

Capítulo 10.

Fotólisis de ácido fólico.

En este capítulo se presentan los resultados de los experimentos realizados irradiando soluciones ligeramente ácidas de ácido fólico. En estas condiciones, según lo expuesto en el capítulo anterior, está presente, casi exclusivamente, la forma ácida de este compuesto. Antes de comenzar con el desarrollo es necesario adelantar algunos comportamientos generales para tener en cuenta cómo se organiza este capítulo.

Durante la fotólisis del ácido fólico se generan productos que, a su vez, son fotosensibles. Para minimizar los procesos de fotólisis secundaria se trabajó, tal como se explicó en la sección 6.2, con soluciones de ácido fólico lo suficientemente concentradas como para que más de 99,9% de la luz sea absorbida inicialmente por dicho compuesto, actuando, de esta manera, como filtro interno para los fotoproductos. Bajo estas condiciones experimentales se identificaron los productos de reacción y se calcularon los correspondientes rendimientos cuánticos.

Con el objetivo de determinar la participación del O_2 en la reacción de fotodescomposición del ácido fólico, se comparan los resultados obtenidos en presencia y ausencia del mismo. Por otro lado, se presentan los resultados de la investigación del papel del 1O_2 en el mecanismo de la reacción.

En estas condiciones experimentales de concentración y en presencia de O_2 , los cambios observados durante la fotólisis estacionaria pueden dividirse en dos etapas. Una que ocurre dentro de los primeros 5 minutos de irradiación y otra que ocurre posteriormente. A continuación y, con el objeto de exponer más claramente los resultados, se presentarán ambas etapas en dos secciones separadas.

10.1. Primera etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O₂.

En la figura 10.1 pueden apreciarse los cambios espectrales que experimenta una solución acuosa ligeramente ácida de ácido fólico cuando se irradia con luz UV-A. En la figura 10.1.b se muestran los correspondientes espectros DE. Puede observarse la existencia de cuatro puntos isobéuticos bien definidos en 216, 238, 269 y 314 nm; los cuales se mantienen invariantes durante aproximadamente 8 minutos de irradiación. Luego de este período se produce un corrimiento gradual de dichos puntos isobéuticos e, incluso, aparece uno nuevo cerca de los 400 nm (espectros presentados más adelante). Estos resultados indican que existe un único proceso fotoquímico en los primeros minutos de la fotólisis y posteriormente se produce la aparición de otros procesos secundarios.

Como puede observarse en la figura 10.2, el espectro DEN de esta reacción se corresponde bastante bien con el espectro DTN, obtenido a partir de los espectros de la 6-formilpterina y el ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Como se mencionó en el capítulo 3, estas sustancias fueron propuestas por Lowry como fotoproductos del ácido fólico. Debido a esto, y a pesar de que las condiciones de pH en las cuales fue realizado tal estudio son muy diferentes, las mencionadas sustancias fueron seleccionadas para realizar la comparación de espectros diferencia.

Los experimentos de TLC muestran la presencia dos manchas fluorescentes en las soluciones irradiadas de ácido fólico, con valores de R_f que se corresponden a los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Cabe recordar que las manchas de ácido fólico no presentan fluorescencia en estas condiciones experimentales. La figura 10.3 muestra una placa de TLC en la que fue sembrada una solución de ácido fólico a distintos tiempos de irradiación. Puede apreciarse en la foto que la 6-formilpterina aparece antes que la 6-carboxipterina, sugiriendo que este último compuesto se genera en una etapa posterior.

El ácido *p*-aminobenzoilglutámico, por su parte, tampoco puede ser revelado por luz UV-A. Por este motivo, se recurrió a la utilización de placas de celulosa con marcador fluorescente (ver sección 7.3). En experimentos realizados con el correspondiente patrón, se observó que el mismo corre junto con el frente del solvente. Se sembraron soluciones de ácido fólico irradiadas y sin irradiar y pudo observarse que en las primeras existía una mancha a la altura del frente del solvente que no aparecía en las segundas. Este resultado muestra la presencia de una sustancia con las características del ácido *p*-aminobenzoilglutámico en las

soluciones iluminadas de ácido fólico.

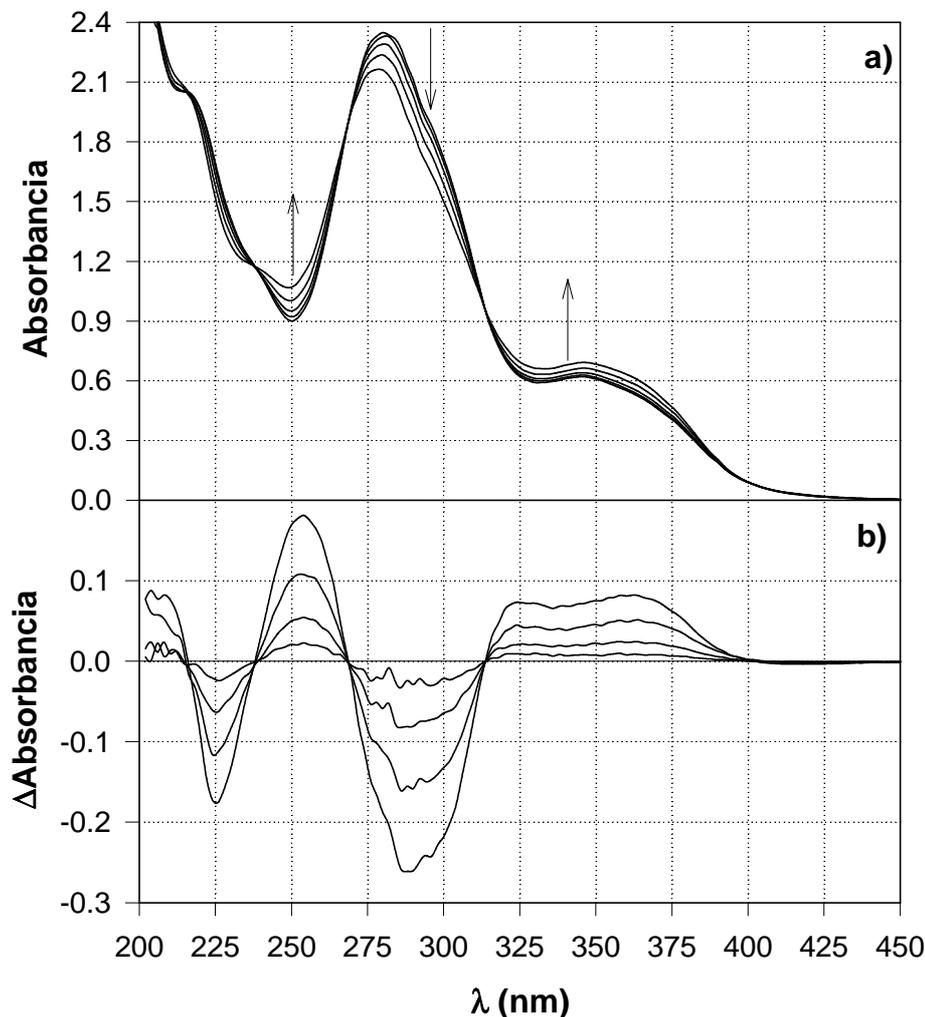


Figura 10.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes.

La presencia de 6-formilpterina en las soluciones irradiadas fue confirmada por los experimentos de HPLC. En la figura 10.4 pueden observarse los cromatogramas correspondientes a una solución de 6-formilpterina, una solución de ácido fólico no irradiada y otra irradiada durante 3 minutos.

Se realizaron monitoreos cromatográficos con soluciones irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Las áreas de los picos fueron integradas y transformadas a concentración empleando los coeficientes obtenidos en las correspondientes curvas de calibración.

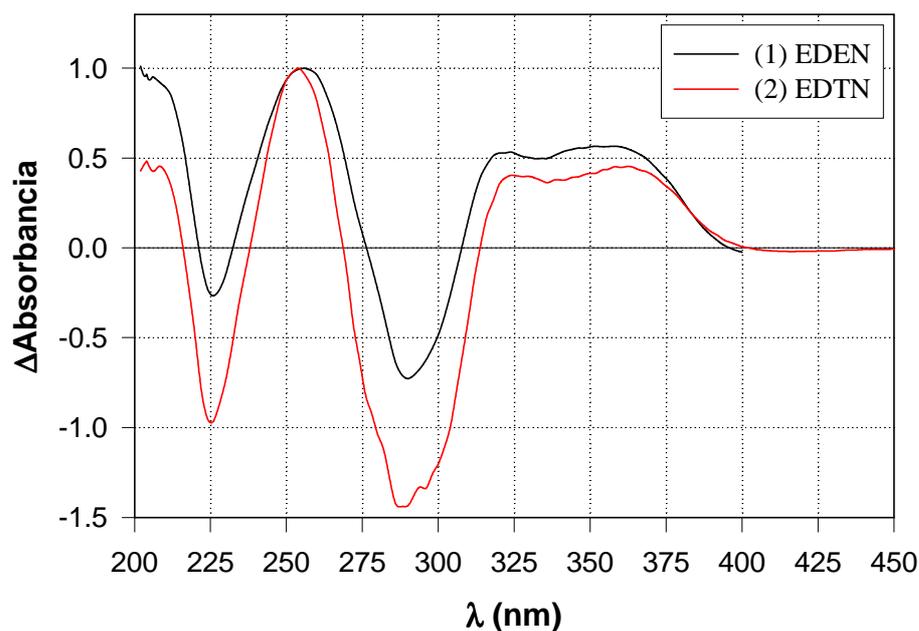


Figura 10.2. Comparación de espectros diferenciales normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 8 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución que contiene 6-formilpterina 100 μM y ácido *p*-aminobenzoilglutámico 100 μM y otra solución de ácido fólico de la misma concentración.

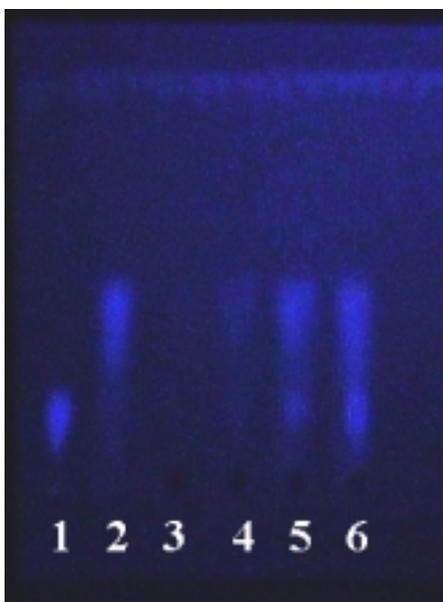


Figura 10.3. Corrida de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 150 μM ; 2, solución de 6-formilpterina 150 μM ; 3, solución de ácido fólico 450 μM ; calles 4, 5 y 6 solución de ácido fólico (450 μM , pH= 6,0) irradiada con luz de 350 nm; 2 min 6 min y 12 min respectivamente.

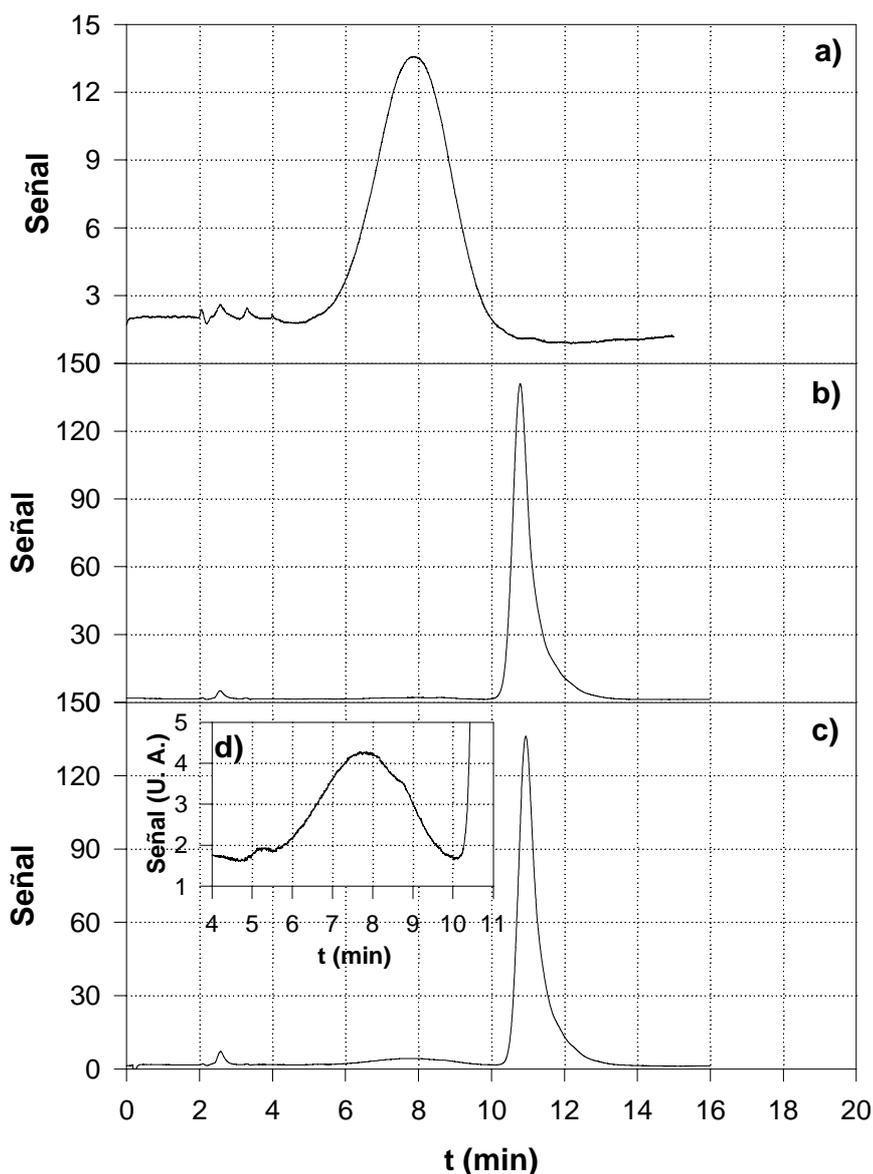


Figura 10.4. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de 6-formilpterina 150 μ M. b) Solución de ácido fólico 600 μ M. c) Solución de ácido fólico 600 μ M irradiada 3 min con luz UV-A de 350 nm. Para los tres cromatogramas la longitud de onda de análisis fue 340 nm. d) detalle del cromatograma c en la zona del pico de la 6-formilpterina.

