales superóxido, que por dismutación conducen a la generación de H_2O_2 (Singer, 1976):



Con la intención de poder explicar el perfil de la curva de producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno en función del pH, se ha procedido a estudiar las reacciones que conducen a la fotoreducción de la lumiflavina así como a la posterior oxidación con oxígeno de las especies reducidas. Estos estudios se han llevado a cabo tanto con técnicas potenciométricas como por espectrofotometría de excitación con láser.

Las técnicas potenciométricas como método de medida de reacciones de óxido-reducción han sido empleadas previamente en el estudio de las reacciones de fotorreducción de pigmentos tales como tionina y azul de metileno (Somer y Green, 1973; Somer y Temizer, 1984; Temizer, 1985), así como de varias flavinas, observándose en este último caso la formación de la especie semiquinona en presencia de varios aminoácidos y péptidos (Knobloch, 1971).

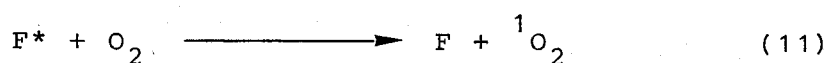
En nuestro caso, la reacción de fotorreducción de la lumiflavina con semicarbazida se ha estudiado midiendo la velocidad de disminución del potencial redox de soluciones iluminadas del pigmento y el donador a distintos pHs. La

iluminación de estas soluciones en ausencia de aceptores de electrones, como por ejemplo el oxígeno, conduce a la formación de las especies reducidas de la flavina, con el consiguiente descenso del potencial redox de las soluciones. Si cuando se estabiliza el potencial —es decir, cuando la reacción de reducción está en equilibrio— se añade aire a las soluciones, ahora en oscuridad, se observa un aumento del potencial redox debido a la oxidación de la flavina reducida con el oxígeno.

La velocidad de disminución del potencial redox de soluciones anaeróbicas de lumiflavina y semicarbazida iluminadas ha demostrado depender, en gran medida, del pH de las soluciones, obteniéndose las mayores velocidades de disminución del potencial a pH 4-5, 10 y 14. Por el contrario, los menores valores se observan a pH 0, 7 y 12.

La reacción entre la semicarbazida y la lumiflavina se ha estudiado asimismo mediante espectrofotometría de excitación por láser. En presencia de semicarbazida, pero no de oxígeno, la excitación con láser de soluciones neutras o alcalinas de lumiflavina y semicarbazida conduce inicialmente a la formación del bien conocido estado excitado triplete del pigmento que, posteriormente, desaparece para dar lugar al registro correspondiente a la forma semiquinona, parcialmente reducida, de la lumiflavina, ya sea en su estado protonado neutro (FH·) o en su estado no protonado aniónico ($F^{\cdot-}$) (Heelis et al., 1978; Grodowski et al., 1977; Schreiner y Kramer, 1979; Vaish y Tollin, 1970). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Heelis et al. (1985), que han descrito la formación del radical semiquinona como producto de la interacción entre la semicarbazida y la lumiflavina excitada, y han descartado la aparición de la especie hidroquinona del pigmento.

En ausencia del compuesto donador, pero en presencia de oxígeno, el estado triplete del pigmento es rápidamente desexcitado, sin que en esta desaparición del estado excitado se formen especies intermedias de la lumiflavina. Esta interacción entre el oxígeno y la flavina puede explicarse en términos de una reacción de desactivación del estado excitado, con transferencia de energía pero no de carga, en presencia de oxígeno, rindiendo como productos finales la flavina en su estado basal y oxígeno singlete (Heelis, 1982):



Es sabido que la reactividad de las flavinas en su estado excitado se ve afectada en gran medida por el pH del medio, como han puesto de manifiesto gran número de estudios acerca de las reacciones de fotorreducción de varias flavinas (FMN, riboflavina, lumiflavina) con varios sustratos donadores (aminoácidos, EDTA, TEOA, tricina) (Fife y Moore, 1979; Heelis *et al.*, 1979 a,b; 1981; 1985; Heelis y Phillips, 1979).

En nuestro caso, los estudios acerca de las reactividad entre la lumiflavina excitada y la semicarbazida han indicado también una gran dependencia respecto del pH. Los valores de la constante de la reacción bimolecular (k_q), de segundo orden, entre el donador y el pigmento fotoexcitado ($1,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 14; $0,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 12) entran dentro del rango de valores descritos con anterioridad para la interacción del estado excitado de las flavinas con gran número de sustratos ($10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Heelis *et al.*, 1979 a, b; 1985; Heelis y Phillips, 1979) y se ajustan cualitativamente a los valores de disminución del potencial obtenidos con técnicas potenciométricas. De esta forma, la alta velocidad de disminución del potencial a pH 4-5 se corresponde con un

alto valor de la constante k_q a pH 4, lo que indica una alta velocidad de desaparición del estado excitado en presencia del donador que, como lo demuestra la aparición de absorbancia diferencial a 410 nm, se corresponde a su vez con la formación de la especie flavosemiquinona de la lumiflavina. Por el contrario, a pH 12 coinciden igualmente una baja velocidad de disminución del potencial redox con un bajo valor de la constante k_q . A pH 9 y 14 se obtienen valores intermedios de ambos parámetros.

Los valores que se han determinado para la constante k_q difieren de los calculados por Heelis et al. (1985), también con lumiflavina y con semicarbazida como agente amortiguador ($4,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7; $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 14), tal vez porque estos autores llevaron a cabo sus estudios en medio altamente tamponado, y los compuestos empleados como tampones (fosfato y fórmico) podrían haber interferido en las reacciones fotoquímicas del sistema. En este sentido, Vaish y Tollin (1970) han descrito que el tampón fosfato cataliza una reacción de degradación de la lumiflavina, a pH neutro, en experimentos acerca de la reactividad del triplete de la lumiflavina con técnicas de excitación con pulsos de luz blanca. Fontes et al. (1981) han descrito, por otra parte, que ciertos tampones actúan como donadores de electrones en los sistemas fotoquímicos productores de H_2O_2 con flavinas como fotosensibilizadores.

Las razones del porqué de esta dependencia con el pH de la reacción de fotorreducción de la lumiflavina con la semicarbazida son difíciles de discutir y explicar totalmente, dada la existencia de equilibrios ácido-base tanto en las formas oxidada, semirreducida y triplete del pigmento como en la molécula de semicarbazida. En la Figura 54 se recogen el conjunto de todos los equilibrios ácido-base presentes en el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno (Allen, 1977; Fee y Valentine, 1977; Heelis, 1982).

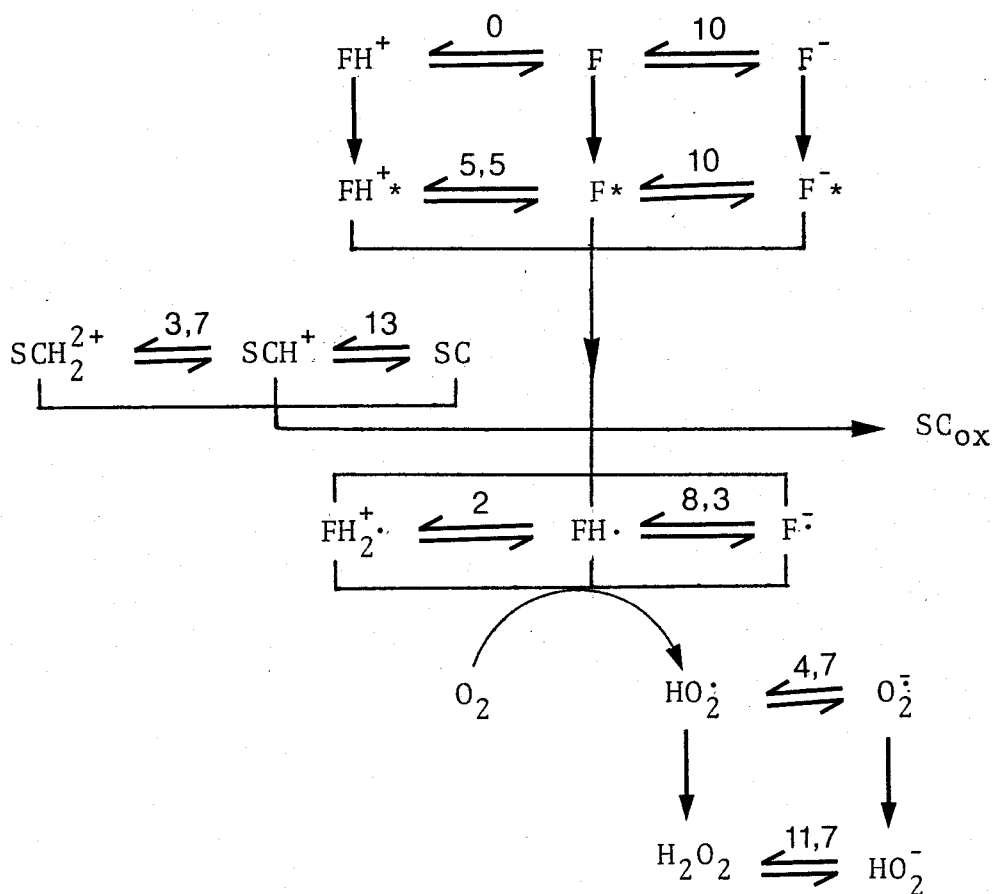


Figura 54. Equilibrios ácido-base en el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno.

