

Capítulo 11.

Fotólisis de 6-formilpterina.

En el capítulo 10 se mostró que en las soluciones irradiadas de ácido fólico está presente la 6-carboxipterina, pero que este compuesto no proviene directamente del reactivo y se sugirió que es el producto de la fotólisis secundaria de la 6-formilpterina. En este capítulo se exponen y analizan los resultados de experimentos realizados con soluciones que contienen únicamente 6-formilpterina, con el fin de analizar en detalle solamente la reacción de fotólisis de este derivado pterínico.

Al igual que en el capítulo anterior, en las próximas secciones se mostrarán los resultados que condujeron a la identificación de productos y a la determinación de los correspondientes rendimientos cuánticos. Asimismo, esta fotólisis se estudió en presencia y ausencia de O₂ y se investigó la participación del ¹O₂ en el mecanismo de la reacción.

11.1. Fotólisis de 6-formilpterina en presencia de O₂.

La figura 11.1 muestra los profundos cambios espectrales que se producen cuando una solución ligeramente ácida de 6-formilpterina se irradia con luz UV-A. En la figura 11.1.b se observan los espectros DE durante la fotólisis. En los 14 minutos que duró este experimento se observó que el punto isosbético de 300 nm permanecía invariante. Además luego de los 8 minutos, aproximadamente, el espectro de la solución varió muy poco. En la figura 11.2 puede observarse la variación de la absorbancia con el tiempo para distintas longitudes de onda. Esto sugiere que la 6-formilpterina se transforma, en este período de tiempo, cuantitativamente en un compuesto que es mucho más estable fotoquímicamente, pero que, sin embargo, comienza a consumirse significativamente luego de los 10 min de irradiación.

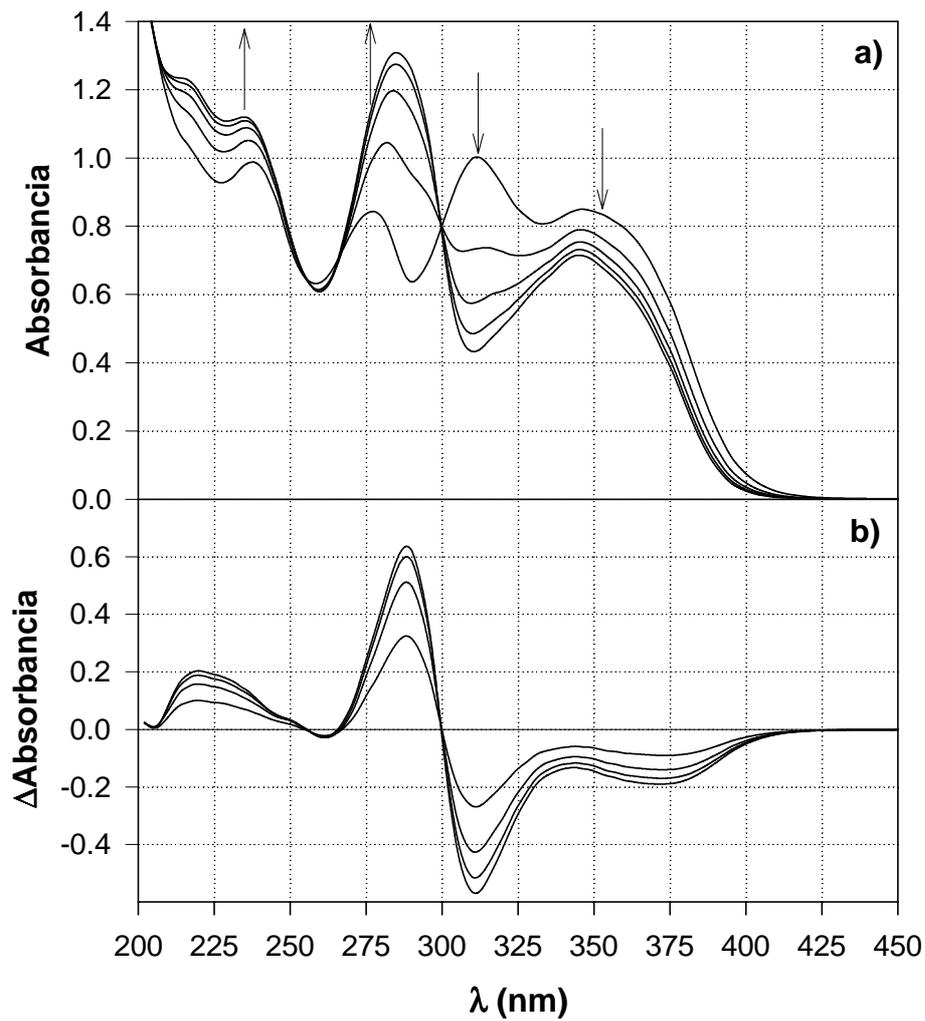


Figura 11.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (110 μM , pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min. y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.