La figura 10.5 muestra la evolución de las concentraciones de ácido fólico y 6-formilpterina. Puede observarse, en ambos casos, un comportamiento lineal. De las pendientes obtenidas a partir de las correspondientes regresiones lineales se obtuvieron las velocidades de consumo de ácido fólico ($-10,9 \pm 0,7 \mu\text{M}/\text{min}$) y de producción de 6-formilpterina ($10,6 \pm 0,3 \mu\text{M}/\text{min}$). Como este experimento se realizó en condiciones tales

que el ácido fólico absorbe toda la luz incidente, pueden calcularse directamente los rendimientos cuánticos. Los valores obtenidos en ambas curvas son iguales ($2,5 \times 10^{-2}$) dentro del error experimental, indicando que, en estas condiciones, existe una única vía de descomposición fotoquímica del ácido fólico que es su transformación a 6-formilpterina.

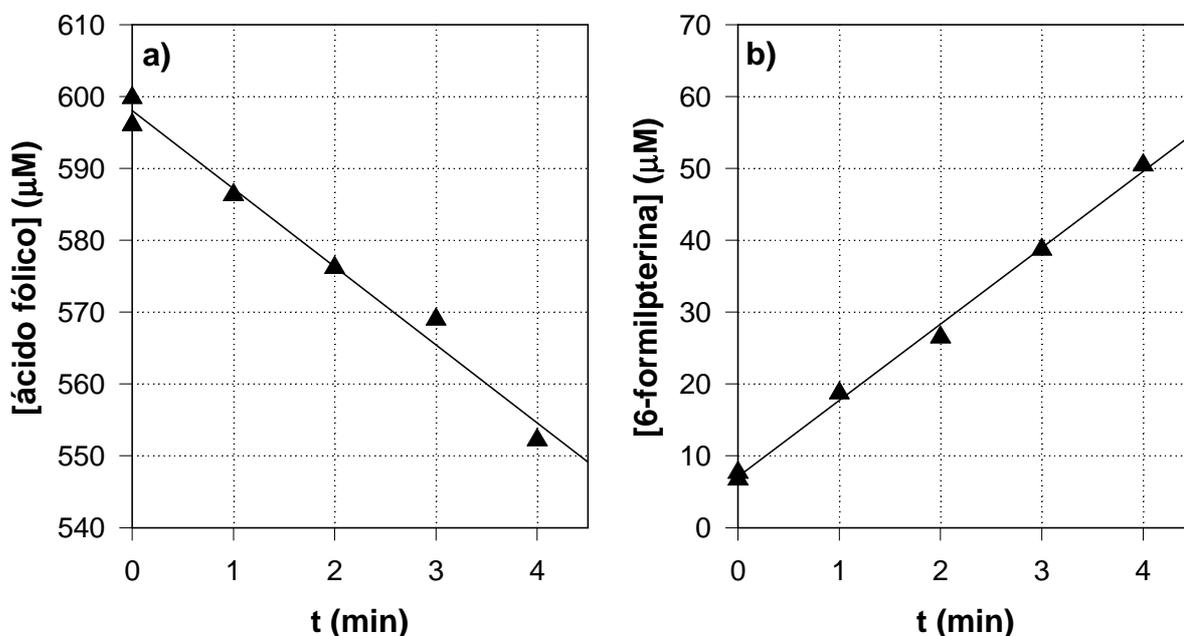


Figura 10.5. Evolución de las concentraciones de ácido fólico (a) y 6-formilpterina (b), determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 μM y pH= 6,0.

Como se aprecia en la figura 10.5.b la solución no irradiada de ácido fólico ($t=0$ min) contiene aproximadamente 7 μM de 6-formilpterina. Esta contaminación puede tener su origen en ciertas impurezas del sólido a partir del cual se preparan las soluciones o puede generarse en la solución ya preparada como consecuencia de la acción de la luz ambiental. Sin embargo, estas impurezas no interfieren en el análisis de los resultados ya que la luz absorbida por las mismas es menor al 2% de la luz absorbida por el ácido fólico.

Como se muestra en la figura 10.6.a, en las soluciones no irradiadas de ácido fólico también se detecta la presencia de trazas de 6-carboxipterina. Para investigar la evolución de este compuesto durante la fotólisis, se lo cuantificó en soluciones irradiadas durante distintos períodos. Estos resultados se muestran en la figura 10.6.b. Puede observarse que la concentración de 6-carboxipterina prácticamente no varía en los primeros 4 minutos de fotólisis que es el período de tiempo que se usó para realizar los cálculos de los rendimientos cuánticos presentados anteriormente. Esta observación tiene dos implicaciones que merecen

ser mencionadas. Como se explicará más adelante, la 6-carboxipterina es también fotosensible, por lo tanto, la no disminución de la concentración implica que la luz no actúa sobre la 6-carboxipterina por ser absorbida totalmente por el ácido fólico (condición buscada empleando concentraciones elevadas del mismo). Por otro lado, el hecho de que tampoco aumente significa que la luz tampoco fotoliza a la 6-formilpterina, la cual es a su vez, también fotosensible. Este último punto es de particular importancia ya que, como se explicará en la próxima sección, descarta la participación de la 6-formilpterina en la primera etapa de la fotólisis.

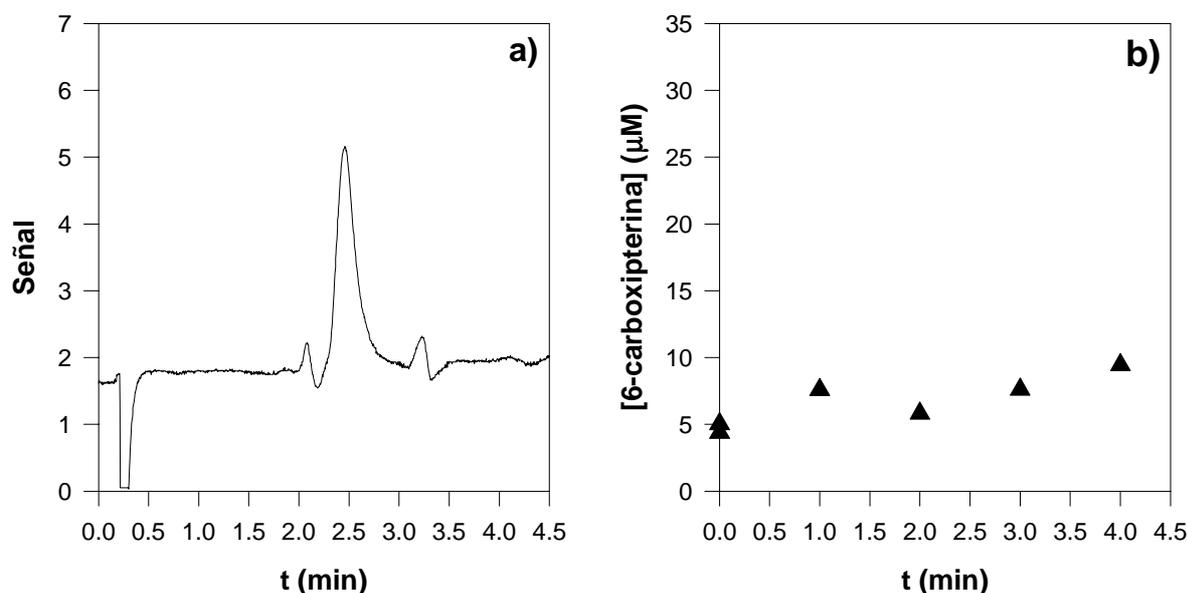


Figura 10.6. (a) Pico de 6-carboxipterina presente en el cromatograma de una solución de ácido fólico 600 μM no irradiada. La longitud de onda de análisis fue 340 nm (b) Evolución de la concentraciones de 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 μM y pH= 6,0.

Durante el período de análisis, se investigó también la presencia de ácido *p*-aminobenzoilglutámico en las soluciones irradiadas de ácido fólico. Como se mostró en el espectro de la figura 9.11, este compuesto, a diferencia de las pterinas, no absorbe luz a 340 nm, por lo cual, para realizar el cromatograma de la correspondiente solución patrón, se fijó la longitud de onda de análisis en 280 nm. Por otro lado, en las condiciones de corrida empleadas, los valores de t_R de este compuesto y de 6-carboxipterina son próximos entre sí. Debido a esto, en ensayos realizados con soluciones que contenían mezclas de ambos compuestos se observa que los dos picos salen parcialmente solapados.

Se realizaron corridas cromatográficas sobre las soluciones irradiadas empleando ambas longitudes de onda de análisis (280 y 340 nm). Como puede observarse en las figuras 10.7.a y 10.7.b los cromatogramas de soluciones irradiadas de ácido fólico presentan en los primeros 6 minutos de corrida 2 picos si la longitud de onda es 280 nm y un solo pico si la misma es de 340 nm. El t_R de este último pico coincide con el t_R del primer pico de los cromatogramas a 280 nm y con el t_R del patrón de 6-carboxipterina. Por otro lado, el segundo pico de los cromatogramas a 280 nm presenta un t_R similar al del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico (figura 10.7.c). Por último, la figura 10.7.d muestra la suma de los cromatogramas, a 280 nm, de los patrones de ambas sustancias. El análisis de estos resultados muestra que el ácido *p*-aminobenzoilglutámico, a diferencia de la 6-carboxipterina, se genera en los primeros minutos de la fotólisis del ácido fólico.

Para cuantificar el ácido *p*-aminobenzoilglutámico se realizó una curva de calibración a 280 nm empleando soluciones preparadas a partir de un patrón. Sin embargo, debido al solapamiento entre el pico de este compuesto con el de la 6-carboxipterina en los cromatogramas de las soluciones de ácido fólico irradiadas, el área del pico del primer compuesto no puede integrarse directamente. Para solucionar este problema se integraron ambos picos juntos y posteriormente se restó el área correspondiente a la 6-carboxipterina.

Para obtener el área de la 6-carboxipterina en los cromatogramas realizados con longitud de onda de análisis de 280 nm se procedió de la siguiente manera. Cada solución irradiada de ácido fólico se analizó a 280 y 340 nm. De los cromatogramas a 340 nm (el ácido *p*-aminobenzoilglutámico no aparece) se cuantificó la 6-carboxipterina usando una curva de calibración realizada a esa longitud de onda. Con la concentración obtenida de esta manera, se calculó el área del pico que le corresponde a dicho compuesto en los cromatogramas realizados a 280 nm, lo cual se realizó a partir de otra curva de calibración empleando esta longitud de onda de análisis.

En la figura 10.8 se muestra la evolución de la concentración de ácido *p*-aminobenzoilglutámico durante la fotólisis del ácido fólico. Aunque son pocos los puntos obtenidos en este experimento, se pueden realizar algunas consideraciones cuantitativas. Para los 3 primeros minutos se obtiene una pendiente de 12,5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Este valor, levemente mayor, es comparable a las velocidades de consumo de ácido fólico y de producción de 6-formilpterina (10,9 y 10,6 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). En este experimento se detectó un aumento de la concentración de 6-carboxipterina a los 3 minutos de irradiación, lo cual, como

se explicó anteriormente, indica que la 6-formilpterina se ha comenzado a fotolizar. Si no se tiene en cuenta este dato, se obtiene una pendiente de $11,0 \mu\text{M}/\text{min}$.