Los números en cada equilibrio representan valores de pK_a . FH^+ , F , F^- , formas oxidadas de la lumiflavina; FH^{+*} , F^* , F^{-*} , distintos estados ácido-base del triplete de la lumiflavina; $FH_2^{\cdot+}$, FH^{\cdot} , $F^{\cdot-}$, formas del estado flavosemiquinona; HO_2^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, radical superóxido; H_2O_2 , HO_2^- , formas ácido-base del peróxido de hidrógeno; SC , SCH^+ , SCH_2^{2+} , distintos estados de protonación de la semicarbazida; SC_{ox} , productos de la oxidación de la semicarbazida.

Como se ha indicado con anterioridad, la reactividad de las flavinas con gran número de sustratos depende en gran medida del pH de las soluciones. En algunos casos, tal dependencia es explicable en términos de los equilibrios ácido-base del propio sustrato; así, por ejemplo, la disociación de los grupos amino de los aminoácidos por encima de pH 9 conduce generalmente a un incremento de la reactividad de las flavinas excitadas con estos sustratos (Heelis et al., 1979 a,b). Por otra parte, algunas reacciones fotosensibilizadas por flavinas muestran un pK_a aparente en la zona de pH alrededor de 5, donde el triplete de las flavinas presenta su primer pK_a , lo que se explica asumiendo que las formas protonada y desprotonada del triplete manifiestan una distinta reactividad respecto a sustratos tales como aminoácidos, EDTA, ascorbato, etc. (Heelis et al., 1981; Heelis y Phillips, 1979). En general está aceptado que la forma protonada del triplete de la lumiflavina es más reactiva respecto a la especie disociada en las reacciones de transferencia de un electrón (reacción 5b), aunque esta última forma es, por el contrario, más reactiva en las reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (reacción 5a) (Heelis, 1982; Vogelmann et al., 1976).

Es interesante resaltar que cada punto de inflexión en el perfil de la curva de disminución del potencial redox de soluciones iluminadas de semicarbazida y lumiflavina en función del pH coincide con alguno de los valores de pK_a de las formas oxidada, excitada o semirreducida de la lumiflavina, o con algunos de los valores de pK_a del equilibrio ácido-base de la semicarbazida (Figura 54). Así, el estado triplete catiónico, protonado, del pigmento (FH^{+*}) parece fotorreducirse con máxima eficacia con la primera forma desprotonada (SCH^+) del donador, cuando coexisten entre pH 3,7 y 5,5, como lo indican el alto valor de la velocidad de

disminución del potencial redox y el elevado valor de la constante k_q en esta zona de pH. Esto indicaría, como se ha citado ya con anterioridad, que la reacción de la semicarbazida con el triplete de la lumiflavina implicaría la transferencia de un solo electrón, y no de un átomo de hidrógeno, ya que la especie protonada del triplete en general es más reactiva en este tipo de reacciones respecto a la forma desprotonada.

Por otra parte, la forma protonada del triplete parece fotorreducirse con dificultad con la especie totalmente ácida de la semicarbazida (SCH_2^{2+}), cuando ambas coinciden por debajo de pH 3,7, lo que quizás podría explicarse a causa de la repulsión electrostática entre los dos grupos amino cargados del donador ($-\text{NH}_3^+$) y la molécula catiónica (FH^{+*}) del pigmento excitado.

Entre pH 5,5 y 10, la flavina excitada, en su estado disociado neutro (F^*), parece interactuar con dificultad con la forma anfótera de la semicarbazida (SCH^+). En este sentido, está ampliamente descrito que en ciertas reacciones de fotorreducción de las flavinas tiene lugar una disminución de la reactividad de las mismas con varios sustratos (metionina, ascorbato, ácido mandélico) asociada a la disociación del triplete excitado por encima de pH 5,5 (Heelis et al., 1981; Heelis y Phillips, 1979). En nuestro caso, sin embargo, la desprotonación de la forma semiquinona ($\text{FH}\cdot$) parece "tirar" por encima de pH 8,3 de la reacción de fotorreducción, como lo indica el aumento de la velocidad de disminución del potencial entre pH 8 y 10.

La reactividad de la semicarbazida con la flavina excitada alcanza su más bajo valor a pH 12, lo que indica que la especie totalmente disociada del triplete (F^{-*}) reacciona

con gran dificultad con la forma anfótera de la semicarbazida, cuando ambas coinciden entre pH 10 y 13, lo que es coherente con estudios que han puesto de manifiesto que la reactividad de las flavinas excitadas disminuye conforme disocian protones (Vogelmann *et al.*, 1976). Sin embargo, la disociación del segundo protón de la semicarbazida, con un pK_a aproximado de 13, parece acelerar la fotorreducción de la lumiflavina con este sustrato.

Respecto a la segunda reacción de la que depende la eficiencia del sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno, es decir, la oxidación de la flavosemiquinona con el oxígeno, Vaish y Tollin describieron ya en 1971 que la reacción entre el radical semiquinona de la flavina y el O_2 se acelera conforme aumenta el pH de las soluciones en el rango de pH entre 5 y 8, no observándose a este primer valor de pH diferencias en la desaparición del radical semirreducido en anaerobiosis y en soluciones saturadas de oxígeno. Estos mismos autores determinaron que el radical neutro ($FH\cdot$) reacciona del orden de 10^4 veces más lentamente con el oxígeno que la forma aniónica ($F\bar{\cdot}$).

Los resultados presentados en este trabajo, obtenidos tanto por técnicas potenciométricas como por espectrofotometría de excitación con láser, coinciden asimismo en indicar que la velocidad de oxidación de la flavina semirreducida con el O_2 se incrementa con el pH de las soluciones, lo que se puede observar tanto en función de los valores de la constante k de la reacción de (pseudo)-primer orden entre la semiquinona y el oxígeno, como por la variación de la velocidad de aumento del potencial redox. En este último caso, se puede ver que la zona de pH donde tiene lugar el mayor incremento de esta velocidad (pH 7,5/8) coincide aproximadamente con el pK_a de 8,3 de la semiquinona (Heelis, 1982).

Estos resultados, junto a los ya comentados con anterioridad acerca de la reacción de fotorreducción de la lumiflavina con semicarbazida, explican con bastante exactitud el perfil de la curva de producción en función del pH por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno. Asumiendo que la suma de las velocidades de las reacciones de fotorreducción y oxidación de la lumiflavina determina la eficacia final del fotosistema, la combinación de las velocidades de cambio de potencial —una medida de ambas reacciones— a cada pH debería de ajustarse con bastante aproximación al perfil observado de producción de H_2O_2 por este sistema, como de hecho ocurre (ver Figura 30).

Así, a pH 4-5, aunque la flavina iluminada se fotorreduce eficazmente con semicarbazida, su lenta oxidación posterior limita la producción de peróxido de hidrógeno en este intervalo de pH. A pH 9-10, aunque la reducción del pigmento es comparativamente menor, el aumento de la oxidación de la especie reducida de la flavina acelera la formación de H_2O_2 . A pH 14 se alcanza el máximo de producción debido a que a este valor de pH la lumiflavina, que no se fotorreduce muy eficientemente, se oxida sin embargo con gran rapidez. A pH 7 y 12 se alcanzan los menores valores de producción, coincidiendo en ambos casos una ineficaz reducción del pigmento con semicarbazida y una lenta reacción de oxidación de la especie semiquinona.

Una vez comprobada la alta complejidad de las reacciones conducentes a la formación de peróxido de hidrógeno en el sistema flavínico descrito, y pensando en el inconveniente práctico que puede suponer el proceso de purificación del H_2O_2 del resto de los componentes del sistema, se ha estudiado la producción de peróxido de hidrógeno en células fotoelectroquímicas, en las que el H_2O_2 pudiera ser continuamente producido y utilizado. Por otra parte, la separación física del sistema en dos compartimentos distintos permite que las distintas reacciones que tienen lugar en el proceso fotoquímico puedan ser estudiadas y mejoradas por separado, así como evitar posibles reacciones secundarias entre los productos finales de las reacciones entre sí o con algún intermediario, con el consiguiente descenso en la efectividad del sistema.

Las células fotoelectroquímicas vienen siendo objeto de creciente estudio desde hace unos años, ya que representan una vía alternativa de captación y almacenamiento de la energía solar en forma de energía química, fundamentalmente mediante la producción de hidrógeno molecular (Connolly, 1981; Finnström, 1982; Hall y Palz, 1982). Otro posible uso de las células fotoelectroquímicas es la producción de electricidad, que también está siendo objeto de intenso estudio (Holmström y Carlsson, 1982). Al igual que en el caso de los sistemas fotoquímicos en solución homogénea, las células fotoelectroquímicas se basan en el empleo de un pigmento o fotorreceptor —por ejemplo flavinas, fenosafranina, $Ru(bipy)_3^{2+}$, clorofilas, derivados porfirínicos (Neumann-Spallart y Kalyanasundaram, 1982; Pan *et al.*, 1982; Yamase, 1981)— y de un compuesto donador de electrones (Finnström, 1982).

Yamase (1981) ha descrito una célula fotoelectroquímica para la producción de hidrógeno basada en el uso de FMN como fotorreceptor y de EDTA como compuesto donador de

electrones. Ambos compuestos se encuentran en el compartimento anódico, que se irradia con luz blanca, y los electrones discurren por el circuito externo hasta un cátodo de platino, donde tiene lugar la reducción de los protones a hidrógeno.