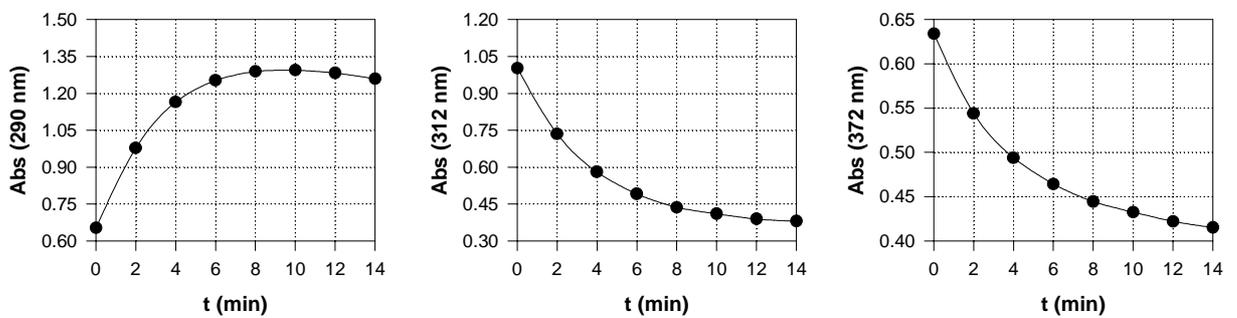


Figura 11.2. Variación con el tiempo de irradiación de la absorbancia a distintas λ de una solución de 6-formilpterina (110 μM , pH=6,0).

Como puede observarse en la figura 11.3, el espectro DEN de esta reacción se corresponde muy bien con el espectro DTN, obtenido a partir de los espectros de la 6-formilpterina y la 6-carboxipterina. Más aún, como se aprecia en la figura 11.4, el espectro de la solución fotolizada puede compararse directamente con el espectro de una solución de 6-carboxipterina.

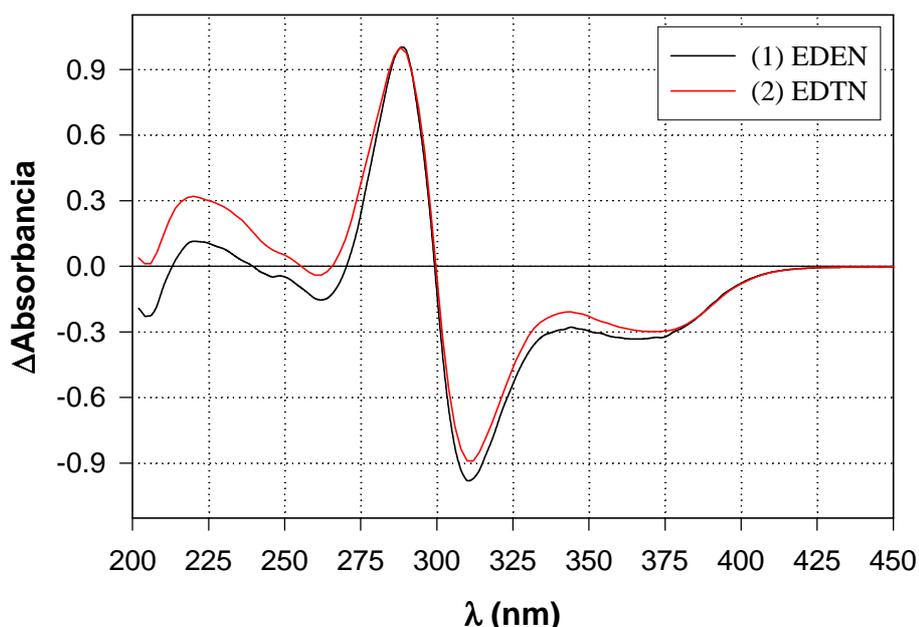


Figura 11.3. Comparación de espectros diferenciales normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 8 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones que contiene 6-formilpterina 100 μ M y 6-carboxipterina 100 μ M.