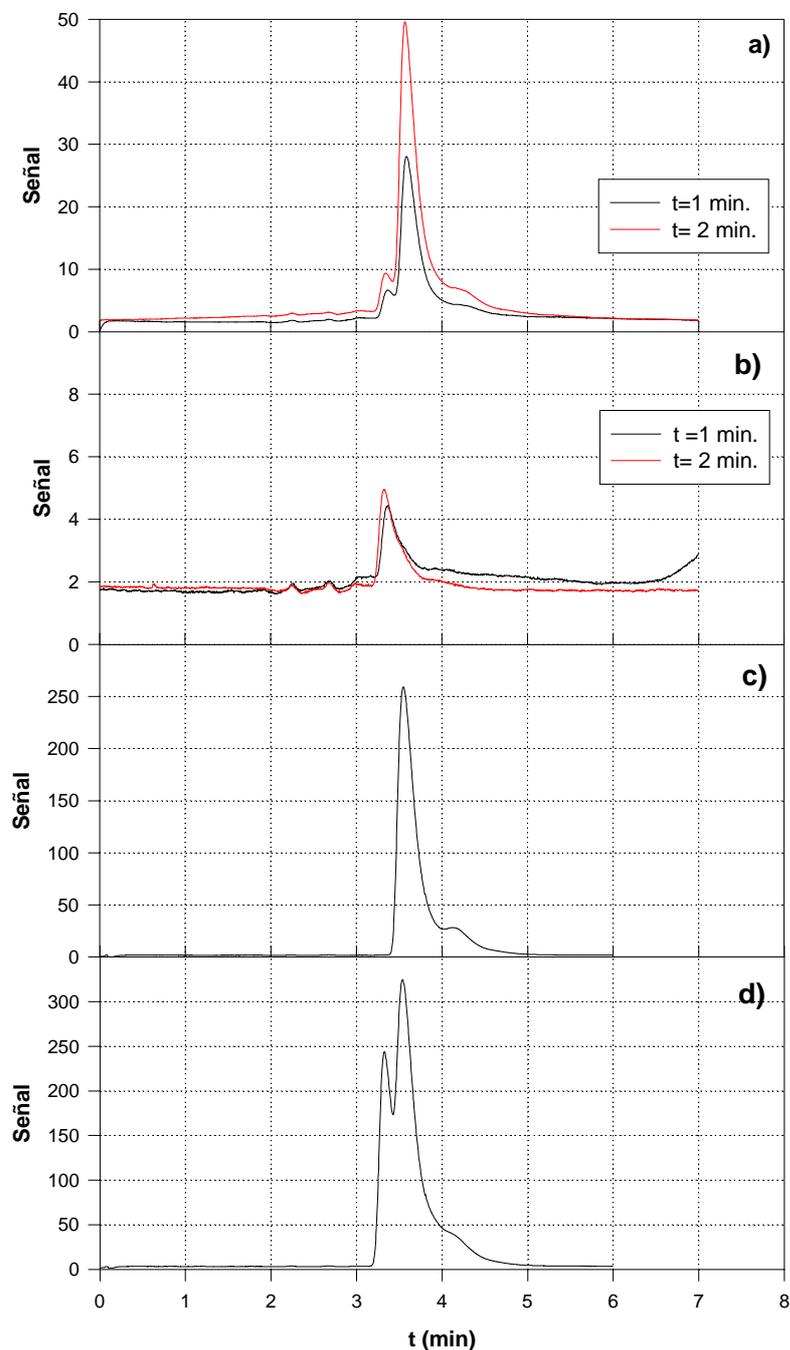


Figura 10.7. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de ácido fólico $700 \mu\text{M}$ ($\text{pH}= 5,9$) irradiada. λ de análisis= 280 nm . b) Solución de ácido fólico $700 \mu\text{M}$ ($\text{pH}= 5,9$) irradiada. λ de análisis= 340 nm . c) Solución de ácido *p*-aminobenzoilglutámico $200 \mu\text{M}$. λ de análisis= 280 nm . d). Suma de los cromatogramas de una solución de 6-carboxipterina $200 \mu\text{M}$ y de una solución de ácido *p*-aminobenzoilglutámico $200 \mu\text{M}$. λ de análisis= 280 nm .

Estos resultados permiten establecer una relación 1:1 entre el ácido fólico consumido durante los primeros minutos de la fotólisis y el ácido *p*-aminobenzoilglutámico producido. De la misma manera existe una relación 1:1 entre la formación de este compuesto y de 6-formilpterina.

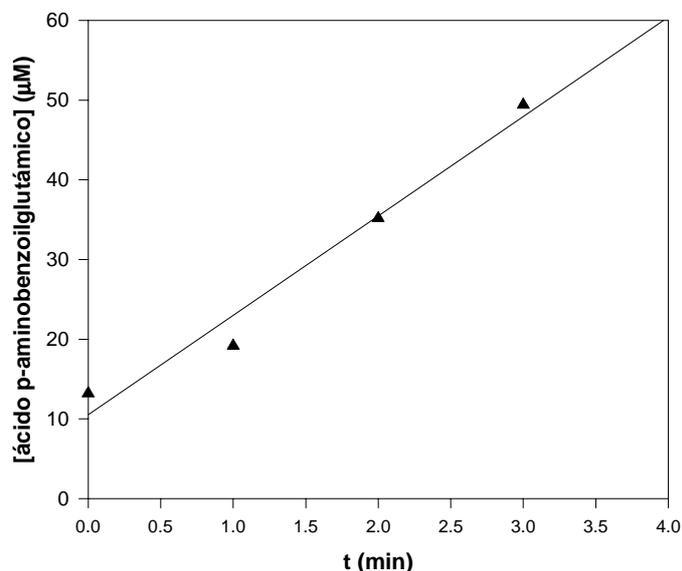


Figura 10.8. Evolución de la concentraciones de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 µM y pH= 6,0.

10.2. Segunda etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O₂.

El comportamiento de los distintos parámetros medidos, explicado en la sección anterior, cambia al avanzar la fotólisis de soluciones de ácido fólico. En la figura 10.9 puede observarse como, para tiempos de irradiación mayores que 8 minutos, los puntos isobésticos, mostrados en la figura 10.1, comienzan a variar.

Estas modificaciones en los espectros DE pueden atribuirse a la fotólisis de la 6-formilpterina para generar 6-carboxipterina. En esta etapa, la luz es absorbida tanto por el ácido fólico como por la 6-formilpterina y, por ende, ocurren las dos reacciones simultáneamente. Como muestra la figura 10.3, los experimentos de TLC ponen en evidencia la presencia de 6-carboxipterina en las soluciones irradiadas durante más de 5 minutos. Por otra parte, los experimentos de HPLC revelan el mismo tipo de resultados. En efecto, luego de los primeros 5 minutos de irradiación el pico correspondiente a dicha sustancia aumenta

considerablemente. En la figura 10.10 se muestra un cromatograma obtenido a los 16 minutos de irradiación, en el cual puede observarse la presencia de una cantidad importante de 6-carboxipterina en la solución irradiada. Compárese con los cromatogramas de la figura 10.4 en los que este pico es despreciable frente al del ácido fólico.

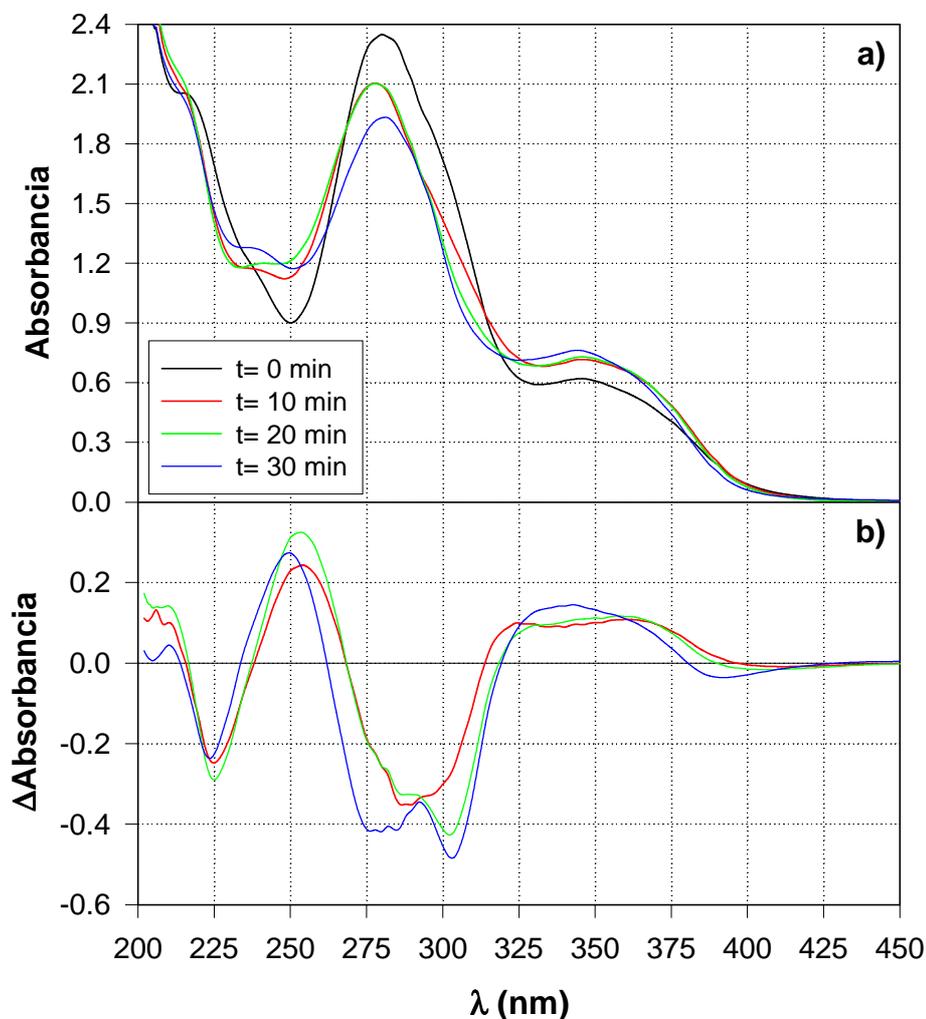


Figura 10.9. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O_2 . Este experimento es el mismo que el de la figura 10.1, pero se muestran los espectros obtenidos a mayores tiempos de irradiación. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes a los espectros absolutos de a).

Como se verá más adelante, en ciertas condiciones experimentales, las soluciones irradiadas muestran procesos térmicos lo suficientemente lentos como para ser estudiados por espectrofotometría y aún, en ciertas circunstancias, por HPLC. Para determinar si en las

presentes condiciones experimentales existe este tipo de procesos, se realizaron algunos experimentos en los cuales se dejaron reposar en la oscuridad soluciones de ácido fólico previamente irradiadas. A intervalos regulares de tiempo, tomados a partir del momento de interrumpir la irradiación, se registraron los espectros de absorción de dichas soluciones. En ninguna de las pruebas realizadas se detectaron cambios espectrales significativos producidos en la oscuridad luego de la fotólisis. En la figura 10.11.a se muestran los resultados de uno de los experimentos realizados en este sentido.

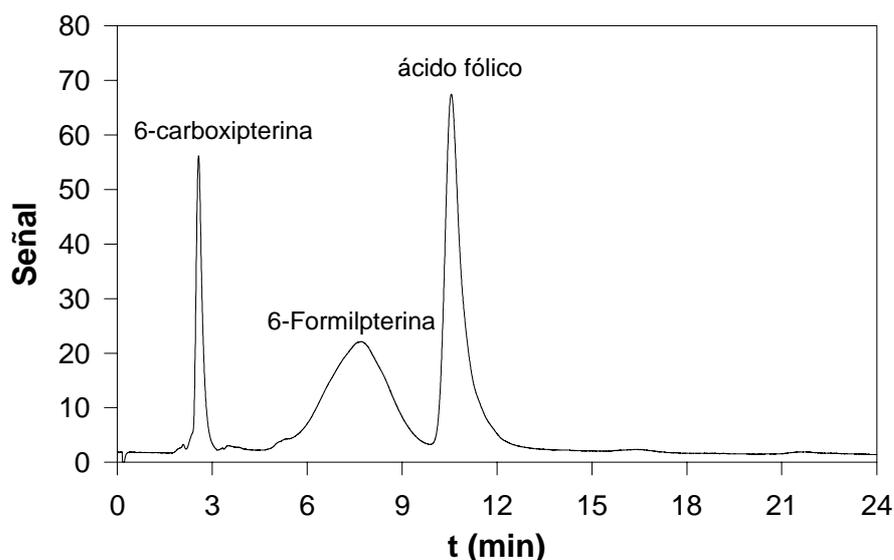


Figura 10.10. Cromatograma de una solución de ácido fólico (600 μ M, pH=6,0) irradiada durante 16 minutos con luz UV-A de 350 nm.

Mezclas de ácido fólico y 6-formilpterina fueron dejadas en la oscuridad varios días y se compararon los espectros de absorción a distintos tiempos a partir de la preparación. En ningún caso se observaron variaciones espectrales. Además el espectro de las soluciones mezclas siempre pudo ser reproducido a partir de los espectros de las soluciones de ambos componentes por separado. Estos resultados, junto con los anteriores, permiten inferir que no existe reacción térmica que involucre a estas dos sustancias. Este punto es muy importante para entender el fenómeno que se describirá, en esta misma sección, en las próximas páginas.

Tal como será explicado más adelante, existe un fotoproducto proveniente de la fotodescomposición del ácido fólico en medio alcalino que pudo ser aislado, bajo ciertas condiciones, pero que se descompone rápidamente en soluciones fuertemente alcalinas (pH>12). Este producto puede ser detectado, tanto por HPLC como por TLC, con t_R y R_f

característicos. La aplicación de estas dos técnicas a las soluciones de ácido fólico irradiadas en medio ácido no revela la presencia del citado producto. Sin embargo, para descartar definitivamente su presencia, se realizó un experimento más. Se tomó una solución irradiada a pH 6,0, mediante el agregado de solución de NaOH se la llevó a pH 12, se la dejó 30 minutos y, por último, se volvió, con el agregado de solución de HCl, al pH original. Tanto en el agregado de la base como en el del ácido los volúmenes empleados fueron muy pequeños, de tal manera de no modificar el espectro de absorción por efecto de la dilución. Si hubiera estado presente el fotoproducto en cuestión se hubiera observado un cambio neto del espectro por su transformación térmica a otra sustancia, pero esto no tiene lugar.