Sobre la base de esta célula se ha diseñado una célula fotoelectroquímica para la producción de peróxido de hidrógeno en la que se han introducido significativas variaciones respecto a la célula de Yamase. En principio, se empleó también el sistema EDTA/FMN como fuente de electrones para la reducción del oxígeno, ya que, por otra parte, su efectividad en la producción de H_2O_2 en soluciones homogéneas ya había sido comprobada (Fontes et al., 1981; De la Rosa et al., 1983). Los electrodos ensayados han sido de platino, plata y mercurio, este último fijo o de gota. Todas las combinaciones de electrodos han conducido a la formación de cantidades apreciables de peróxido de hidrógeno, con excepción de aquellas en las que el cátodo era de platino, lo que podría deberse al hecho de que este metal se comporta como un eficaz catalizador en la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno (Kravchenko et al., 1982).

Otro factor estudiado ha sido el efecto del pH sobre las reacciones que tienen lugar en cada hemicélula y, por lo tanto, sobre la eficacia global del sistema. En principio, los dos compartimentos se mantuvieron a pH 7,5, obteniéndose en este caso una velocidad de producción de H_2O_2 de hasta $2 \mu\text{mol h}^{-1}$. Esta velocidad, claramente inferior a la que se alcanza con el mismo fotosistema (EDTA/FMN) en solución homogénea ($2 \mu\text{mol min}^{-1}$) (Fontes et al., 1981), es por el contrario muy superior en comparación a la obtenida por Yamase (1981) ($1,1 \mu\text{mol H}_2$ en 24 horas). En los tres casos se emplearon volúmenes aproximadamente iguales.

Se han utilizado otros sistemas donadores de electrones en los que la lumiflavina actuaba como fotosensibilizador y la semicarbazida o la hidroxilamina como donador final. También se ha estudiado el efecto del pH sobre el rendimiento de la célula fotoelectroquímica, dada la gran influencia que este factor ejerce sobre los sistemas flavínicos. Entre todas las combinaciones de pH y naturaleza del sistema ensayadas, la máxima producción de H_2O_2 se ha alcanzado con el sistema hidroxilamina/lumiflavina y con el pH de las soluciones ajustado a 14 (solución anódica) y a 1 (solución catódica). La velocidad de producción obtenida en estas condiciones fue de $200 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$. En este sentido Tafalla et al. (1986) han descrito muy recientemente la producción de H_2O_2 en células fotoelectroquímicas con electrodos de TiO_2 , encontrando un pH óptimo de producción de 13,5; a pH ácido, sin embargo, no tiene lugar la reducción del O_2 , ya que en estas condiciones los protones son reducidos con preferencia al oxígeno.

Es interesante señalar, por otra parte, que la hidroxilamina por sí sola, es decir, en ausencia del fotosensibilizador, es capaz de producir cantidades significativas de peróxido de hidrógeno (hasta $100 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$), actuando pues la flavina en este caso más que como fotosensibilizador como un simple fotocatalizador.

Un factor a tener en cuenta a la hora del diseño de una célula fotoelectroquímica es el desgaste continuo que sufren sus electrodos (Charlot et al., 1969). En nuestro caso, se pudo observar la formación de una fina película sobre la superficie del mercurio depositado en el fondo del compartimento, sobre todo del catódico, cuando se usaron electrodos fijos de mercurio. Es por ello que se probaron los electrodos de gota de mercurio (ver Materiales y Métodos), con los que, al irse renovando continuamente la superficie en contac

to con la solución, se evitaba la formación de la citada película. De hecho, la producción de peróxido de hidrógeno con este tipo de electrodos alcanza valores ligeramente superiores respecto a los obtenidos con los electrodos fijos.

Otro sistema fotoquímico de especial interés es el basado en el empleo del complejo rutenio(II)-Tris(2,2'-bipiridilo) como fotosensibilizador, ya que este pigmento ha sido intensamente estudiado en los últimos años como posible fotorreceptor en los sistemas fotoquímicos para la producción de hidrógeno molecular con electrones cedidos por la molécula de agua (Grätzel, 1981; Kalyanasundaram, 1982; Kiwi et al., 1980; Pelizzetti y Visca, 1983). Es por ello que, teniendo como fin último la fotólisis del H_2O , se ha estudiado la producción fotoquímica de peróxido de hidrógeno con el complejo de rutenio como fotosensibilizador y semicarbazida como compuesto donador de electrones.

Está descrito en la literatura que la excitación del $Ru(bipy)_3^{2+}$ conlleva una transferencia de carga del metal al ligando, de manera que, como ya se indicó en la Introducción, el complejo excitado manifiesta, simultáneamente, cualidades de agente oxidante —por la existencia del $Ru(III)$ — y reductor —por el $(bipy)_3^-$ — (Kalyanasundaram, 1982; Lytle y Hercules, 1969; Meyer, 1983). Al no haber intercambio de protones, el potencial redox de los respectivos pares implicados es independiente del pH, mientras que, por el contrario, la semicarbazida aumenta su carácter reductor conforme se protona al aumentar el pH.

Es por ello que se ha estudiado la dependencia respecto al pH de la fotoproducción de H_2O_2 con el sistema semicarbazida/ $Ru(bipy)_3^{2+}$ /oxígeno, observándose que solo se alcanzan producciones significativas de peróxido de hidrógeno a pH muy alcalino. Tal dependencia puede explicarse asumiendo la existencia de una repulsión electrostática entre moléculas con carga del mismo signo como son el $Ru(bipy)_3^{2+}$ y la semicarbazida protonada (SCH_2^{2+} o SCH^+). Solamente cuando el donador se desprotona totalmente por encima de su segundo pK_a (≈ 13) la reacción bimolecular entre los dos compuestos podría tener lugar. En este sentido, Mandal y Hoffman (1984) han descrito que la agregación de las moléculas de $Ru(bipy)_3^{2+}$, MV^{2+} y EDTA en soluciones alcalinas (donde el EDTA existe en la forma aniónica 3- ó 4-) conduce a un aumento de la velocidad de desaparición del estado excitado del pigmento, lo que indica una mayor reactividad del complejo excitado con el resto de los componentes del fotosistema. Por otra parte, también hay que tener en cuenta que el carácter reductor de la semicarbazida se incrementa conforme aumenta el pH de la solución.

Se ha comprobado que el complejo de rutenio se fotodegrada, aunque lentamente, a lo largo de la reacción fotoquímica de formación de H_2O_2 , como lo demuestra la disminución de su absorbancia a 450 nm. Ashmawy *et al.* (1979) han descrito que los iones OH^- llevan a cabo un ataque nucleofílico sobre los anillos de bipyridina en el complejo de rutenio, produciendo una considerable degradación del ligando a pH mayor a 9. Por otra parte, estudios llevados a cabo en acetoni-trilo como solvente indican que la estabilidad del $Ru(bipy)_3^{2+}$ se puede incrementar en presencia de altas concentraciones de compuestos amortiguadores del estado excitado (Durham *et al.*, 1982). En nuestro caso, la fotodegradación se acelera en presencia de semicarbazida en condiciones anaeróbicas, pero esta reacción es parcialmente prevenida en presencia de oxí-

geno, lo que sugiere que es el O_2 la especie que interacciona con el complejo fotoexcitado (vease más adelante). Las condiciones en las que se alcanza una mayor estabilidad del pigmento son precisamente las óptimas con vista a la producción de peróxido de hidrógeno, a saber: medio altamente oxigenado y presencia de semicarbazida.

Un factor a tener en cuenta en el diseño de un sistema fotoquímico es la selección de las concentraciones óptimas de sus distintos componentes. La utilización de altas concentraciones asegura que las reacciones tendentes a la formación del producto final predominan sobre las reacciones secundarias, pero también plantea problemas de desperdicio de material, lo que puede ser especialmente crítico en el caso de la concentración de fotosensibilizador. En nuestro caso, hemos seleccionado como concentraciones óptimas para la producción de peróxido de hidrógeno 0,175 M para la semicarbazida y 25 μ M para el $Ru(bipy)_3^{2+}$. Con estas concentraciones iniciales de pigmento y donador, la producción de H_2O_2 se detiene cuando el nivel de peróxido prácticamente iguala a la concentración de semicarbazida inicialmente presente en la célula de reacción.

A partir de estos resultados es posible calcular el número de recambio del pigmento, un parámetro de gran importancia para la descripción de la eficiencia de un sistema fotoquímico y que refleja, bajo unas condiciones determinadas de iluminación, la cantidad total de producto formado en relación a la cantidad de pigmento inicialmente presente. Como en el caso del sistema semicarbazida/ $Ru(bipy)_3^{2+}$ /oxígeno la formación de una molécula de H_2O_2 requiere de dos electrones, y el pigmento participa en cada ciclo en la transferencia de un sólo electrón (vease más adelante), el número real de ciclos catalíticos llevados a cabo por el complejo de rutenio es de $1,3 \times 10^4$, valor que es un orden de magnitud superior a los descritos por Kirch et al. (1979) para el caso

de la producción de hidrógeno con trietanolamina como donador de electrones y $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ como fotosensibilizador.