Los experimentos de TLC (figura 11.5), revelan la presencia de dos manchas fluorescentes en las soluciones irradiadas de 6-formilpterina, con valores de R_f que se corresponden a los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Se observa que la mancha correspondiente al reactivo disminuye significativamente en intensidad respecto a la solución no fotolizada. No se detectan otras manchas coloreadas y/o fluorescentes además de las dos mencionadas, sugiriendo que la única vía de descomposición de la 6-formilpterina, en estas condiciones, es su oxidación a 6-carboxipterina.

El análisis por HPLC de las soluciones de 6-formilpterina irradiadas muestra que el área del pico de este compuesto disminuye al avanzar la fotólisis. Además se observa el crecimiento de un pico con t_R y forma coincidente con el del patrón de 6-carboxipterina. La figura 11.6 muestra un cromatograma correspondiente a una solución iluminada y se lo

compara con los cromatogramas de las soluciones de los patrones.

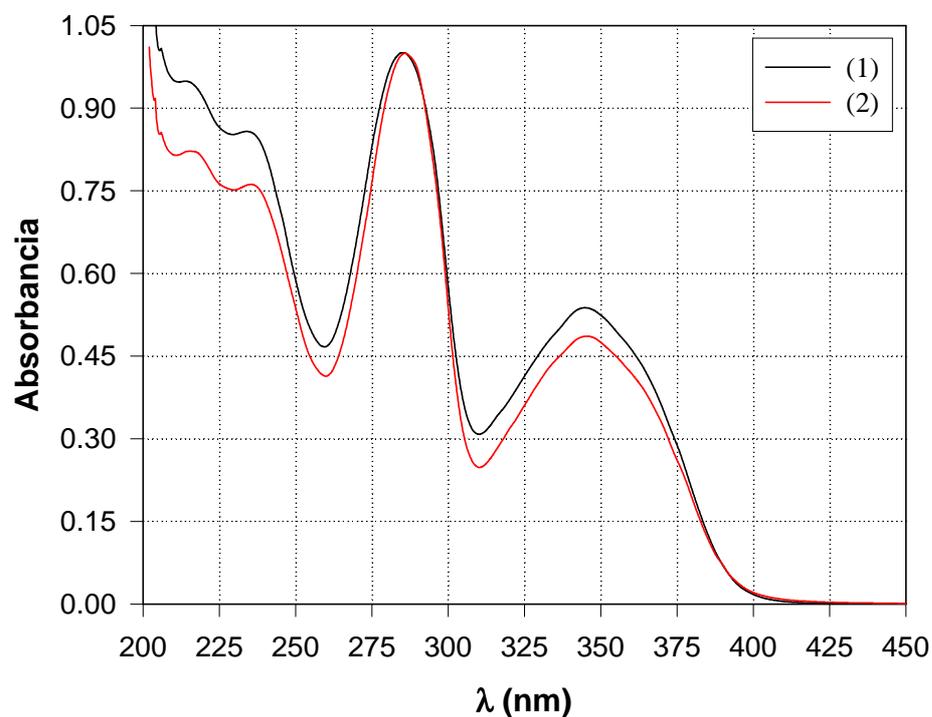


Figura 11.4. (1) Espectro DEN de una solución de 6-formilpterina (100 μ M, pH=5,8) irradiada 10 min. (2) Espectro normalizada de una solución de 6-carboxipterina (100 μ M, pH= 5,7).

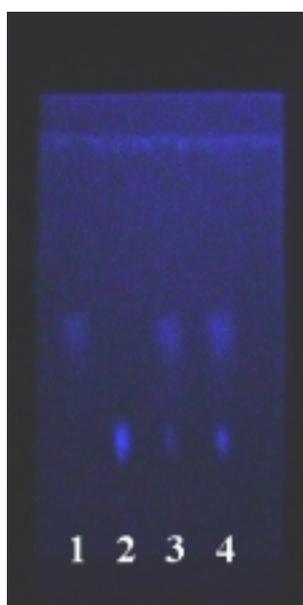


Figura 11.5. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 2, solución patrón de 6-carboxipterina 150 μ M; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 6,0) irradiada con luz de 350 nm; 2 min. y 4 min., respectivamente.