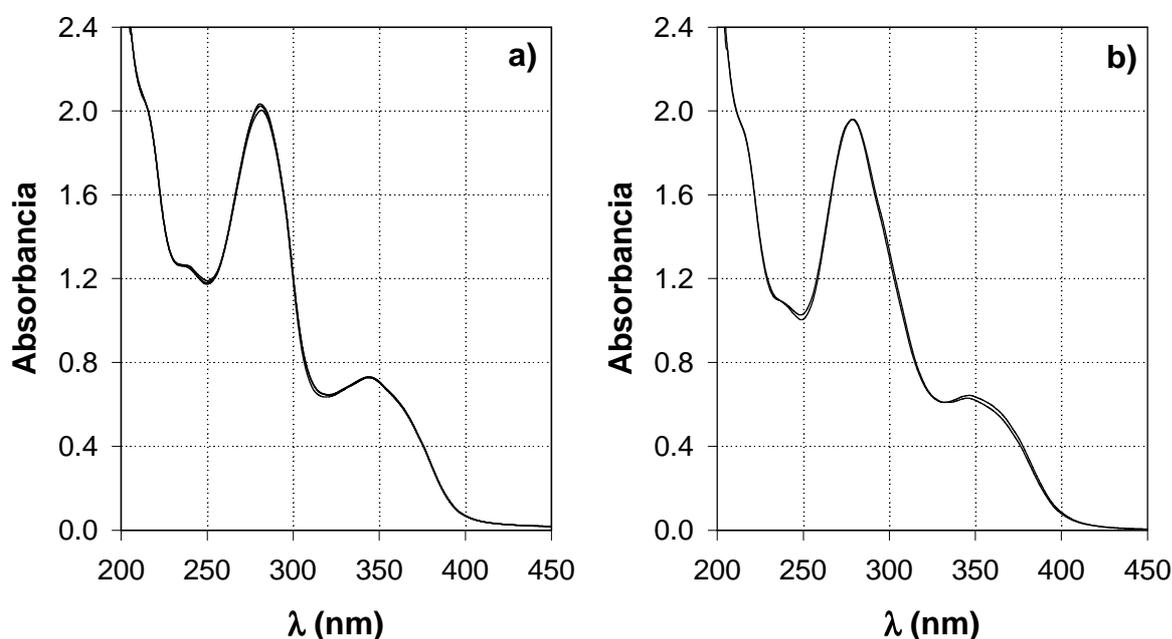


Figura 10.11. a) Espectros de absorción de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 6,0) irradiada en presencia de O₂ durante 40 min y luego dejada en la oscuridad. Los tiempos a los cuales corresponden los espectros son: 0 min (inmediatamente después de interrumpir la iluminación), 25, 50 y 90 min. **b)** Espectros de una solución irradiada y otra irradiada, alcalinizada y vuelta a acidificar al pH original (ver explicación del texto). Para los experimentos correspondientes a las dos figuras los caminos ópticos para la irradiación y la observación son 1 y 0,2 cm, respectivamente.

Se cuantificaron simultáneamente por HPLC ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación. Se observan aumentos en la velocidad de consumo del ácido fólico y en la velocidad de generación de 6-formilpterina luego de los

primeros 4 a 5 minutos de fotólisis. Estos resultados se muestran en la figura 10.12 que corresponde al mismo experimento de la figura 10.5. Obsérvese que el inicio de este efecto coincide temporalmente con un aumento en la concentración de 6-carboxipterina; es decir, con el comienzo de la etapa en la cual la 6-formilpterina absorbe una cantidad no despreciable de luz y su transformación a 6-carboxipterina se pone en evidencia. Estas observaciones sugieren que la 6-formilpterina excitada por la absorción de la luz, acelera, mediante algún mecanismo, su generación a partir del ácido fólico.

Puede apreciarse además que durante los primeros 14 minutos de fotólisis la suma de las concentraciones de las tres sustancias analizadas permanece constante. Por lo tanto, durante este período no hay otras reacciones diferentes a las ya mencionadas.

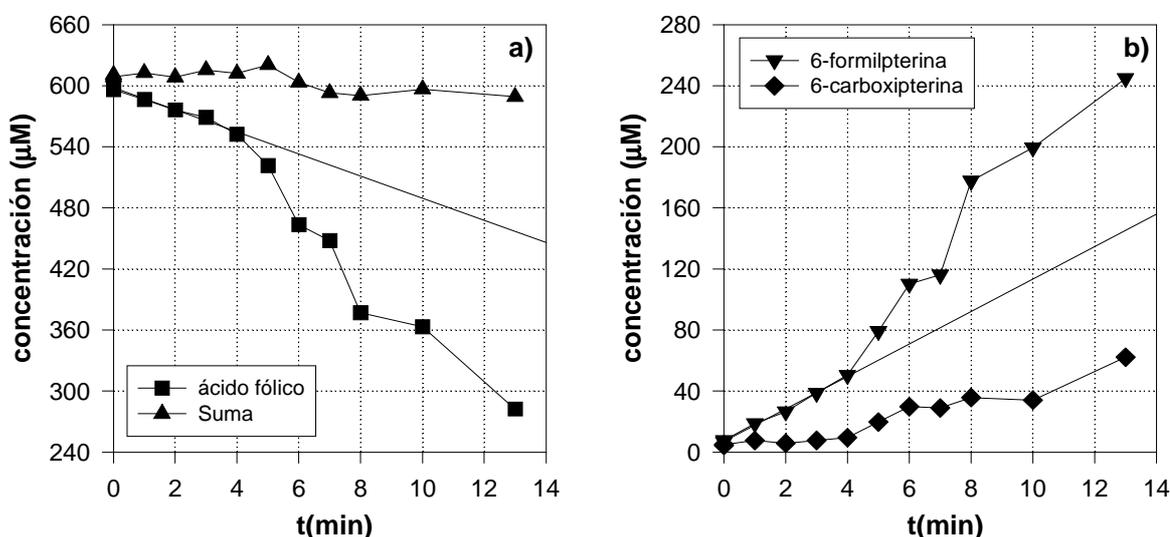


Figura 10.12. a) Evolución en el tiempo de la concentración del ácido fólico durante la fotólisis. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 10.5.a. Se observa también la suma de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. b) Evolución con el tiempo de irradiación de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 10.5.b.

En la figura 10.13 se muestran los resultados de un experimento completo. Puede observarse que la velocidad de consumo del ácido fólico disminuye luego de los 15 minutos de irradiación. Esto puede explicarse porque la cantidad de luz absorbida por el mismo ha disminuido mucho en esta etapa. La competencia entre las velocidades de producción y consumo de 6-formilpterina hace que su concentración pase por un máximo a los 12 minutos

aproximadamente y luego comience disminuir. La 6-carboxipterina, por su parte, aumenta a lo largo de todo el experimento. La suma de las concentraciones de las tres especies disminuye suavemente, sobre todo después de los 20 minutos. Esto obedece a que la 6-carboxipterina, a su vez, se fotoliza, pero sobre esto se hablará más adelante.

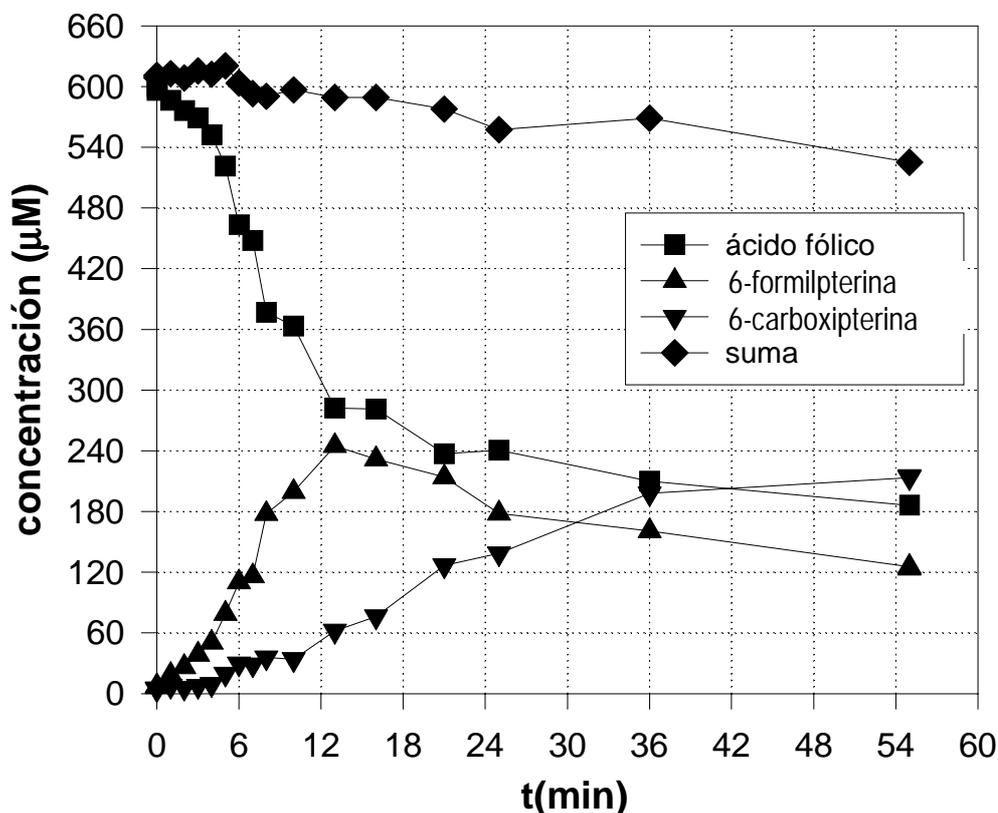


Figura 10.13. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante 55 minutos de fotólisis de una solución de ácido fólico 600 M y pH= 6,0.

Para corroborar la existencia del fenómeno de aumento de la velocidad de descomposición del ácido fólico por la presencia de 6-formilpterina se realizó otro experimento en el cual se partió de una mezcla de ambas sustancias. Se irradió una solución que contenía 43 μM de ácido fólico y 53 μM de 6-formilpterina. Puede calcularse la cantidad de luz incidente que absorbe cada compuesto inicialmente teniendo en cuenta los respectivos ϵ a 350 nm, las concentraciones y la cantidad total de luz incidente.

$$I_a^{AF} = \frac{\epsilon_{350}^{AF} \cdot [AF]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_a \quad (1) \quad I_a^{FPT} = \frac{\epsilon_{350}^{FPT} \cdot [FPT]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_a \quad (2)$$

en estas ecuaciones AF representa al ácido fólico y FPT a la 6-formilpterina, I_a^i es la intensidad de luz absorbida por el componente i e I_a es la intensidad de luz absorbida total ($\sum I_a^i$).

Considerando despreciable la luz absorbida inicialmente por la 6-carboxipterina, puede calcularse I_a a partir de la absorbancia del ácido fólico (A^{AF}) y la absorbancia de la 6-formilpterina (A^{FPT}).

$$A^{AF} = \epsilon_{350}^{AF} \cdot l \cdot [AF] = 6.757 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 4,29 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0.230$$

$$A^{FPT} = \epsilon_{350}^{FPT} \cdot l \cdot [FPT] = 9.779 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0.517$$

La absorbancia total de la solución (A^T) será:

$$A^T = A^{AF} + A^{FPT} = 0.230 + 0.517 = 0.747$$

La ecuación que relaciona I_a , con A^T y la intensidad de luz incidente (I_o) es la siguiente.

$$I_a = I_o^v \cdot (1 - 10^{-A^T}) \quad (3)$$

En la parte experimental se detalló como se midió I_o^v . Las intensidades de luz tienen unidades de moles de fotones por litro de solución y por minuto (M/min).

$$I_a = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min} \cdot (1 - 10^{-0.747}) = 3,5 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Con este valor pueden calcularse I_a^{AF} y I_a^{FPT} iniciales, es decir en el momento de iniciar la irradiación, a partir de las ecuaciones (1) y (2).

$$I_a^{AF} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ M/min} \quad I_a^{FPT} = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Nótese que en este caso el ácido fólico absorbe sólo una baja proporción de la luz incidente (26%), a diferencia de los experimentos descritos anteriormente en los cuales se partía de una absorción de más del 99%. La 6-formilpterina, por su parte, absorbe una proporción mucho mayor (56%). De esta manera, se parte de una situación en la cual ambas sustancias son excitadas por la irradiación. En la figura 10.13 se muestran los resultados de este experimento y puede observarse la evolución de las concentraciones con el tiempo de irradiación.