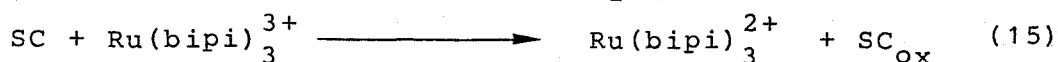
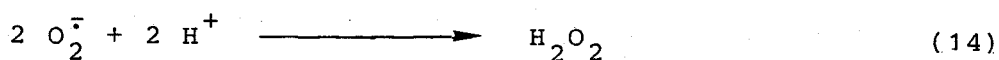
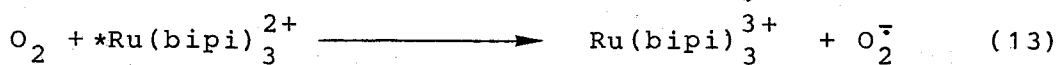
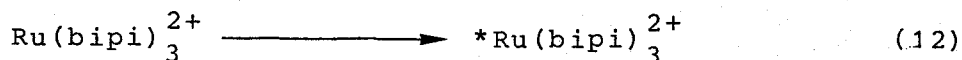
La inmovilización de pigmentos y el diseño de sistemas de flujo continuo confiere a los sistemas fotoquímicos ciertas ventajas de tipo práctico, como son una producción continua del producto final de interés, una más fácil purificación del mismo y la posibilidad de aumentar la estabilidad del fotosensibilizador. En este sentido, el polímero de perfluorosulfonato (Nafion) que se ha utilizado en este trabajo para inmovilizar el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ ha sido empleado con frecuencia como matriz o soporte para la inmovilización de algunos complejos metálicos a causa de su alta estabilidad térmica, mecánica y química, lo que asegura su no interferencia en las reacciones que tienen lugar en el sistema fotoquímico (Buttry y Anson, 1982; Krishnan et al., 1984; Martin et al., 1982; Rubinstein y Bard, 1981).

Según los resultados presentados en este trabajo, la inmovilización del complejo de rutenio con Nafion en un sistema de flujo continuo permite mantener una producción estable de peróxido de hidrógeno durante al menos 33 horas. No obstante, hay que señalar que la velocidad de fotoproducción de peróxido de hidrógeno es sensiblemente menor, del orden de diez veces, a la que se obtiene con el complejo libre, si bien la fotodegradación del pigmento disminuye en gran medida en el sistema inmovilizado.

Mediante técnicas de espectrofotometría de excitación por láser se ha demostrado que el estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se corresponde con el estado luminiscente del pigmento, tanto por la similitud de la vida media de ambos estados como por su velocidad de desaparición en presencia de distintos agentes amortiguadores (Bensasson et al., 1976; Creutz et al., 1980; Kalyanasundaram, 1982). El estado excitado, se

gún se ha discutido con anterioridad, puede ser tanto oxidado hasta la forma $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ como reducido hasta la forma $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$. Mientras que la fotogeneración de la especie oxidada se ha descrito en muchos casos (Duonghong *et al.*, 1981; Gafney y Adamson, 1972; Kirch *et al.*, 1979; Lin y Sutin, 1976), incluyendo estudios llevados a cabo con oxígeno como agente amortiguador, la formación de la especie reducida, por el contrario, se ha descrito con mucha menor frecuencia (Anderson *et al.*, 1977; Cano-Yelo y Deronzier, 1983) y en solventes, como el acetonitrilo, no acuosos. En nuestro caso, el estudio de las reacciones inducidas por la luz que tienen lugar en el fotosistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno y que conducen a la formación de H_2O_2 se ha llevado a cabo utilizando tanto las técnicas luminiscentes como espectrofotometría de excitación por laser.

Los valores que se han determinado para la constante de Stern-Volmer (K_{sv}) estudiando la luminiscencia del complejo de rutenio indican que el estado excitado, tanto a pH neutro como en NaOH 1 M, reacciona eficazmente con el oxígeno pero no con la semicarbazida, de forma que su interacción con el donador es mil veces más débil a pH 14, respecto a la que tiene lugar con el oxígeno, y es insignificante a pH neutro. Estos resultados sugieren que la desaparición del estado excitado del pigmento ocurre mediante un mecanismo de ciclo oxidativo, según la siguiente secuencia de reacciones:



Los espectros registrados con las técnicas de espectrofotometría de excitación por láser en presencia de oxígeno demuestran, en primer lugar, la formación, tras la excitación por el láser, de la especie excitada del complejo de rutenio, $*\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, y la posterior aparición de la especie oxidada $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$. En condiciones anaeróbicas, sin embargo, se forman, una vez desaparecida la forma excitada del pigmento, tanto la especie reducida, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$, como la oxidada del complejo de rutenio. En este sentido, el registro de las cinéticas de desaparición, tras la excitación por láser, de la absorbancia a 520 nm, donde absorben tanto la especie excitada como la reducida, ha puesto de manifiesto que la caída de absorción sigue una cinética claramente bifásica en ausencia de oxígeno, con una rápida desaparición del estado excitado del pigmento y una más lenta caída correspondiente a la desaparición de la forma reducida. Por el contrario, en presencia de oxígeno tan sólo es posible observar una cinética rápida de desaparición del estado excitado del complejo de rutenio, sin que se pueda observar la formación de la especie reducida.

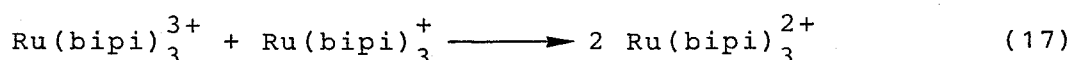
Por otra parte, los estudios acerca de la desaparición del estado excitado, medida como recuperación de la absorbancia basal a 452 nm (fase rápida inicial) -donde absorben tanto la especie excitada como la oxidada- y a 610 nm -donde absorbe específicamente la forma excitada-, han permitido el cálculo de los valores de la constante de la reacción de desaparición (k) y del tiempo de vida media del estado excitado en distintas condiciones. Los valores de la constante k son similares a pH neutro y a pH 14 en las mismas condiciones, e indican nuevamente una eficaz interacción entre el estado excitado y el oxígeno, pero no con la semicarbazida. Asimismo, el valor de la constante k es algo mayor en agua respecto a pH 14, lo que indica una interacción oxígeno-estado excitado algo más eficaz a pH neutro. Estos datos confirman los resultados obtenidos con las técnicas de medida de la

emisión de luminiscencia.

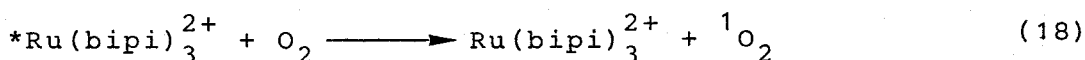
Todos los resultados hasta ahora comentados pueden explicarse asumiendo que en ausencia de oxígeno el estado excitado del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ es capaz de reducir a otra molécula del pigmento que se encuentra en su estado basal, según la reacción:



Esta reacción explicaría el espectro observado a los 5 μs tras la excitación por el láser en ausencia de oxígeno, así como la cinética de desaparición de la absorbancia a 520 nm, con una fase rápida inicial correspondiente a la desactivación del estado excitado con la concomitante formación de la especie reducida que, a su vez, decae posteriormente (fase lenta) hasta el estado basal, según la reacción:

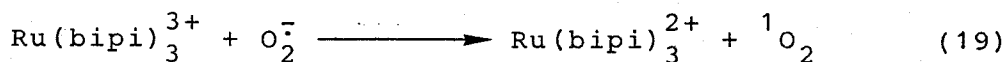


En presencia de oxígeno, sin embargo, el estado excitado interactúa rápidamente (ecuación 13) con el oxígeno, con la formación de la especie oxidada del pigmento y del radical superóxido, aunque también existe la posibilidad alternativa de que la interacción entre el estado triplete excitado del pigmento y el oxígeno conduzca al estado basal del complejo de rutenio y a la formación de oxígeno singlete, $^1\text{O}_2$, según el siguiente mecanismo de transferencia de energía pero no de carga:



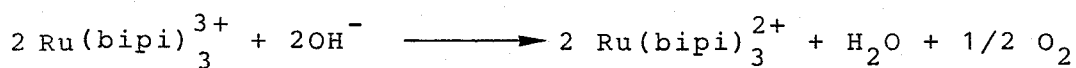
La formación de radicales superóxido por la interacción de tipo ciclo oxidativo entre el O_2 y el complejo de rutenio, con la consiguiente generación de la especie oxidada del pigmento, ha sido descrita por Winterle et al. (1976) en medio fuertemen-

te ácido. Por otra parte, la formación de oxígeno singlete descrita por Demas et al. (1977), con etanol como solvente, puede ser adscrita a una transferencia electrónica entre el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ y los radicales superóxido generados en la reacción (13):



Las cinéticas bifásicas observadas al estudiar la recuperación de la absorbancia a 452 nm tras la excitación por el láser en soluciones saturadas en oxígeno, tanto a pH neutro como en NaOH 1 M, sugieren un mecanismo de transferencia de carga y no de energía. Así, la primera fase, más rápida, correspondería a la desaparición del estado excitado por su interacción con el oxígeno según la reacción (13), con formación de la especie oxidada del complejo de rutenio y de superóxido. La total recuperación de la absorbancia basal en la segunda fase, más lenta, correspondería a la reducción de la forma oxidada del pigmento por reacción reversa con los radicales superóxido formados en la primera fase, según la reacción (19).

Existe, por otra parte, la posibilidad, principalmente en soluciones alcalinas, de la reducción del pigmento oxidado a partir de iones hidroxilo:



ya que se ha descrito que el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ puede sufrir una rápida reducción hasta la especie basal del pigmento con la adición de iones OH^- , según una reacción que ha sido postulada en el caso de la oxidación, mediada por el complejo de rutenio, de la molécula de agua (Ashmawy, 1979; Creutz y Sutin, 1975; Kalyanasundaram, 1982).

En presencia de semicarbazida, las cinéticas regis

tradas a 452 nm difieren entre sí según se hayan llevado a cabo en medio neutro o alcalino. Así, en NaOH 1 M la cinética bifásica que se observa en ausencia del donador aparece como de (pseudo)-primer orden en presencia de semicarbazida 20 mM, mientras que, por el contrario, a pH neutro no se aprecian diferencias significativas en las cinéticas registradas en presencia o ausencia de semicarbazida. Estos datos sugieren claramente que el donador es capaz de reducir eficazmente a la especie oxidada del complejo de rutenio a pH 14 (reacción 15), pero no a pH neutro, lo que explica que el fotosistema semicarbazida/ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ /oxígeno sea eficaz en la producción de peróxido de hidrógeno en NaOH 1 M y no en agua. En este último caso, pues, el factor limitante del sistema sería la incapacidad de la semicarbazida para reducir al complejo oxidado.