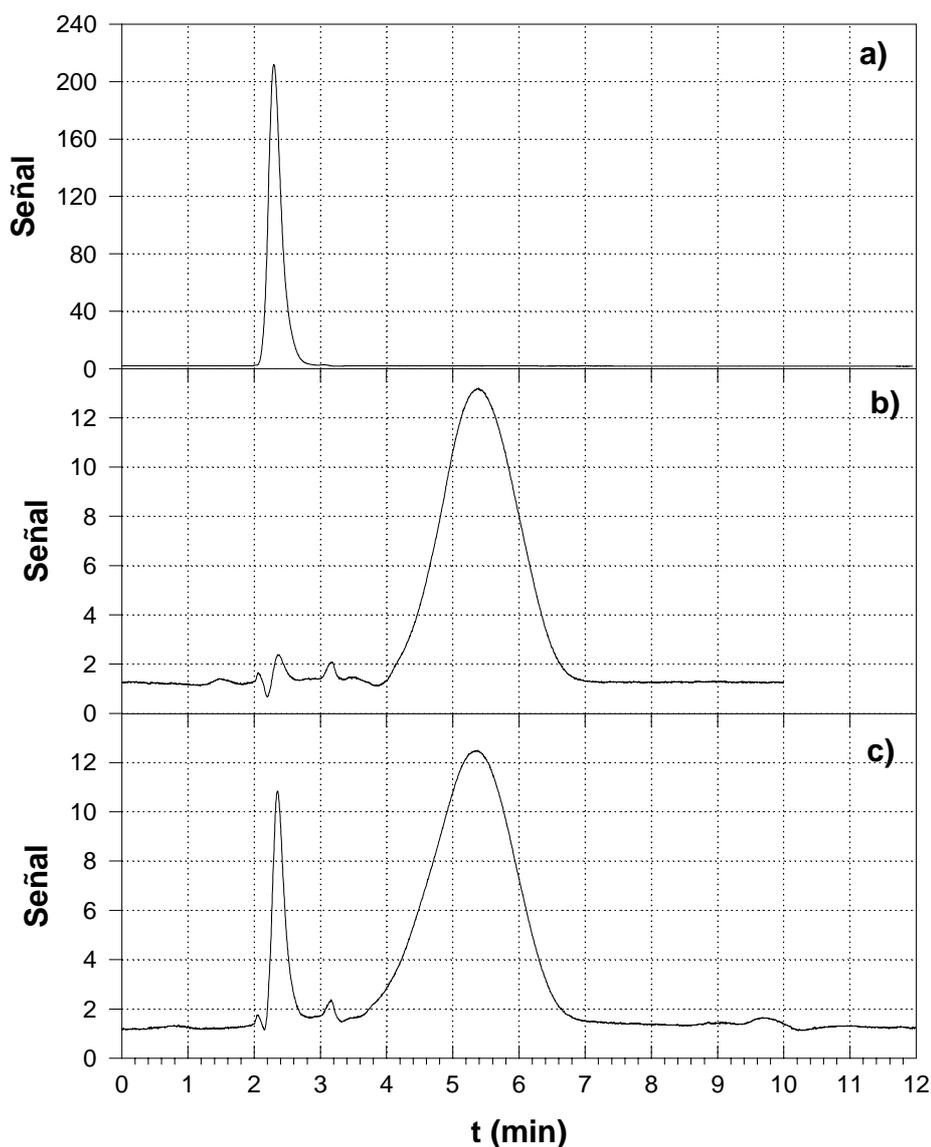


Figura 11.6. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de 6-carboxipterina 150 μM . b) Solución 6-formilpterina 95 μM . c) Solución de 6-formilpterina 150 μM irradiada 0,5 min. Para los tres cromatogramas la λ de análisis fue 340 nm.

Mediante las correspondientes curvas de calibración se obtuvieron los perfiles de concentración de ambos compuestos durante la fotólisis. La figura 11.7 muestra la evolución de dichas concentraciones, observándose un comportamiento lineal para el intervalo de tiempo analizado. Se obtuvieron las siguientes velocidades en este experimento: $-14,5 \pm 0,7$ $\mu\text{M}/\text{min}$ para la descomposición del reactivo y $13,8 \pm 0,3$ $\mu\text{M}/\text{min}$ para la formación de producto. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $3,9 \times 10^{-2}$ y $3,7 \times 10^{-2}$,

respectivamente. Puede apreciarse que estos valores son lo suficientemente parecidos entre sí como para aceptar que la única vía cuantitativamente importante de descomposición de la 6-formilpterina es su oxidación a 6-carboxipterina.