Puede calcularse la velocidad inicial de conversión de ácido fólico a 6-formilpterina ($v_o^{AF \rightarrow FPT}$) en estas condiciones, teniendo en cuenta el valor de I_a^{AF} y el rendimiento cuántico calculado en la sección anterior (Φ_{AF}).

$$v_o^{AF \rightarrow FPT} = \Phi_{AF} \cdot I_a^{AF}$$

$$v_o^{AF \rightarrow FPT} = 2,53 \times 10^{-2} \cdot 1,1 \times 10^{-4} \text{ M/min} = 2,8 \text{ } \mu\text{M/min.}$$

No obstante, es necesario aclarar que, como se explicará más adelante, Φ_{AF} es fuertemente dependiente de la concentración de ácido fólico, disminuyendo al disminuir la misma. Por consiguiente, un valor mucho menor es estimado para la concentración empleada en este experimento. De esta manera, la velocidad de formación de la 6-formilpterina desencadenada por la excitación del ácido fólico sería mucho menor que la calculada anteriormente.

Sin embargo la velocidad de desaparición de ácido fólico, como puede observarse a simple vista en el gráfico de la figura 10.14 es mucho mayor, incluso, que la velocidad calculada con el Φ_{AF} correspondiente a 600 μM . En efecto, durante el primer minuto de fotólisis se produce un consumo de 20,0 μM . Estos resultados muestran que debe existir algún proceso que acelere esta reacción y que en el mecanismo de dicho proceso debe intervenir la 6-formilpterina. Además puede observarse que la suma de las tres concentraciones se mantiene constante en todo el transcurso del experimento indicando que sólo se producen las dos reacciones consideradas. Esto descarta el consumo de ácido fólico por otras vías que generen fotoproductos distintos a 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

Otro grupo de experimentos también mostró la aceleración en la velocidad de la reacción de transformación de ácido fólico a 6-formilpterina. Fue el realizado midiendo la cantidad total de derivado aldehídicos con la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. En la figura 10.15 se aprecian los resultados de un experimento llevando a cabo la mencionada prueba sobre soluciones irradiadas de ácido fólico durante distintos tiempos. Esta curva representa la evolución de la concentración de 6-formilpterina. Si bien, esta determinación presenta una dispersión experimental importante de los datos y fue realizada con una geometría distinta a los experimentos anteriormente mostrados en este capítulo, puede observarse el mismo comportamiento global que ya ha sido analizado (compárese con la evolución de la concentración de 6-formilpterina en la figura 10.13). Es decir, un aumento considerable de la velocidad luego de los primeros minutos de irradiación, alcance de un máximo luego de los 10 minutos y luego una disminución de la concentración.

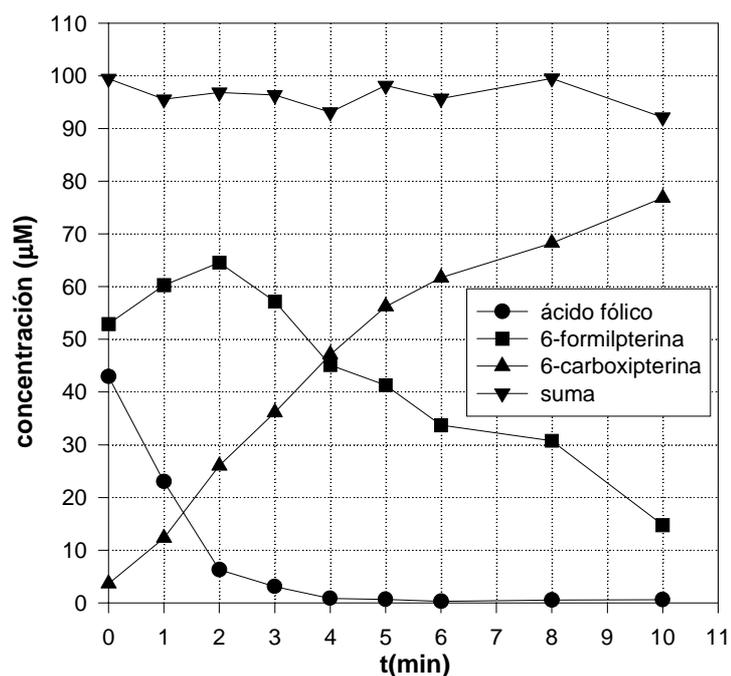


Figura 10.14. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado partiendo de una solución mezcla (pH= 6,0) que contenía 43 μM de ácido fólico y 53 μM de 6-formilpterina.

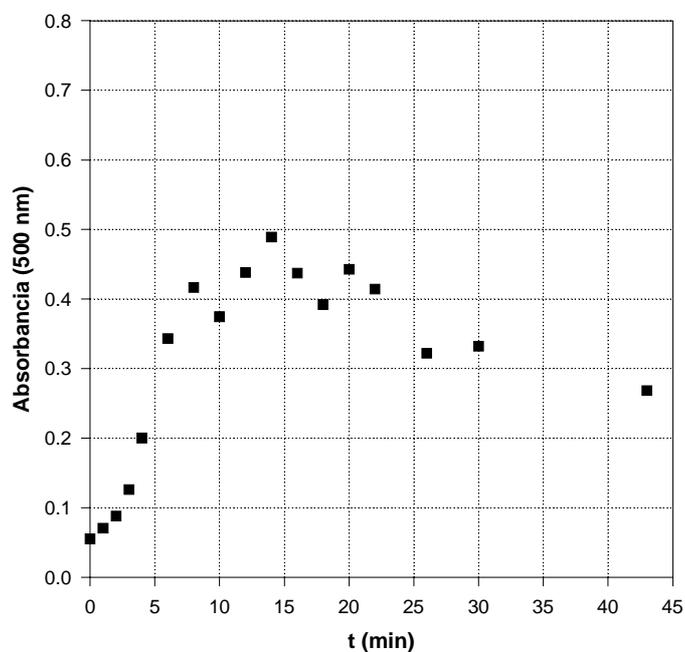


Figura 10.15. Determinación de aldehídos en una solución de ácido fólico (450 μM , pH=6,0) irradiada con luz UV-A. La concentración de aldehídos es proporcional a la absorbancia de la solución a 500 nm, luego de la reacción colorimétrica con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

10.3. Papel del O₂ en la fotólisis del ácido fólico.

La conversión de ácido fólico a 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico implica una oxidación en el átomo C-6 de la estructura pterínica. Para determinar si el O₂ disuelto en la solución participa en esta fotooxidación, se realizaron medidas de la concentración de dicho gas, con el correspondiente electrodo selectivo, durante la fotólisis de soluciones aireadas. Puede observarse claramente en la figura 10.16 que existe un importante consumo de O₂ durante la fotólisis.

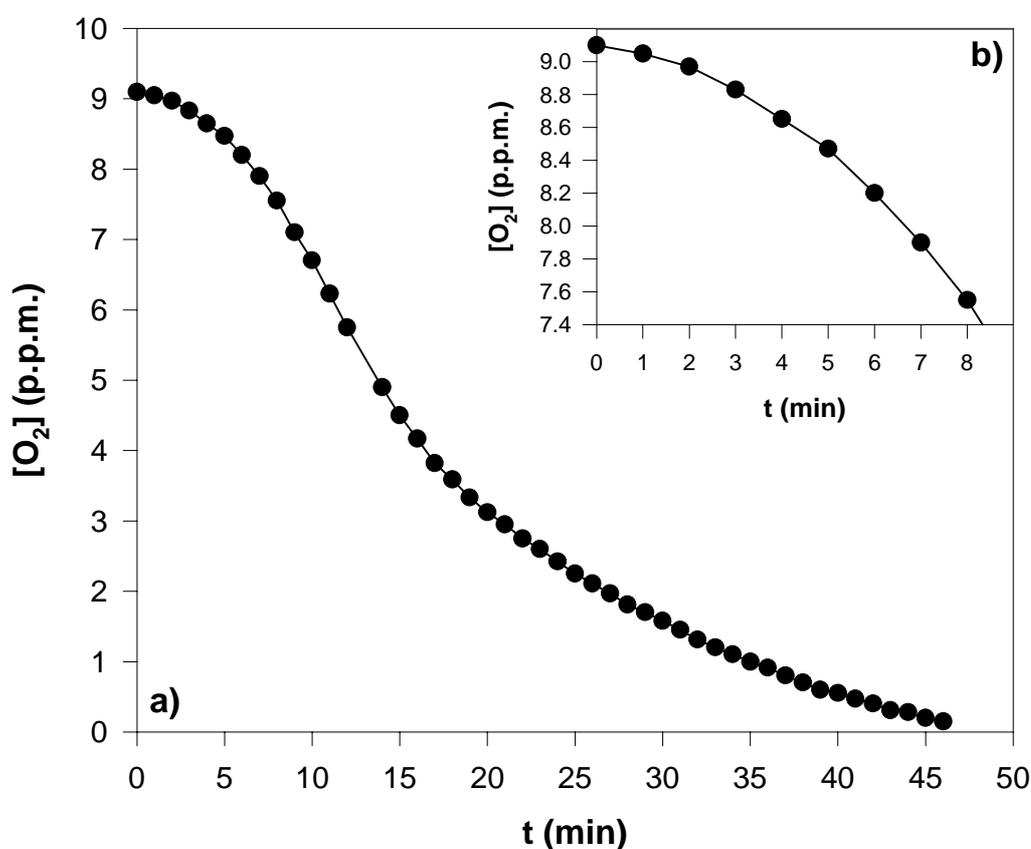


Figura 10.16. Evolución de la concentración de O₂ durante la irradiación de una solución de ácido fólico 156 μM. b) Detalle de los primeros 9 minutos de fotólisis.

Como se mencionó en la parte experimental, estas medidas no son directamente comparables con las de las fotólisis realizadas en celdas de cuarzo por ser distinta la geometría. Sin embargo, puede apreciarse una aceleración en el consumo de O₂ ya en los primeros minutos. Debido a que este experimento está realizado con una concentración inicial

de ácido fólico relativamente baja, esta observación puede atribuirse a la pronta aparición del efecto acelerador de la 6-formilpterina y a su propia fotólisis que, como se demostrará en el próximo capítulo, también consume O_2 .

Como ya ha sido mencionado, en muchas reacciones fotoquímicas en las que participa el O_2 disuelto en el medio como oxidante, la especie reactiva es el oxígeno singlete (1O_2). Para averiguar si esta especie participa en el mecanismo de la reacción estudiada en este capítulo, se realizaron experimentos empleando alcohol furfurílico como “secuestrador selectivo” de 1O_2 (la metodología fue descrita en la sección 7.6.2). A continuación se presentan los resultados de tales pruebas.

Se preparó una solución que contenía ácido fólico $573 \mu M$ (pH=6,0) y alcohol furfurílico 10 mM. Se realizó una fotólisis en la forma habitual y se analizaron las soluciones irradiadas con el HPLC. Es importante mencionar que, excepto por la presencia del secuestrador selectivo de 1O_2 , este experimento está realizado en las mismas condiciones que los experimentos descritos en las secciones anteriores (ver figuras 10.5, 10.12 y 10.13). En la figura 10.17.a se muestra la evolución de la concentración del ácido fólico durante este experimento y se la compara con la obtenida en el experimento descrito en la figura 10.12. Puede observarse que el consumo de ácido fólico es mucho menor en el experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico. En los primeros 4 minutos de fotólisis, por ejemplo, la disminución de la concentración es imperceptible en este experimento, mientras que en el realizado en ausencia de alcohol furfurílico se produce una reducción de un 7,6%. Si se hace la comparación a los 10 minutos tenemos que para el primer experimento se produce una disminución del 5,4%, mientras que en el segundo la merma alcanza el 39.3%. La figura 10.17.b muestra el escaso aumento en la concentración de 6-formilpterina que se produjo durante la fotólisis.

Estos resultados sugieren que el 1O_2 es un intermediario fundamental para la reacción. Es decir, que el ácido fólico, excitado electrónicamente por la absorción de luz, transfiere parcialmente su energía al O_2 disuelto generando la especie excitada 1O_2 , la cual ataca la molécula de ácido fólico provocando su escisión y oxidación. Esta última etapa, por supuesto, no requiere luz para llevarse a cabo.

Se realizaron, por último, experimentos para investigar si en el efecto acelerador de la 6-formilpterina sobre la descomposición del ácido fólico, descrito en la sección anterior, también interviene el 1O_2 . Para ello se preparó e irradió una mezcla de ácido fólico ($41 \mu M$),

6-formilpterina ($35 \mu\text{M}$) y alcohol furfurílico (10 mM). Una vez más y con fines comparativos, se respetaron las condiciones experimentales empleadas en las fotólisis realizadas en ausencia de alcohol furfurílico, excepto la concentración de 6-formilpterina que es un poco menor. En la figura 10.18 puede observarse que, en este experimento, el consumo de ácido fólico es muy pequeño. En efecto, en 10 minutos de irradiación la concentración sólo disminuyó un 3,5%. En el experimento homólogo, realizado en ausencia del secuestrador selectivo (figura 10.14) se observa una reducción en la concentración del 85%, ya a los 2 minutos y, a los 10 minutos, asciende casi al 99%. Puede concluirse que la 6-formilpterina no ejerce ningún efecto sobre el ácido fólico en ausencia de O_2 o, dicho de otra manera, este compuesto es fotoestable en ausencia de O_2 , aún en soluciones que contienen cantidades considerables de 6-formilpterina.