V. CONCLUSIONES.

1. En los sistemas fotobiológicos de producción de peróxido de hidrógeno, basados en el empleo de membranas tilacoidales de espinaca, la riboflavina -aceptor de electrones en el sitio reductor del fotosistema I- ha resultado ser el mediador redox más eficaz en potenciar la reacción de Mehler, llegándose a alcanzar valores de fotoproducción de H_2O_2 de hasta $256 \mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El proceso tiene lugar por reducción del oxígeno molecular con los electrones procedentes de la fotooxidación del agua.
2. La producción de H_2O_2 por el sistema tilacoides/riboflavina se detiene al poco tiempo por inhibición de la actividad del fotosistema II. La producción se reanuda, sin embargo, tras la adición de un sistema de donación directa de electrones al fotosistema I. El sistema constituido por TMPD reducido con DTE ha resultado ser el más eficiente, alcanzándose velocidades de fotogeneración de H_2O_2 de hasta $648 \mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
3. La inmovilización de las vesículas tilacoidales en agar, si bien disminuye la velocidad de formación de H_2O_2 , alarga considerablemente la estabilidad funcional de las mismas, lo que ha permitido la construcción de un sistema de flujo continuo en el que la producción de peróxido de hidrógeno se mantiene ininterrumpidamente durante al menos 4 horas.
4. Las partículas purificadas del fotosistema I producen peróxido de hidrógeno a velocidades de hasta $1800 \mu\text{mol mg(chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, si bien los niveles máximos alcanzados de peróxido formado son similares a los obtenidos con el fotosistema I integrado en vesículas tilacoidales.
5. Entre todos los pigmentos ensayados, la lumiflavina y el Ru(II)-Tris (2,2'-bipiridilo) se han manifestado como los

fotosensibilizadores más adecuados para construir un sistema fotoquímico artificial productor de peróxido de hidrógeno. En ambos casos, la producción de H_2O_2 es estrictamente dependiente de la presencia simultánea en la mezcla de reacción del donador (semicarbazida) y del aceptor de electrones (oxígeno), así como del propio fotosensibilizador.

6. La producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/lumiflavina/oxígeno depende en gran medida del pH de las soluciones, obteniéndose los mayores valores de producción a pH 3-5, 9-10 y 14, y los mínimos a pH 0-2, 7 y 12. Dicha dependencia del pH se puede explicar en términos de las diferencias observadas en las velocidades de las reacciones parciales de fotorreducción del pigmento con semicarbazida y de su posterior oxidación con oxígeno.
7. El bajo rendimiento del fotosistema flavínico en la zona de pH 12 se debe, en parte, a la baja estabilidad del peróxido de hidrógeno a dicho pH. En efecto, el H_2O_2 se descompone rápidamente en el intervalo de pH entre 10 y 13, con un máximo a 11,5-11,7 que coincide con el pK_a del peróxido. La reacción, que es dependiente de dióxido de carbono -cuyo papel aquí se describe por vez primera- y transcurre con acidulación del medio, se ha explicado en función de un mecanismo basado en la formación de ácido percarbónico como intermediario.
8. Los estudios realizados con la técnica de espectroscopía de excitación por láser han permitido establecer el mecanismo de funcionamiento del fotosistema flavínico. Así, el estado triplete, formado por fotoexcitación de la flavina, se reduce a flavosemiquinona con la semicarbazida. La oxidación con oxígeno de la forma semirreducida de la flavina conduce a la regeneración de su forma oxidada basal y a la formación del radical superóxido, que por dis

mutación posterior conduce al peróxido de hidrógeno.

9. La producción de peróxido de hidrógeno en células fotoelectroquímicas, aunque con un rendimiento inferior al que se alcanza en solución homogénea, permite obtener soluciones del peróxido que pueden ser utilizadas sin necesidad de ulteriores purificaciones. La máxima producción de H_2O_2 se alcanza con hidroxilamina/lumiflavina como sistema donador de electrones en el compartimento anódico, electrodos de mercurio -fijo el ánodo y de gota el cátodo- y con pH 14 y 1, respectivamente, en las hemicélulas anódica y catódica.

10. La producción de peróxido de hidrógeno por el sistema semicarbazida/ $Ru(bipi)_3^{2+}$ /oxígeno también manifiesta una marcada dependencia del pH. Así, la formación de H_2O_2 es prácticamente inapreciable en toda la escala de pH entre 0 y 12, y sube drásticamente a partir de este último valor hasta alcanzar el máximo rendimiento a pH 14. Utilizando como óptimas las concentraciones de 25 μM para el complejo de rutenio y de 0,175 M para la semicarbazida, la fotoproducción de H_2O_2 transcurre a una velocidad de 0,85 $mmol\ l^{-1}\ min^{-1}$. La inmovilización del pigmento en Nafion ha permitido el diseño de un sistema de flujo continuo en el que la producción se mantiene durante al menos 33 horas.

11. Los estudios realizados con las técnicas fluorimétricas y de espectroscopía de excitación con láser han permitido establecer el mecanismo de funcionamiento del sistema semicarbazida/ $Ru(bipi)_3^{2+}$ /oxígeno. Así, la especie triplete, formada por fotoexcitación del complejo de rutenio, se oxida con el oxígeno para dar lugar a la aparición de la especie oxidada del pigmento y del radical superóxido. Posteriormente, el complejo oxidado se reduce con la semi

carbazida a pH alcalino, pero no a pH neutro, para regenerar la especie inicial y el peróxido de hidrógeno se forma por dismutación del superóxido.

VI. BIBLIOGRAFIA.

Aaronson, S., Berner, T. y Dubinsky, Z. (1980). Microalgae as a source of chemicals and natural products. En: *Algae Biomass* (Shelef, G. y Saeder, C.J., eds.), pp. 575-601, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Abel, E. (1952). *Monatsh. Chem.* 83, p. 422.

Allen, J.F. (1977). Superoxide and photosynthetic reduction of oxygen. En: *Superoxide and Superoxide Dismutases* (Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I., eds.), pp. 417-436, Academic Press, Londres.

Almgren, M., Holmström, B. y Tegnér, L. (1977). Solar energy and photoinduced redox processes-General principles. En: *Solar Energy-Photochemical Conversion and Storage* (Claesson, S. y Engström, L., eds.), capítulo II, National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

Anderson, C.P., Salmon, D.J., Meyer, T.J. y Young, R.C. (1977). Photochemical generation of $\text{Ru}(\text{ppy})_3^+$ and O_2^- . *J. Am. Chem. Soc.*, 99:6, pp. 1980-1982.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol.*, 24, p.1-15.

Arnon, D.I. (1971). The light reactions of photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, pp. 2883-2892.

Arnon, D.I. y Chain, R.K. (1977). Ferredoxin-catalyzed photo phosphorylations: concurrence, stoichiometry, regulation and quantum efficiency. En: *Photosynthetic Organelles* (Miyachi, S., Katoh, S., Fujita, Y. y Shibata, K., eds.) p. 433. Japanese Society of Plant Physiologists, Center for Academic Publications, Japón.

Asada, K. y Nakano, Y. (1978). Affinity for oxygen in photo reduction of molecular oxygen and scavenging of hydrogen peroxide in spinach chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, 28, pp. 917-920.

Ashmawy, F.M., McAuliffe, Ch.A. y Tames J. (1979). Mimicking photosynthesis: photolysis of water by transition metal complexes. *Inorganic Perspectives in Biology and Medicine* 2, pp. 211-240.

Balzani, V. y Scandola, F. (1981). Photochemical electron transfer reactions in homogeneous solutions. En: *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (Connolly, J.S., ed.), pp. 97-130, Academic Press, Nueva York-Londres.

Balzani, V. y Scandola, F. (1983). Light-induced and thermal electron-transfer reactions. En: *Energy Resources through Photochemistry and Catalysis* (Grätzel, M., ed.), pp. 1-48, Academic Press, Nueva York-Londres.

Balzani, V., Bolletta, F., Gandolfi, M.T. y Maestri, M. (1978). Bimolecular electron transfer reactions of the excited states of transition metal complexes. *Topics in Current Chemistry*, vol. 75, pp. 1-64.

Barman, T.E. (1969). *Enzyme Handbook*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.

Ben-Amotz, A. y Avron, M. (1980). Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of Dunaliella. En: *Algae Biomass* (Shelef, G. y Saeder, C.J., eds.), pp. 603-611, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Bensasson, R., Salet, C. y Balzani, V. (1976). Laser flash spectroscopy of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 98:12, pp. 3722-3724.

Bernt, E. y Bergmeyer, H.U. (1963). En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 633-635, Verlag Chemie, Academic Press, Nueva York.

Bolton, J.R. (1978). Solar fuels. *Science*, 202, pp. 705-711.

Bolton, J.R. y Hall, D.O. (1979). Photochemical conversion and storage of solar energy. *Annu. Rev. Energ.*, 4, pp. 353-401.

Bolton, J.R., Haught, A.F. y Ross, R.T. (1981). Photochemical energy storage: an analysis of limits. En: *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (Connolly, J.S., ed.), pp. 297-340, Academic Press, Nueva York-Londres.

Borgarello E., Kiwi, J., Pelizzetti, E., Visca, M. y Grätzel M. (1981). Sustained water cleavage by visible light. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, pp. 6324-6329.