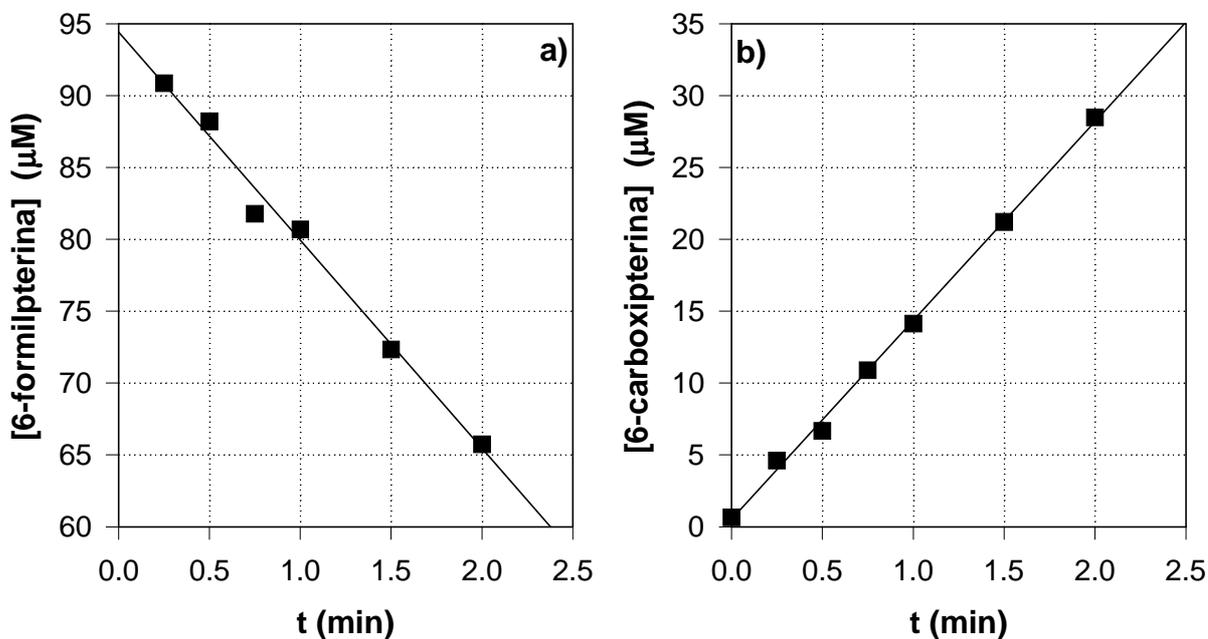


Figura 11.7. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina 95 μM y pH= 5,5.

En este caso no puede suponerse absorción total de luz por parte de la 6-formilpterina, ya que la absorbancia inicial es de sólo 0,89. Por este motivo, el cálculo de los rendimientos cuánticos se realizó empleando la luz absorbida inicialmente y no el total de la luz incidente.

11.2. Papel del O₂ en la fotólisis de la 6-formilpterina.

La transformación del grupo 6-formilo al grupo 6-carboxilo que ocurre en la reacción que se está estudiando implica una oxidación. Para evaluar la participación del O₂ disuelto, se dosó este gas con el correspondiente electrodo selectivo durante la fotólisis. Como muestra la figura 11.8, en una fotólisis de una solución de 6-formilpterina saturada en aire se observa una significativa disminución de la concentración de O₂ con el tiempo de irradiación.

Se analizó por HPLC la evolución de las concentraciones de 6-formilpterina y

6-carboxipterina en los experimentos realizados en presencia de alcohol furfurílico descritos en la sección 10.3. En la fotólisis de la figura 10.18 se partió de una mezcla aireada que contenía ácido fólico ($42 \mu\text{M}$), 6-formilpterina ($32 \mu\text{M}$) y alcohol furfurílico 10 mM . Como se detalló en la explicación de dicho experimento la concentración de ácido fólico varió muy poco durante el mismo. Por lo tanto, puede analizarse la evolución de la concentración de 6-formilpterina sin tener en cuenta a aquel compuesto. La única alteración que produce su presencia es la absorción de parte de la luz incidente, pero debido a su baja concentración, este efecto no es importante.