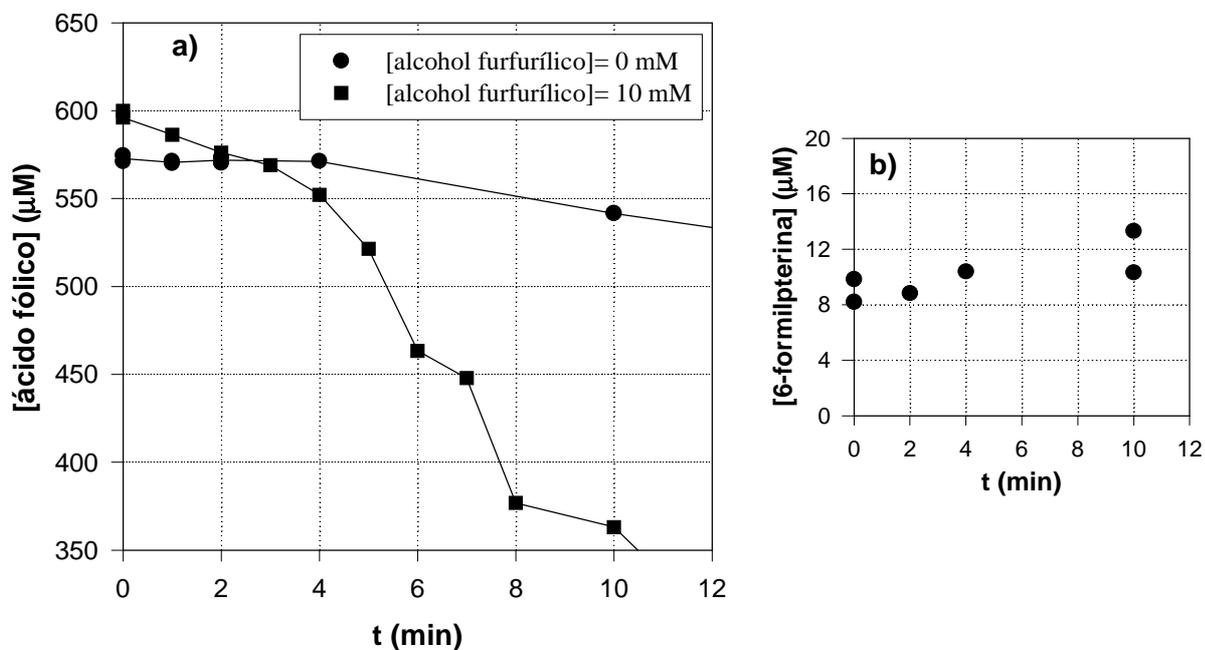


Figura 10.17. a) Comparación de la evolución de la concentración de ácido fólico en un experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico (10 mM) con la de otro realizado en ausencia de alcohol furfurílico. Ambas fotólisis se llevaron a cabo en similares condiciones ($\text{pH}=6,0$) b) Evolución de la concentración de 6-formilpterina durante la fotólisis de una solución de ácido fólico $570 \mu\text{M}$ ($\text{pH}=6,0$) en presencia de alcohol furfurílico (10 mM).

Las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación también fueron obtenidas en este experimento. Sin embargo, estos resultados se mostrarán y analizarán en el capítulo siguiente; en el cual se evaluará el papel del $^1\text{O}_2$ en la

conversión fotoquímica de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina. Basta con decir aquí que, en concordancia con lo expuesto en el párrafo anterior, en este experimento no se observó un aumento inicial de la concentración de 6-formilpterina (proveniente del ácido fólico), tal como se había observado en el correspondiente experimento en ausencia de alcohol furfurílico (figura 10.14).

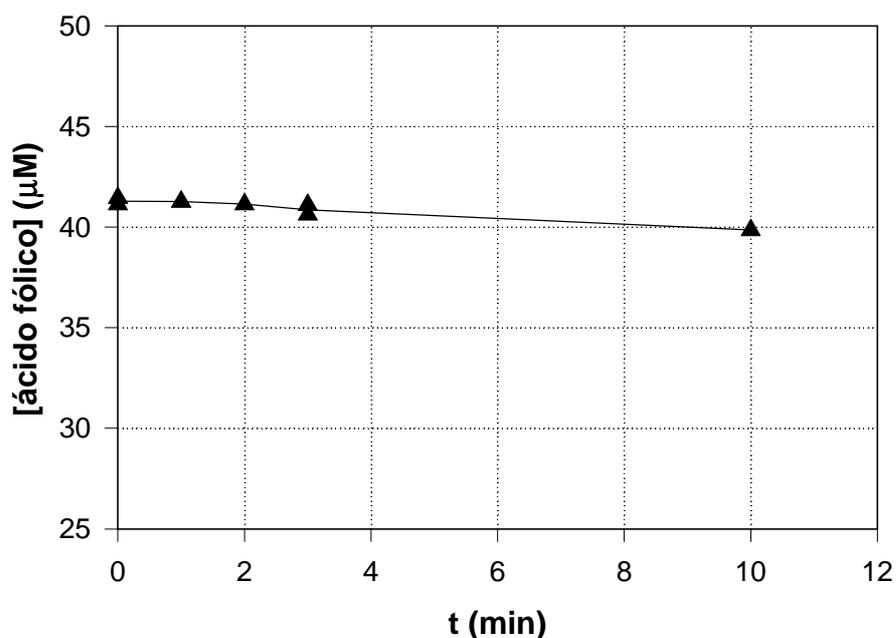


Figura 10.18. Evolución de la concentración de ácido fólico, determinadas por HPLC, durante la irradiación de una solución (pH= 6,0) que contenía 42 µM de ácido fólico, 35 µM de 6-formilpterina y 10 mM de alcohol furfurílico.

Las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación también fueron obtenidas. Sin embargo, estos resultados se mostrarán y analizarán en el capítulo siguiente; en el cual se evaluará el papel del $^1\text{O}_2$ en la conversión fotoquímica de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina. Basta con decir aquí que, en concordancia con lo expuesto en el párrafo anterior, en este experimento no se observó un aumento inicial de la concentración de 6-formilpterina (proveniente del ácido fólico), tal como se había observado en el correspondiente experimento en ausencia de alcohol furfurílico (figura 10.15).

Estos resultados sugieren fuertemente que el $^1\text{O}_2$ interviene en el efecto acelerador de la 6-formilpterina. Puede postularse una hipótesis razonable para explicar este fenómeno: la 6-formilpterina fotoexcitada genera $^1\text{O}_2$, el cual posteriormente reacciona con el ácido fólico. Es

decir que el aumento en la velocidad de consumo del ácido fólico cuando en la solución está presente la 6-formilpterina se debe a un aumento en la concentración en el medio del $^1\text{O}_2$.

Esta hipótesis es reforzada por los resultados obtenidos en las medidas de $^1\text{O}_2$ realizadas en soluciones de ácido fólico y 6-formilpterina disueltos en D_2O (ver detalles experimentales expuestos en la sección 8.3). Ambos compuestos generan $^1\text{O}_2$, sin embargo, los rendimientos cuánticos (Φ_Δ) son muy diferentes. En efecto, en experimentos realizados a pD igual a 6,4, mientras que para el ácido fólico se obtuvo un valor de sólo 0,06, para la 6-formilpterina se obtuvo un valor de 0,33. En la figura 10.19 se muestran las señales registradas para el ácido fólico junto con las respectivas señales producidas por una solución de fenalenona, la cual fue usada como referencia. Para cada compuesto existen dos señales que corresponden a dos amplificaciones diferentes. Las señales del ácido fólico presentan un ruido superior al de las de la fenalenona debido a que, por ser las mismas muy débiles, fueron registradas con una sensibilidad diez veces mayor. Por esta razón, el valor de Φ_Δ obtenido para el ácido fólico presenta un error relativo importante. En la figura 10.20, por su parte, pueden observarse las señales obtenidas con una solución en D_2O de 6-formilpterina y las de su correspondiente referencia.

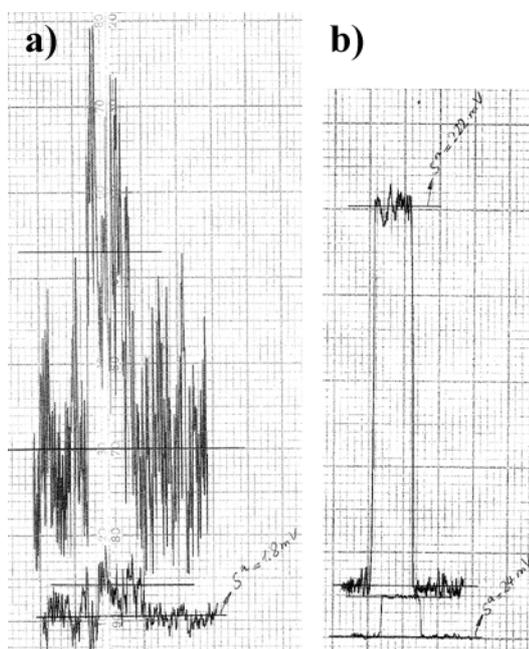


Figura 10.19. Determinación del Φ_Δ del ácido fólico. Experimento realizado en D_2O (pD= 6,4).
 a) Señales de la solución de ácido fólico. b) Señales de la solución de fenalenona.

Estos resultados implican que, cuando la cantidad de luz absorbida por la

6-formilpterina deja de ser despreciable, este compuesto se transforma en otra fuente de $^1\text{O}_2$. Debido a que el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ del ácido fólico es mucho menor que el de la 6-formilpterina y que el coeficiente de extinción molar de ambos compuestos es comparable a 350 nm ($6.757 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $9.779 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente), la concentración de $^1\text{O}_2$ debe aumentar en el seno de la solución irradiada en esta etapa. Esto tendría que provocar, un incremento en la velocidad de descomposición del ácido fólico, si el intermediario fuera esta especie excitada. Además, al avanzar la fotólisis y las moléculas de ácido fólico ser reemplazadas por moléculas de 6-formilpterina este efecto debería aumentar. Como se ha mostrado en los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, esto es justamente lo que se observa luego de los 4 a 5 primeros minutos de irradiación.

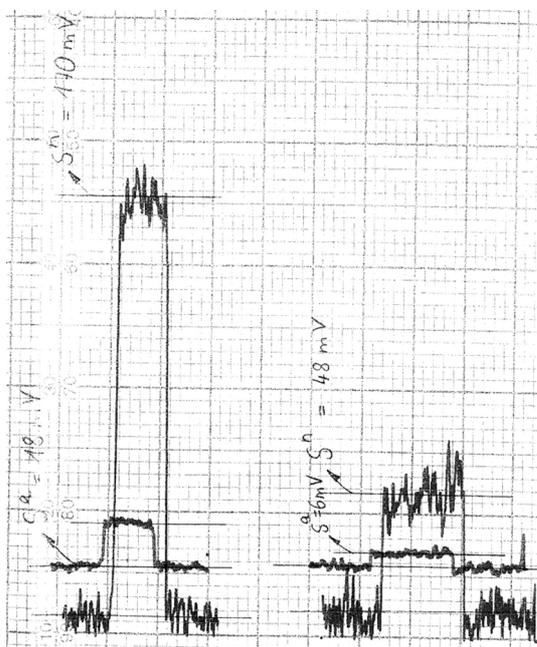


Figura 10.20. Determinación del Φ_{Δ} de la 6-formilpterina. Experimento realizado en D_2O ($\text{pD}=6,4$). Las señales de la izquierda corresponden a una solución de fenalenona, mientras que las de la derecha corresponden a una solución de 6-formilpterina.

Asimismo, el mecanismo propuesto involucrando al $^1\text{O}_2$ como intermediario, implica que el ácido fólico es, a la vez, sensibilizador y sustrato, de acuerdo a las definiciones dadas en la sección 4.4. Además, el rendimiento cuántico de consumo de ácido fólico (Φ_{AF}) en la primera etapa de la fotólisis viene dado por la ecuación (4) deducida en dicha sección. En la segunda etapa comienza a actuar la 6-formilpterina como otro sensibilizador.

El valor de Φ_{AF} reportado en la sección anterior corresponde a una concentración de

ácido fólico de 600 μM y la constante cinética de desactivación del $^1\text{O}_2$ en H_2O (k_d) es de $2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Gorman y Rodgers, 1989). Introduciendo estos datos, juntamente con el valor de Φ_Δ del ácido fólico, en la mencionada ecuación puede obtenerse una estimación de la constante de velocidad para la reacción bimolecular entre el ácido fólico y el $^1\text{O}_2$ (k_s).

$$\Phi_P = \Phi_\Delta \cdot \frac{k_s \cdot [\text{S}]}{k_s \cdot [\text{S}] + k_d} \Rightarrow 2,53 \times 10^{-2} = 0,06 \cdot \frac{k_s \cdot 6,0 \times 10^{-4} \text{ M}}{k_s \cdot 6,0 \times 10^{-4} \text{ M} + 2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}}$$

Este cálculo permite estimar un valor de $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para k_s , el cual está en el orden de otras constantes cinéticas bimoleculares de reacción entre el $^1\text{O}_2$ y compuestos heterocíclicos biológicos tales como los aminoácidos histidina ($4,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y triptofano ($5,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Foote y Clennan, 1995).

Antes de continuar, es necesario mencionar ciertos errores que afectan al valor de Φ_Δ obtenido para el ácido fólico. Este parámetro fue determinado empleando la ecuación (1) de la sección 8.3, la cual considera que Φ_Δ es proporcional a la concentración estacionaria de $^1\text{O}_2$ que se genera cuando una solución del sensibilizador es iluminada. Sin embargo, dicha ecuación no contempla la reacción entre el $^1\text{O}_2$ y el sensibilizador, por lo cual, estrictamente no es válida para el ácido fólico. Por lo tanto, el valor obtenido es, en realidad, una cota inferior para Φ_Δ .