Buttry, D.A. y Anson, F.C. (1982). Electrochemical control of the luminescent lifetime of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ incorporated in Nafion films on graphite electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, pp. 4824-4829.

Cammack, R., Hall, D.O. y Rao, K.K. (1985). Hydrogenases: structure and applications in hydrogen production. En: *Microbial Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects*, pp. 75-102, Society for General Microbiology.

Cano-Yelo, C. y Deronzier, A. (1983). Net photoreduction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex in acetonitrile. A photoelectrochemical cell application. *Nouveau Journal de Chimie*, 7, n°3, pp. 147-148.

Claesson, S. y Holmström, B., eds. (1982). *Solar Energy-Photochemical Processes Available for Energy Conversion*. National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

Cocquemot, M.F., Thomasset, B., Barbotin, J.N., Gellf, G. y Thomas, D. (1981). Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. 2. Storage and functional stability in immobilized thylakoids. *Eur. J. App. Microbiol. Biotechnol.*, 11, pp. 193-198.

Connolly, J.S., ed. (1981). *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy*, Academic Press, Nueva York-Londres.

Connolly, J.S. y Turner, J.A. (1983). Status and prospects for solar photochemistry. En: *Photochemical Conversions* (Braun, A.M., ed.), pp. 73-131, IOCD UNESCO.

Cornic, G. y Miginiac-Maslow, M. (1985). Photoinhibition of photosynthesis in broken chloroplasts as a function of electron transfer rates during light treatment. *Plant Physiol.*, 78, pp. 724-729.

Crampton, C.A., Faber, G., Jones, R., Leaver, J.P. y Schelle, S. (1977). The manufacture, properties and uses of hydrogen peroxide and other inorganic peroxy compounds. En: *The Modern Inorganic Chemical Industry* (Thompson, R., ed.), pp. 232-272, The Chemical Society, Burlington House, Londres.

Creutz, C. y Sutin, N. (1975). Reaction of Tris(bipyridine)-ruthenium(III) with hydroxide and its application in a solar energy storage system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 72, n°8, pp. 2858-2862, Chemistry.

Creutz, C., Chou, M., Netzel, T.L., Okumura, M. y Sutin, N. (1980). Lifetimes, spectra, and quenching of the excited states of polypyridine complexes of iron(II), ruthenium(II), and osmium (II). *J. Am. Chem. Soc.*, 102:4, pp. 1309-1319.

Csány, L.J. y Galbács, Z.M. (1985). Carbon dioxide-mediated decomposition of hydrogen peroxide in alkaline solutions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 81, pp. 113-116.

Cuendet, P. y Grätzel, M. (1982). New photosystem I electron acceptors: improvement of hydrogen photoproduction by chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, 36, pp. 203-210.

Charlot, G., Badoz-Lambling, M.J. y Trémillon, B. (1969). *Las Reacciones Electroquímicas*, pp. 149-162, Toray-Mason S.A., Barcelona.

De la Rosa, M.A., Navarro, J.A., De la Rosa, F.F. y Losada, M. (1983). Stabilization by high pH of hydrogen peroxide production with flavin photosystems. *Photobiochem. Photobiophys.*, 5, pp. 93-103.

De la Rosa, M.A., Navarro, J.A., Roncel, M. y De la Rosa, F. F. (1985). Sistemas fotoquímicos productores de compuestos energéticos: Producción de peróxido de hidrógeno con flavinas. *Química e Industria*, 31, pp. 497-501.

De la Rosa, M.A., Rao, K.K. y Hall, D.O. (1986). Hydrogen peroxide photoproduction by free and immobilized spinach thylakoids. *Photobiochem. Photobiophys.*, 11, pp. 173-187.

Demas, J.N., Harris, E.W. y McBride, R.P. (1977). Energy transfer from luminescent transition metal complexes to oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 99:11, pp. 3547-3551.

Duonghong, D., Borgarello, E. y Grätzel, M. (1981). Dynamics of light-induced water cleavage in colloidal systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, pp. 4685-4690.

- Durham, B., Caspar, J.V., Nagle, J.K. y Meyer, T.J. (1982). Photochemistry of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. J. Am. Chem. Soc., 104, pp. 4803-4810.
- Duysens, L.N.M. y Amesz, J. (1962). Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 64, p. 243.
- Elstner, E.F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol., 33, pp. 73-96.
- Elstner, E.F. y Frommeyer, D. (1978a). Production of hydrogen peroxide by photosystem II of spinach chloroplast lamellae. FEBS Lett., 86, 1, pp. 143-146.
- Elstner, E.F. y Frommeyer, D. (1978b). Analysis of different mechanisms of photosynthetic oxygen reduction. Z. Naturforsch., 336, pp. 276-279.
- Fee, J.A. y Valentine, J.S. (1977). Chemical and physical properties of superoxide. En: Superoxide and Superoxide Dismutases (Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I., eds.), pp. 19-60, Academic Press, Londres.
- Fife, D.J. y Moore, W.M. (1979). The reduction and quenching of photoexcited flavins by EDTA. Photochem. Photobiol., 29, pp. 43-47.
- Finnström, B. (1982) Production of hydrogen and other fuels in photoelectrochemical cells. En: Solar Energy-Photochemical Processes Available for Energy Conversion (Claesson, S. y Holmström, B., eds.), pp. 163-204, National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

Gafney, H.D. y Adamson, A.W. (1972). Excited state $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ as an electron-transfer reductant. *J. Am. Chem. Soc.*, 94, pp. 8238-8239.

Gisby, P.E. y Hall, D.O. (1980). Biophotolytic hydrogen production using alginate immobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts. *Nature*, 287, p. 251.

Gisby, P.E., Rao, K.K. y Hall, D.O. (1982). Hydrogen production from water, using chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts: a photobiological process. En: *Solar World Forum* (Hall, D.O. y Morton, J., eds.), vol. 3, pp. 2242-2247, Pergamon Press, Oxford.

Gisby, P.E., Rao, K.K. y Hall, D.O. (1986). *Methods in Enzymology*. Academic Press, Nueva York, en prensa.

Goldman, J.C. (1979). Outdoor algal mass cultures. I. Applications. *Water Research*, 13, pp. 1-19.

Good, N. y Hill, R. (1955). Photochemical reduction of oxygen in chloroplasts preparations. II: Mechanisms of the reaction with oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 57, pp. 355-366.

Gould, J.M. e Izawa, S. (1973). Photosystem II electron transport and phosphorylation with dibromothymoquinone as the electron acceptor. *European J. Biochem.*, 37, pp. 185-192.

Grätzel, M. (1981). Photoinduced water splitting in heterogeneous solutions. En: *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (Connolly, J.S., ed.), pp. 131-160, Academic Press, Nueva York-Londres.

Grätzel, M., ed. (1983). *Energy Resources through Photochemistry and Catalysis*. Academic Press, Nueva York-Londres.

Grodowski, M.S., Veyret, B. y Weiss, K. (1977). Photochemistry of flavins II. Photophysical properties of alloxazines and isoalloxazines. *Photochem. Photobiol.*, 26, pp. 341-352.

Guerrero, M.G. y Losada, M. (1983). Conversión biológica de la energía solar. *Mundo Científico* (versión en castellano de *La Recherche*), 26, pp. 616-630.

Guerrero, M.G., Manzano, C., Cárdenas, J. y Losada, M. (1974). Manometría, Prácticas de Bioquímica (IV). pp. 17-19, *Publicaciones de la Universidad de Sevilla*.

Hall, D.O. (1982). Solar energy through biology: fuels from biomass. En: *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems* (Mislin, H. y Bachofen, R., eds.), *Experientia Supplementum* vol. 43, pp. 9-16, *Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Stuttgart*.

Hall, D.O. y Palz, W. eds. (1982). *Photochemical, Photoelectrochemical and Photobiological Processes. Proceedings of the EC Contractors Meeting*. Reidel Publishing Company Dordrecht-Londres.

Hall, D.O. y Rao, K.K. (1981). *Photosynthesis, Studies in Biology* no. 37, Edward Arnold, Londres.

Hall, D.O., Coombs, J. y Higgins, I.J. (1985). Energy and Biotechnology. En: *Biotechnology, principles and applications* (Higgins, I.J., Best, D.J. y Jones, J., eds.), pp. 24-73, *Blackwell Scientific Publications, Oxford*.

Hall, D.O., Rao, K.K., Cuendet, P., Grätzel, M., Mualen, A., Bruce, D.L. y Smith, G.D. (1984). Immobilization of photosynthetic membranes and enzymes on solid supports for the photoproduction of hydrogen and NADPH₂. En: *Solar World Congress* (Kolay, S., ed.), vol. III, pp. 2006-2010, *Pergamon Press, Oxford*.

- Halliwell, B. (1981). Toxic effects of oxygen on plant tissues. En: Chloroplast Metabolism, Clarendon Press, Oxford.
- Halmann, M. (1983). Photochemical fixation of carbon dioxide. En: Energy Resources through Photochemistry and Catalysis (Grätzel, M., ed.), pp. 507-534, Academic Press, Nueva York-Londres.
- Harriman, A. (1983). The role of porphyrins in natural and artificial photosynthesis. En: Energy Resources through Photochemistry and Catalysis (Grätzel, M., ed.), pp. 163-217, Academic Press, Nueva York-Londres.
- Heelis, P.F. (1982). The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). Chem. Soc. Rev., 11, pp. 15-39.
- Heelis, P.F. y Phillips, G.O. (1979). Photoreduction reactions of flavin coenzymes—a laser flash photolysis study. Photobiochem. Photobiophys., 1, pp. 63-70.
- Heelis, P.F., De la Rosa, M.A. y Phillips, G.O. (1985). A laser flash photolysis study of the photoreduction of the lumiflavin triplet state. Photobiochem. Photobiophys., 9, pp. 57-63.
- Heelis, P.F., Parsons, B.J. y Phillips, G.O. (1979a). The pH dependence of the reactions of flavin triplet states with amino acids. Biochim. Biophys. Acta, 587, pp. 455-462.
- Heelis, P.F., Parsons, B.J., Phillips, G.O. y McKellar, J.F. (1979b). The photoreduction of flavins by amino acids and EDTA, a continuous and flash photolysis study. Photochem. Photobiol., 30, pp. 343-347.