Sin embargo, es posible evaluar este error comparando la velocidad del consumo de $^1\text{O}_2$ por reacción con el ácido fólico ($k_s [\text{S}]$) y la velocidad de su desactivación por el solvente (k_d). Los experimentos de determinación de Φ_Δ fueron realizados con una solución de ácido fólico 135 μM . Tomando el valor de k_s obtenido anteriormente, $k_s [\text{S}]$ tiene un valor de $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ para esta concentración, el cual representa un 15% de k_d . Esta comparación sugiere que la determinación de Φ_Δ no es afectada en forma importante por la reacción del ácido fólico con el $^1\text{O}_2$.

Para la 6-formilpterina este error en la determinación de Φ_Δ no existe porque, tal como se demostrará en el próximo capítulo, la principal vía de reacción de este compuesto no involucra al $^1\text{O}_2$.

Por otra parte, teniendo en cuenta que, en los experimentos de fotólisis de soluciones ácido fólico expuestos en la sección anterior, la concentración de 6-carboxipterina aumenta significativamente luego de los primeros 5 minutos de irradiación, surge la necesidad de evaluar el papel de este compuesto en el mecanismo de la reacción. Con este objetivo se

determinó el rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ para la 6-carboxipterina empleando la misma técnica que la utilizada para ácido fólico y 6-formilpterina. Los resultados de estos experimentos arrojaron un valor igual al obtenido para este último compuesto (0,33). Es evidente, entonces, que la 6-carboxipterina contribuirá al proceso de aumento de la velocidad de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina cuando la cantidad de luz absorbida por este compuesto sea significativa.

Por último, antes de finalizar esta sección, es conveniente realizar ciertas consideraciones sobre las ya mencionadas trazas de 6-formilpterina presentes en las soluciones de ácido fólico no irradiadas. Esta pequeña proporción producirá cierta cantidad de $^1\text{O}_2$. Realizando un cálculo sencillo puede evaluarse la importancia de esta fuente de $^1\text{O}_2$ respecto a lo generado por el propio ácido fólico.

Si se considera que para la generación de $^1\text{O}_2$ contribuyen ambos compuestos, puede plantearse la siguiente ecuación para la velocidad total ($v_o(^1\text{O}_2)$) con la cual se forma en el seno de la solución.

$$v_o(^1\text{O}_2) = \Phi_{\Delta}^{\text{Ef}} \cdot I_A = \Phi_{\Delta}^{\text{AF}} \cdot I_A^{\text{AF}} + \Phi_{\Delta}^{\text{FPT}} \cdot I_A^{\text{FPT}} \quad (4)$$

$\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}}$ es el rendimiento cuántico efectivo medido en el experimento (0,06) y $\Phi_{\Delta}^{\text{AF}}$ y $\Phi_{\Delta}^{\text{FPT}}$ son los rendimientos cuánticos reales del ácido fólico y la 6-formilpterina, respectivamente. Por último, I_A es la intensidad de luz total absorbida por la solución (en moles de fotones/min) e I_A^{AF} e I_A^{FPT} representan la intensidad de luz absorbida por los dos compuestos presentes en la solución. Estos últimos dos parámetros pueden expresarse con las ecuaciones (1) y (2) presentadas en la sección anterior, reemplazando I_a por I_A . La ecuación (4) puede, por lo tanto escribirse de la siguiente manera:

$$\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}} \cdot I_A = \Phi_{\Delta}^{\text{AF}} \frac{\epsilon_{350}^{\text{AF}} \cdot [\text{AF}]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_A + \Phi_{\Delta}^{\text{FPT}} \frac{\epsilon_{350}^{\text{FPT}} \cdot [\text{FPT}]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_A$$

Está claro que si el segundo término del segundo miembro de la igualdad es despreciable respecto al valor de $\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}}$, la cantidad de intermediario generado por la 6-formilpterina será despreciable.

Aunque en soluciones más diluidas las impurezas no son detectadas, en las soluciones de ácido fólico de concentración 600 μM se han encontrado concentraciones de 6-formilpterina de alrededor de 7 μM , lo cual representa aproximadamente 1,2 % del total de los moles. Puede calcularse el valor del término correspondiente a la 6-formilpterina,

considerando dicha proporción de la misma y suponiendo que el resto es ácido fólico.

$$0,33 \times \frac{9.779 \cdot 1,2}{9779 \cdot 1,2 + 6.757 \cdot 98,8} = 5,7 \times 10^{-3}$$

El valor medido (0,06) es más de diez veces mayor al valor encontrado para la contribución inicial de la 6-formilpterina. Este cálculo permite descartar que las impurezas de este fotoproducto sean las responsables de la degradación fotoquímica del ácido fólico en la primera etapa de la fotólisis.

10.4. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de O₂.

Soluciones de ácido fólico a las cuales se les eliminó el O₂ burbujeando previamente N₂ fueron iluminadas con luz UV-A durante distintos períodos de tiempo. Las soluciones irradiadas fueron analizadas para investigar los procesos que tienen lugar en estas condiciones.

El estudio espectrofotométrico de tales soluciones mostró que no se producen cambios espectrales apreciables en estas condiciones experimentales. La figura 10.21 muestra los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución durante aproximadamente una hora. Estos resultados sugieren que la molécula de ácido fólico es fotoestable en ausencia de O₂.

Las soluciones irradiadas fueron analizadas por TLC. En estos experimentos no pudo observarse la aparición de las típicas manchas fluorescentes correspondientes a la 6-formilpterina ni a la 6-carboxipterina. En consecuencia, tal como era de esperar, no se producen dichas sustancias bajo estas condiciones experimentales. Tampoco se observan otras manchas fluorescentes en la placa cromatográfica. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 10.22.

Las medidas realizadas por HPLC sobre las soluciones irradiadas muestran que la concentración de ácido fólico no disminuye con el tiempo de irradiación. En la figura 10.23 se muestran los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 30 min. Además, con el tiempo de exposición a la luz UV, los picos correspondientes a la 6-formilpterina y a la 6-carboxipterina no aparecen. Tampoco se detectó la aparición de otros picos.

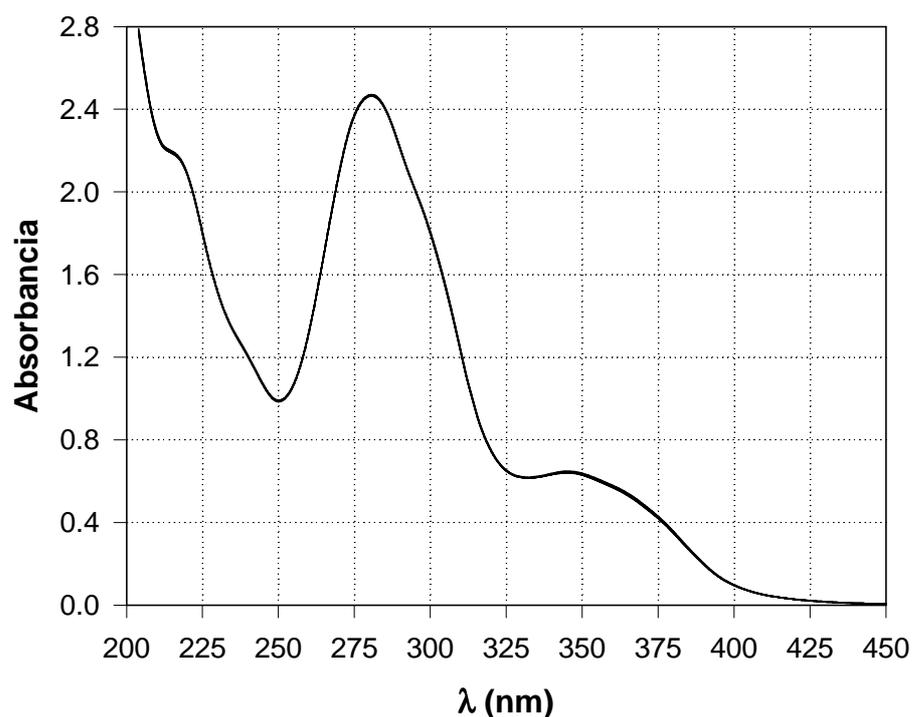


Figura 10.21. Irradiación de una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 5,8) en ausencia de O_2 . Los espectros de absorción fueron tomados cada 10 min durante 50 min. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente.

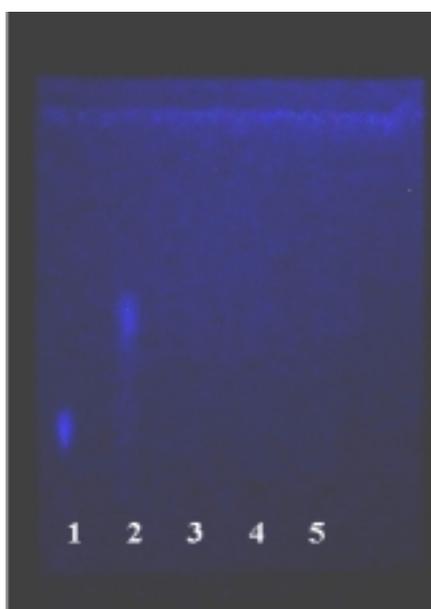


Figura 10.22. Corrida de TLC. Calle: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 150 μ M; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 3, solución patrón de ácido fólico 450 μ M; calles 4 y 5 solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) irradiada; 10 min y 20 min respectivamente.

Estos resultados muestran que el ácido fólico es fotoestable en ausencia de O_2 . Sin embargo, estos ensayos son importantes porque, como se explicará más adelante, existen casos estudiados en este trabajo de tesis, en los cuales un compuesto se descompone fotoquímicamente a través de dos vías distintas, en una participa el O_2 y en la otra no. En estas reacciones, al eliminar el O_2 , se observa que la velocidad de consumo del fotorreactivo disminuye, pero que no es nula.

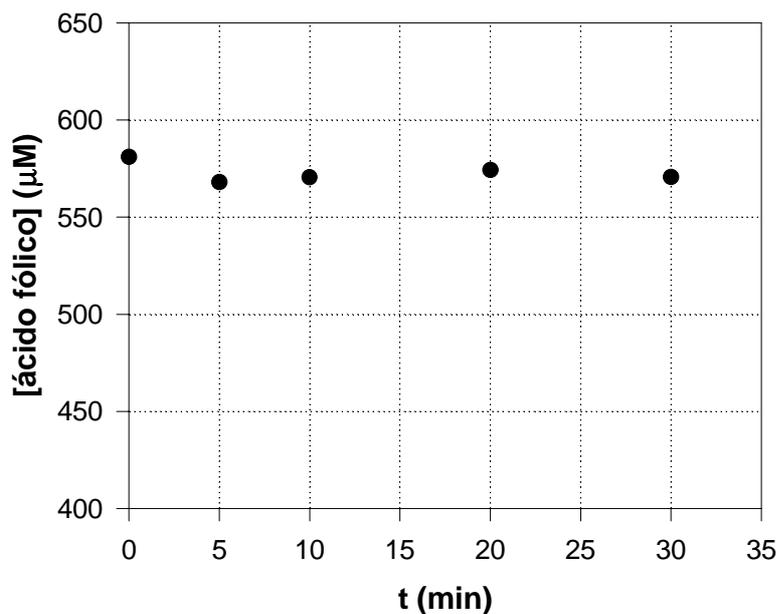


Figura 10.23. Irradiación de una solución de ácido fólico 580 μM (pH= 5,8).

10.5. Conclusiones.

El esquema 10.24 resume las principales conclusiones a las que se arribaron al analizar los resultados expuestos en este capítulo. El ácido fólico al ser irradiado con luz UV-A se excita y genera 1O_2 , pero con un rendimiento cuántico muy bajo ($\Phi_{\Delta} = 0,06$). Esta forma excitada del O_2 reacciona con el ácido fólico provocando su escisión a 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Esta reacción, en la que hay un ataque del 1O_2 al grupo CH_2 unido al C-6 de la estructura pterínica, por su complejidad, debe ocurrir en más de una etapa. A medida que avanza la reacción se acumulan los productos, a la vez que se consume el reactivo. En las fotólisis realizadas en condiciones tales que el reactivo absorbe inicialmente casi la totalidad de la luz, el mencionado proceso es el único que ocurre en una primera etapa,

observándose una cinética de orden 0 y un rendimiento cuántico para esta reacción de $2,5 \times 10^{-3}$, cuando la concentración de ácido fólico es $600 \mu\text{M}$.

La 6-formilpterina, por su parte, también genera $^1\text{O}_2$, pero con un rendimiento cuántico más de cinco veces superior ($\Phi_{\Delta} = 0,33$). En consecuencia, cuando la concentración de este fotoproducto es lo suficientemente alta como para que la luz absorbida por él no sea despreciable, la velocidad de formación de $^1\text{O}_2$ aumenta y, por ende, su concentración en el medio. Por esta razón, la velocidad de la transformación de ácido fólico en 6-formilpterina aumenta al avanzar la fotólisis, en vez de disminuir por agotamiento del reactivo. Asimismo, en esta segunda etapa, se observa la aparición de otro compuesto, 6-carboxipterina, pudiendo postularse que el mismo es el producto de la fotodegradación de la 6-formilpterina. Sin embargo, este punto será tratado en el siguiente capítulo.

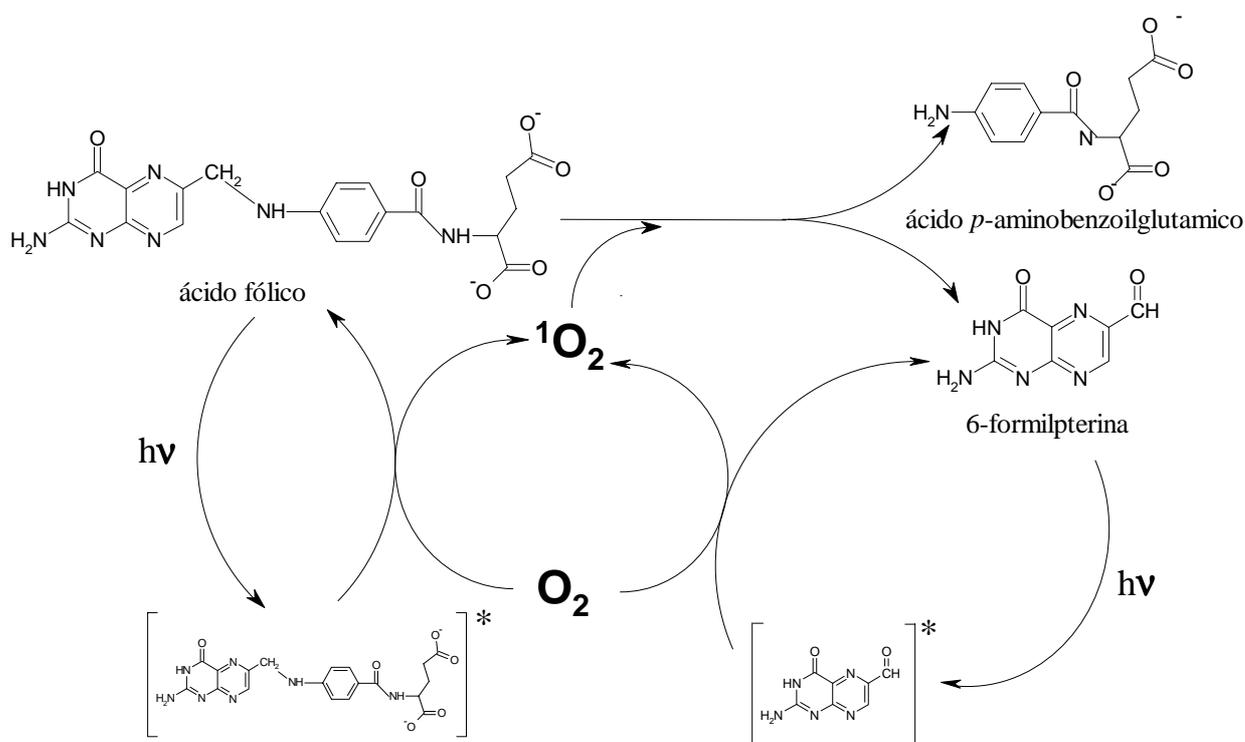


Figura 10.24. Esquema de reacciones propuesto para explicar los resultados obtenidos en los experimentos de fotólisis de ácido fólico. Las especies excitadas se indican con *.

Finalmente, puede reconocerse una tercera etapa en la cual tanto la concentración de ácido fólico como la de 6-formilpterina decrecen con el tiempo de irradiación. En este período se observa un aumento continuo de la concentración de 6-carboxipterina. Sin embargo, el balance de masas realizado con las tres especies sugiere que este último compuesto es, a su

vez fotosensible; no obstante, el análisis de esta hipótesis será presentado recién en el capítulo 12.

Es necesario realizar un comentario sobre las trazas de fotoproductos encontradas en las soluciones de ácido fólico no irradiadas. La influencia de estas trazas, que posiblemente se generen durante la preparación de las soluciones, fue considerada y se concluyó que su efecto es despreciable durante la primera etapa de las fotólisis. Varias evidencias fueron encontradas a favor de esta hipótesis. En primer lugar, si la 6-formilpterina inicial fuera la responsable de iniciar los procesos fotoquímicos observados, el ácido fólico debería ser fotoestable en ausencia de la misma. Sin embargo, tal como se comentara en la sección 4.1, ha sido reportado en literatura que el ácido fólico purificado por recristalización, no es fotoestable (Robinson et al., 1990). Por otro lado, tal como se explicó en la sección 10.1, durante la primera etapa de la fotólisis la concentración de 6-carboxipterina permanece constante, indicando que la 6-formilpterina presente no recibe una cantidad de luz significativa por actuar el ácido fólico como filtro interno absorbiendo casi toda la luz incidente. Por último, los cálculos realizados con los valores de los correspondientes Φ_{Δ} muestran que la cantidad de $^1\text{O}_2$ generada inicialmente por la 6-formilpterina es despreciable respecto a la generada por el ácido fólico.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones expuestas hasta aquí, es posible plantear un conjunto de reacciones que describe el modelo propuesto para explicar el mecanismo de los procesos fotoquímicos estudiados. Tales reacciones, junto con las correspondientes velocidades, se listan en la tabla 10.1. A partir de este mecanismo pueden plantearse las ecuaciones de velocidad que definen el cambio de concentración de las especies involucradas. Estas ecuaciones se muestran en la parte inferior de la tabla 10.2.

Resulta evidente que las reacciones o etapas que figuran en la tabla 10.1, no son etapas elementales, a excepción de la desactivación del $^1\text{O}_2$ por el solvente. Por el contrario, representan procesos que incluyen varias etapas elementales, pero que, por conveniencia, fueron agrupadas. Por ejemplo, las tres primeras etapas representan la formación de $^1\text{O}_2$ por parte de los fotosensibilizadores que poseen esta capacidad. Sin embargo, cada uno de estos procesos puede ser descripto más detalladamente tal cómo fue explicado en la figura 4.7. Es decir, en una primera etapa el sensibilizador, inicialmente en su estado basal, absorbe luz y pasa a un estado excitado singlete, en una segunda etapa, se genera un estado triplete por entrecruzamiento de sistemas, y finalmente, es el estado triplete el que genera la especie $^1\text{O}_2$

transfiriendo su energía al O₂ disuelto en el medio. De la misma manera, la reacción entre el ácido fólico y el ¹O₂ debe involucrar varios pasos. Por último, los resultados expuestos en el próximo capítulo mostrarán que la fotooxidación de la 6-formilpterina ocurre también en varias etapas.

Etapa	Velocidad
$AF + O_2 \xrightarrow{h\nu} AF + {}^1O_2$	$I_a^{AF} \cdot \Phi_{\Delta}^{AF}$
$FPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} FPT + {}^1O_2$	$I_a^{FPT} \cdot \Phi_{\Delta}^{FPT}$
$CPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} CPT + {}^1O_2$	$I_a^{CPT} \cdot \Phi_{\Delta}^{CPT}$
$AF + {}^1O_2 \longrightarrow FPT + PABA-Glu$	$k_s \cdot [AF] \cdot [{}^1O_2]$
${}^1O_2 \longrightarrow O_2$	$k_d \cdot [{}^1O_2]$
$FPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} CPT$	$I_a^{FPT} \cdot \Phi_{FPT}$

Tabla 10.1. Mecanismo propuesto para explicar los cambios observados cuando se irradia una solución de ácido fólico. PABA-Glu representa a ácido *p*-aminobenzoilglutámico, las demás abreviaturas poseen el mismo significado que en el texto.

Especie	Ecuación de velocidad
Acido fólico	$d[AF]/dt = -k_s [AF] [{}^1O_2]$
6-formilpterina	$d[FPT]/dt = k_s [AF] [{}^1O_2] - I_a^{FPT} \Phi_{FPT}$
6-carboxipterina	$d[CPT]/dt = I_a^{FPT} \Phi_{FPT}$
¹ O ₂	$d[{}^1O_2]/dt = I_a^{AF} \Phi_{\Delta}^{AF} + I_a^{FPT} \Phi_{\Delta}^{FPT} + I_a^{CPT} \Phi_{\Delta}^{CPT} - k_s [AF] [{}^1O_2] - k_d [{}^1O_2]$

Tabla 10.2. Ecuaciones de velocidad que definen el cambio en la concentración de las especies involucradas en el mecanismo propuesto.

En la tabla 10.3 se listan los valores de todas las constantes que aparecen en las ecuaciones de velocidad de la tabla 10.1 y que fueron calculadas en los experimentos descritos en este capítulo; excepto Φ_{FPT} cuya determinación será abordada en el próximo capítulo.

Empleando las ecuaciones y las constantes presentadas en las tablas precedentes se

realizó una simulación con el programa Kinesim 8.5 (García Einschlag y Capparelli, 2000) que utiliza el método matemático Runge-Kutta (integración numérica de sistemas de ecuaciones diferenciales). Además este programa usó la luz incidente (I_0^v) y los correspondientes valores de los coeficientes de extinción molar a 350 nm para el cálculo de las intensidades de luz absorbidas por cada especie involucrada (I_a). Los resultados de esta simulación se muestran en la figura 10.25.

Constante	Descripción	Valor
Φ_{Δ}^{AF}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 del ácido fólico	0,06
Φ_{Δ}^{FPT}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 de 6-formilpterina	0,33
Φ_{Δ}^{CPT}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 de 6-carboxipterina	0,33
k_s	Constante de velocidad de la reacción de ácido fólico con 1O_2	$3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_d	Constante de velocidad de desactivación del 1O_2 en agua.	$2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
Φ_{FPT}	Rendimiento cuántico de la reacción de conversión de 6-formilpterina en 6-carboxipterina	$3,8 \times 10^{-2}$

Tabla 10.3. Constantes del sistema de ecuaciones que describe el modelo propuesto.

Puede observarse que los perfiles de concentración simulados reproducen el comportamiento general observado experimentalmente para los primeros 15 minutos de fotólisis. Sin embargo, el modelo muestra ciertas limitaciones. En primer lugar, el cambio abrupto en las velocidades del ácido fólico y de la 6-formilpterina que se observa en los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, alrededor de los 4 a 5 minutos, no es reflejado por la simulación que, por el contrario, predice cambios más graduales.

No obstante, las diferencias más importantes entre los datos experimentales y los calculados residen en la etapa posterior a los 15 minutos (no mostrados en la figura 10.25). En efecto, mientras los datos experimentales muestran que la concentración de ácido fólico se mantiene con escasas variaciones, la simulación predice un descenso considerable de la misma. Debe tenerse en cuenta que el modelo propuesto es sencillo y no incluye ciertos factores que pueden adquirir importancia en determinadas etapas del proceso global. En particular, debe considerarse que las tres primeras ecuaciones de la tabla 10.1 son estrictamente válidas sólo para soluciones que estén equilibradas con atmósfera de aire,

debido a que en estas condiciones se midieron los rendimientos cuánticos de generación de $^1\text{O}_2$. Si bien los experimentos de fotólisis fueron realizados en celdas abiertas a la atmósfera y con agitación, el consumo de O_2 es muy importante y la transferencia de este gas desde la fase gaseosa podría no ser suficiente y, por ende, la concentración del mismo podría descender lo suficiente como para detener la reacción de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina.

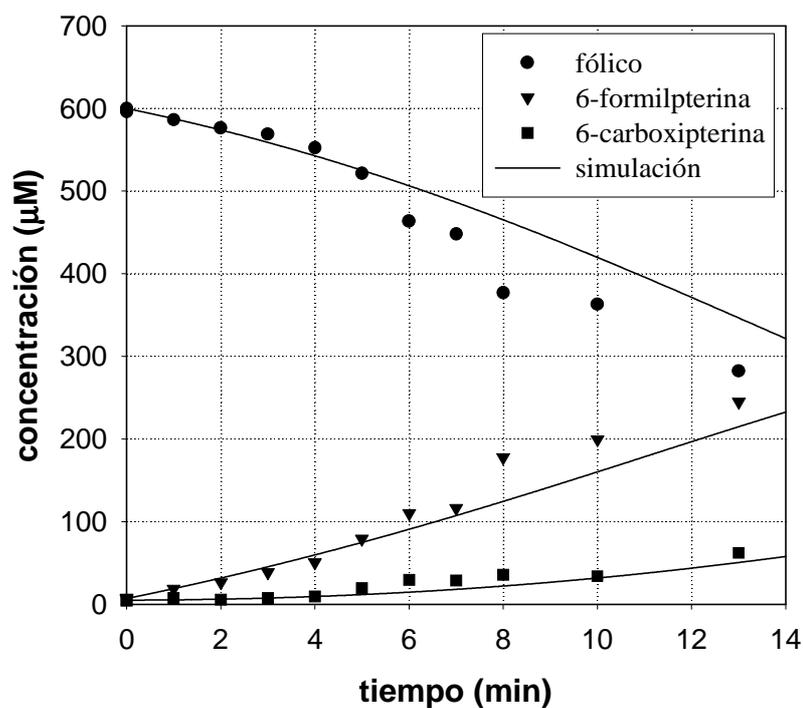


Figura 10.25. Comparación de los resultados obtenidos en la simulación con los resultados experimentales correspondientes al experimento de la figura 10.13.