Heelis, P.F., Parsons, B.J., Phillips, G.O. y McKellar, J.F. (1978). A laser flash photolysis study of the nature of FMN triplet states and the reactions of the neutral form with amino acids. *Photochem. Photobiol.*, 28, pp. 169-173.

Heelis, P.F., Parsons, B.J., Phillips, G.O. y McKellar, J.F. (1981). The flavin sensitized photooxidation of ascorbic acid: a continuous and flash photolysis study. *Photochem. Photobiol.*, 33, pp. 7-13.

Hemmerich, P. y Wessiak, A. (1976). The structural chemistry of flavin-dependent oxygen activation. En: *Flavins and Flavoproteins, Proceedings of the Fifth International Symposium* (Singer, T.P., ed.), pp. 9-22, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Hemmerich, P., Knappe, W.R., Kramer, H.E.A. y Traber, R. (1980). Distinction of $2e^-$ and $1e^-$ reduction modes of the flavin chromophore as studied by flash photolysis. *Eur. J. Biochem.*, 104, pp. 511-520.

Herber, U. y French, C.S. (1968). Effects of oxygen on the electron transport chain of photosynthesis. *Planta*, 79, pp. 99-112.

Holmström, B. (1977). Photoinduced redox processes: production of hydrogen and other fuels. En: *Solar Energy-Photochemical Conversion and Storage* (Claesson, S. y Engström, L., eds.), capítulo IV, National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

Holmström, B. y Carlsson, P. (1982). Electricity production in photoelectrochemical cells. En: *Solar Energy-Photochemical Processes Available for Energy Conversion* (Claesson, S. y Holmström, B., eds.), pp. 205-304, National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

Jaiswal, D.K., Ram, R.N. y Prasad, B.B. (1982). Decomposition of hydrogen peroxide catalysed by copper ions in presence of amphoteric oxides. *Z. Phys. Chemie*, 263, pp. 74-80.

Kalyanasundaram, K. (1982). Photophysics, photochemistry and solar energy conversion with Tris(bipyridyl)ruthenium(II) and its analogues. *Coord. Chem. Rev.*, 46, pp. 159-244.

Kalyanasundaram, K., Kiwi, J. y Grätzel, M. (1978). Hydrogen evolution from water by visible light, a homogeneous three component test system for redox catalysis. *Helv. Chim. Acta*, 61,7, pp. 2720-2730.

Karen, A., Ikeda, N., Mataga, N. y Tanaka, F. (1983). Pico-second laser photolysis studies of fluorescence quenching mechanisms of flavins: a direct observation of indole-flavin singlet charge transfer state formation in solutions and flavoenzymes. *Photochem. Photobiol.*, 37 (5), pp. 495-502.

Kirch, M., Lehn, J-M. y Sauvage, J-P. (1979). Hydrogen generation by visible light irradiation of aqueous solutions of metal complexes. An approach to the photochemical conversion and storage of solar energy. *Helv. Chim. Acta*, 62, 4, pp. 1345-1384.

Kiwi, J. y Grätzel, M. (1978). Oxygen evolution from water via redox catalysis. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 17, pp. 860-861.

Kiwi, J. y Grätzel, M. (1979). Ruthenium oxide, a suitable redox catalyst to mediate oxygen production from water. *Chimia*, 33, p. 289.

Kiwi, J., Borgarello, E., Pelizzetti, E., Visca, M. y Grätzel, M. (1980). Cyclic water cleavage by visible light. Drastic improvement of yield of H_2 and O_2 with bifunctional redox catalysts. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 19, pp.646-648.

Knobloch, E. (1971). Polarography of flavins. En: *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. y Wright, L.D., eds.), vol. XVIII, Vitamins and Coenzymes, parte B, pp. 479-495, Academic Press, Nueva York-Londres.

Koziol, J. (1971). Fluorimetric analyses of riboflavin and its coenzymes. En: *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. y Wright, L.D., eds.), vol. XVIII, Vitamins and Coenzymes, parte B, pp. 253-284, Academic Press, Nueva York-Londres.

Krasna, A.I. (1979). Proflavine catalyzed photoproduction of hydrogen from organic compounds. *Photochem. Photobiol.*, 29, pp. 267-276.

Krasnovsky, A.A., Semenova, A.N. y Nikandrov, V.V. (1982). Chlorophyll-containing liposomes: photoreduction of methylviologen and photoproduction of hydrogen. *Photobiochem. Photobiophys.*, 4, pp. 227-232.

Krasnovsky, A.A., Van Ni, C., Nikandrov, V.V. y Brin, G.P. (1980). Efficiency of hydrogen photoproduction by chloroplasts-bacterial hydrogenase systems. *Plant Physiol.*, 66, pp. 925-930.

Kravchenko, W.Y., Fomichev, V.G. y Seryshev, G.A. (1982). Behavior of hydrogen peroxide on a platinum anode. *J. Appl. Chem.*, 54 (12), pp. 2362-2366.

Krishna, R. y Hall, D.O. (1979). Hydrogen production from isolated chloroplasts. En: *Photosynthesis in Relation to Model Systems* (Barber, J., ed.), pp. 299-329, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Krishnan, M., Zhang, X. y Bard, A.J. (1984). Polymer films on electrodes 14. Spectral sensitization of n-type SnO_2 and voltammetry at electrodes modified with Nafion films containing $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, pp. 7371-7380.

Lehn, J-M. (1981). Photoinduced generation of hydrogen and oxygen from water. En: *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (Connolly, J.S., ed.), pp. 161-200, Academic Press, Nueva York-Londres.

Lin, Ch-T. y Sutin, N. (1976). Quenching of the luminescence of the Tris(2,2'-bipyridine) complexes of ruthenium (II) and osmium (II). Kinetic considerations and photogalvanic effects. *J. Phys. Chem.*, 80, 2, pp. 97-105.

Losada, M. (1979). Reflexiones en torno a la transducción biológica de la energía. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina. Sevilla.

Losada, M., Hervás, M., De la Rosa, M.A. y De la Rosa, F.F. (1983). Energy transduction by electrochemical systems. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11, pp. 193-230.

Losada, M., Whatley, F.R. y Arnon, D.I. (1961). Separation of two light reactions in non-cyclic photophosphorylation of green plants. *Nature*, 190, p. 606.

Lytle, F.E. y Hercules, D.M. (1969). The luminescence of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride. *J. Am. Chem. Soc.*, 91:2, pp. 253-257.

- Mandal, K. y Hoffman, M.Z. (1984). Quantum yield of formation of methylviologen radical cation in the photolysis of the $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{MV}/\text{EDTA}$ system. *J. Phys. Chem.*, 88, pp. 5632-5639.
- Martin, C.R., Rubinstein, I. y Bard, A.J. (1982). Polymer films on electrodes 9. Electron and mass transfer in Nafion films containing $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, pp. 4817-4824.
- Massey, V., Palmer, G. y Ballou, D. (1971). On the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. En: *Flavins and Flavoproteins* (Kamin, H., ed.), Third International Symposium, pp. 349-361, University Park Press, Baltimore.
- Massey, V. y Williams C.H., eds. (1982). *Flavins and Flavoproteins*. Proceedings of the 7th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Elsevier/North-Holland, Nueva York.
- Mehler, A.H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, pp. 65-77.
- Meyer, T.J. (1983). Excited-state electron transfer. *Prog. Inorg. Chem.*, 30, pp. 389-440.
- Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I., eds. (1977). *Superoxide and Superoxide Dismutases*. Academic Press, Londres.
- Mislin, H. y Bachofen R., eds. (1982). *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems*. *Experientia Supplementum*, vol. 43, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Stuttgart.

- Misra, H.P. y Fridovich, I. (1971). The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.*, 246, pp. 6886-6890.
- Miyasaka, T., Watanabe, T., Fujishima, A. y Honda, K. (1978). Light energy conversion with chlorophyll monolayer electrodes. In vitro electrochemical simulation of photosynthetic primary processes. *J. Am. Chem. Soc.*, 100, pp. 6657-6665.
- Mochida, I., Yasutake, A., Fujitsu, H. y Takeshita, K. (1982). Strong interaction of metallotetraphenylporphyrins with supporting metal oxides observed in the catalytic decomposition of hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem.*, 86 (17), pp. 3468-3471.
- Morris, P., Nash, G.V. y Hall, D.O. (1982). The stability of electron transport in vitro chloroplast membranes. *Photosynthesis Research*, 3, pp. 227-240.
- Muallen, A.V. y Hall, D.O. (1982). Ascorbate as substrate for photoproduction of hydrogen by photosystem I of chloroplasts. *Plant Physiol.*, 69, pp. 1116-1120.
- Nagy, L., Galbács, Z.M., Csányi, L.J. y Horváth, L. (1982). The role of the superoxide radical in the OsO_4 catalysed decomposition of hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 5, pp. 859-863.
- Neumann-Spallart, M. y Kalyanasundaram, K. (1982). Photoelectrochemical cells for the production of hydrogen and hydrogen peroxide via photoredox reactions. *J. Phys. Chem.*, 86, pp. 2681-2690.
- Palmer, G. y Massey, V. (1968). *Biological Oxidations* (Singer, T.P., ed.), Interscience Publishers, John Wiley & Sons, Nueva York.

- Pan, R.L., Fan, I-Ji., Bhardwaj, R. y Gross, E.L. (1982). A photosynthetic photoelectrochemical cell using flavin mononucleotide as the electron acceptor. *Photochem. Photobiol.*, 35, pp. 655-664.
- Pelizzetti, E. y Visca, M. (1983). Bifunctional redox catalysis: synthetic and operation in water-cleavage reactions. En: *Energy Resources through Photochemistry and Catalysis* (Grätzel, M., ed.), pp. 261-331, Academic Press, Nueva York-Londres.
- Penzer, G.R. y Radda, G.K. (1971). Photochemistry of flavins. En: *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. y Wright, L.D., eds.), vol. XVIII, Vitamins and Coenzymes, parte B, pp. 479-495, Academic Press, Nueva York-Londres.
- Peters, A.L.J., Boog, R., Krab, K. y Kraayenhof, R. (1984). Efficiency of hydrogen photoproduction by photosystem I-enriched subchloroplast vesicles combined with Proteus mirabilis cells. Effects of some exogeneous electron donors. *Photosynthesis Research*, 5, pp. 335-346.
- Peters, A.L.J., Wielink, J.E.V., Sang, H.W.W.F., De Vries, S. y Kraayenhof, R. (1983). Studies on well coupled photosystem I-enriched subchloroplast vesicles. Content and redox properties of electron-transfer components. *Biochim. Biophys. Acta*, 722, pp. 460-470.
- Ramos, J.L., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1982). Sustained photoproduction of ammonia from nitrate by Anacystis nidulans. *Applied and Environmental Microbiology*, Noviembre, pp. 1020-1025.

Ramos, J.L., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1984). Sustained photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain ATCC 33047. *Applied and Environmental Microbiology*, Julio, pp. 114-118.

Rao, K.K. y Hall, D.O. (1979). Hydrogen production from isolated chloroplasts. En: *Photosynthesis in Relation to Model Systems* (Barber, J., ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Rao, K.K. y Hall, D.O. (1983). Photobiological production of fuels and chemicals. En: *Photochemical Conversions* (Braun, A.M., ed.), pp. 1-48, Presses Polytechnique Romandes, Lausanne.

Rao, K.K. y Hall, D.O. (1984). Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems. *Trends in Biotechnology*, 2, pp. 124-129.

Rehm, H-J. y Reed, G., eds. (1984). *Biotechnology*, vol. 6 a: *Biotransformations* (Kieslich, K., vol. ed.), Verlag-Chemie, Weinheim.

Relimpio, A.M., Vega, J.M., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1977). *Potenciometría y Bioenergética, Prácticas de Bioquímica (III)*, pp. 211-217, Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

Richmond, A. y Preiss, K. (1980). The biotechnology of algaculture. *Interdiscipl. Sci. Rev.*, 5, pp. 60-70.

Richter, H.W. y Waddell, W.H. (1982). Chain decomposition of hydrogen peroxide induced by catalytic levels of reduced 5-methylphenazinium and metal ions: a nonclassical Fenton system. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, pp. 4630-4634.

Rizkalla, E.N., El-Shafey, O.H. y Guindy, N.M. (1982). The kinetics of decomposition of hydrogen peroxide in the presence of EDTA -iron (III)-complex. *Inorg. Chim. Acta-Articles*, 57 (2), pp. 199-205.

Roncel, M. (1983). Producción de peróxido de hidrógeno con flavinas iluminadas en soluciones homogéneas y en células fotoelectroquímicas. Efecto del dióxido de carbono sobre la descomposición del peróxido. Tesis de Licenciatura, Sevilla.

Roncel, M., Navarro, J.A., De la Rosa, F.F. y De la Rosa, M.A. (1984). Flavin-mediated production of hydrogen peroxide in photoelectrochemical cells. *Photochem. Photobiol.*, 40, pp. 395-398.

Rosen, M.M. y Krasna, A.I. (1980). Limiting reactions in hydrogen photoreduction by chloroplasts and hydrogenase. *Photochem. Photobiol.*, 31, pp. 259-265.

Rubinstein, I.R. y Bard, A.J. (1981). Polymer films on electrodes 5. Electrochemistry and chemiluminescence at Nafion-coated electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, pp. 5007-5013.

Santos, C.P. y Hall, D.O. (1982). Thylakoid polypeptides of light and dark aged chloroplasts. *Plant Physiol.*, 79, pp. 795-802.

Sayre, R.T. y Homann, P.H. (1979). A light-dependent oxygen consumption induced by photosystem II of isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196, pp. 525-533.

Singer, T.P., ed. (1976). *Flavins and Flavoproteins. Proceedings of the Fifth International Symposium*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-Oxford-Nueva York.

Schreiner, S. y Kramer, H.E.A. (1976). Influence of pH on flavins in the triplet state. En: Flavins and Flavoproteins (Singer, T.P., ed.), Proceedings of the Fifth International Symposium, pp. 793-799, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-Oxford-Nueva York.

Slessor, M. y Lewis, C. (1979). Biological Energy Resources, E&FN Spon Ltd., Londres.

Somer, G. y Green, M.E. (1973). Photoreduction of methylene blue by water. Photochem. Photobiol., 17, pp. 179-190.

Somer G. y Temizer A. (1984). Photoreduction of thionine by water. Photochem. Photobiol., 40, 5, pp. 575-580.

Špalek, O., Balej, J. y Paseka, I. (1982). Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide in alkaline solutions. J. Chem. Soc., 78 (8), pp. 2349-2359.

Sun, M., Moore, T.A. y Song, P-S. (1972). Molecular Luminescence studies of flavins. I. The excited states of flavins. J. Am. Chem. Soc., 94, pp. 1730-1740.

Tafalla, D., Razzini, J. y Salvador, P. (1986). Photosynthetic production of H_2O_2 in a photoelectrochemical cell with TiO_2 electrodes. Abstracts of International Congress on Renewable Energy Sources, p. 121, Madrid, Mayo.

Tegnér, L. (1982). Principles and efficiencies of photochemical solar energy conversion. En: Solar Energy-Photochemical Processes Available for Energy Conversion (Claesson, S. y Holmström, B., eds.), pp. 19-40, National Swedish Board for Energy Source Development, Estocolmo.

- Telfer, A., Cammack, R. y Evans, M.C.W. (1970). Hydrogen peroxide as the product of autoxidation of ferredoxin: reduced either chemically or by illuminated chloroplasts. FEBS Lett., 10, pp. 21-24.
- Tel-Or, E., Boussiba, S. y Richmond, A.E. (1980). Products and chemicals from Spirulina platensis. En: Algae Biomass (Shelef, G. y Saeder, C.J., eds.), pp. 611-618, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Temizer, A. (1985). Effect of water on photochemical reduction of concentrated thionine solution by visible light. Photochem. Photobiol., 41, 2, pp. 127-132.
- Trebst, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photo-reduction. En: Methods in Enzymology (San Pietro, A., ed.), vol. XXIV, pp. 146-165, Academic Press, Nueva York.
- Trebst, A. y Avron, M., eds. (1977). Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. En: Encyclopedia of Plant Physiology (Pirson, A. y Zimmermann, M.H., eds.), vol. 5, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Nueva York.
- Vaish, S.P. y Tollin, G. (1970). Flash photolysis of flavins. IV. Some properties of the lumiflavin triplet state. Bioenerg. 1, pp. 181-192.
- Vaish, S.P. y Tollin, G. (1971). Flash photolysis of flavins. V. Oxidation and disproportionation of flavin radicals. Bioenerg., 2, pp. 61-72.
- Vogelmann, E., Schreiner, S., Rauscher, W. y Kramer, H.E.A. (1976). Reactivity of organic dye triplet states in electron transfer processes. Z. Physik. Chem. Neue Folge Bd., 101, pp. 1-6.

Watanabe, T. , Fujishima, A. y Honda, K. (1983). Photo-electrolysis of water and sensitization of semiconductors. En: Energy Resources through Photochemistry and Catalysis (Grätzel, M., ed.), pp. 359-385, Academic Press, Nueva York-Londres.

Weaver, P.F., Lien, S. y Siebert, M. (1980). Photobiological production of hydrogen. *Solar Energy*, 24, pp. 3-45.

Winterle, J.S., Kliger, D.S. y Hammond, G.S. (1976). Mechanisms of photochemical reactions in solution. 80. Photochemical oxidation of Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) by molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 98:12, pp. 3719-3721.

Wise, D.L. (1981). Biomass production and bioconversion to both fuel and food employing solar energy technology-an alternative to conventional farming and the conversion of food to fuel. *Solar Energy*, 27, 2, pp. 159-178.

Yamase, T. (1981). Production of hydrogen by a photogalvanic-cell with a FMN-EDTA system. *Photochem. Photobiol.*, 34, pp. 111-114.

UNIVERSIDAD

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Graduados

José Antonio Navarro Carrusero
"Producción fotoquímica y fotobiológica
de peróxido de hidrógeno"

APTO "CUM LAUDE"

10

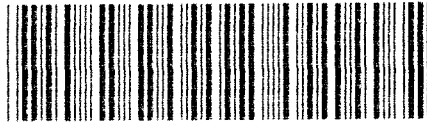
Octubre

86

[Signature]
[Signature]

[Signature]
Luz Reyes

[Signature]
[Signature]
J. A. Navarro



500293265

FBI E TO-129

293265