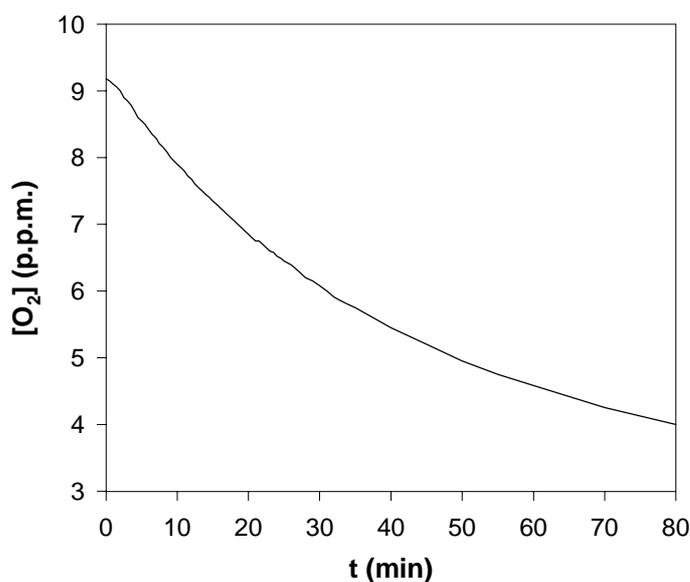


Figura 11.8. Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución de 6-formilpterina ($200 \mu\text{M}$, $\text{pH}=6,0$).

En esta fotólisis se observó que, a diferencia del ácido fólico, la 6-formilpterina se consumía rápidamente. Además se generó en los primeros minutos de irradiación una cantidad apreciable de 6-carboxipterina que alcanza un máximo y luego disminuye. La evolución de la concentración de estos dos compuestos, durante este experimento, se muestra en la figura 11.9.

Estos resultados indican que el O_2 participa en la reacción siendo el agente oxidante, lo cual queda evidenciado por la disminución de su concentración al avanzar la fotólisis. No obstante, no lo hace a través de su intermediario activado, el $^1\text{O}_2$. En el capítulo anterior se demostró que la 6-formilpterina genera $^1\text{O}_2$ al ser irradiada en presencia de O_2 ; sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados en esta sección el mismo no ataca a la molécula y la

fotooxidación que conduce al derivado carboxílico ocurre a través de otro mecanismo.

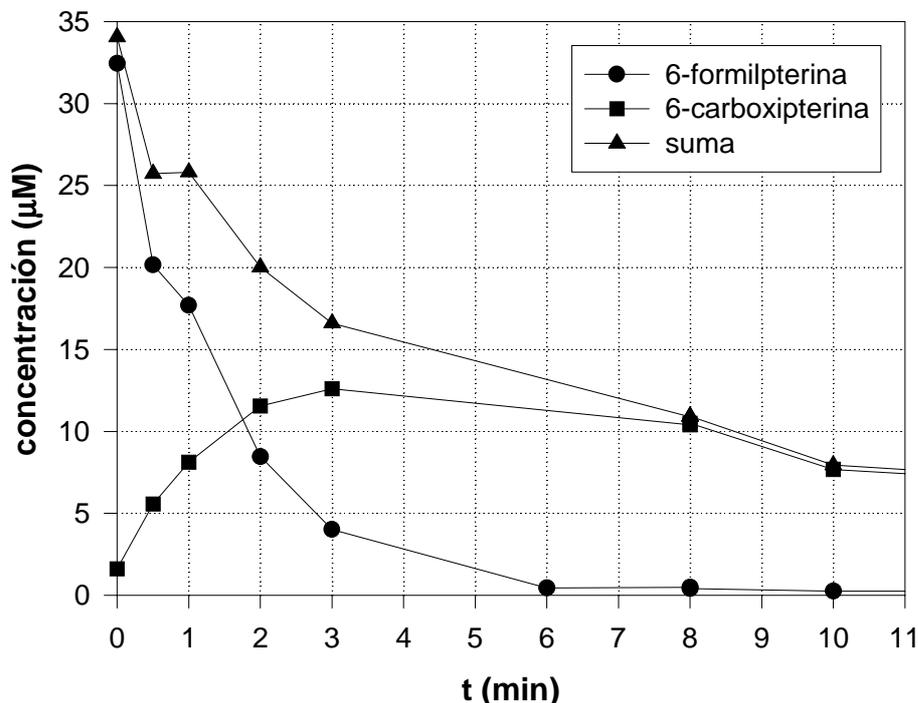


Figura 11.9. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico (10 mM).

Es necesario realizar algunas observaciones acerca de los últimos resultados presentados. Nótese en la figura 11.9 que la suma de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina no se mantiene constante sino que, por el contrario, disminuye rápidamente al avanzar la fotólisis. Este hecho podría indicar que el reactivo, bajo estas condiciones experimentales, además de transformarse en 6-carboxipterina, se descompone por otra vía; lo cual no invalida las conclusiones expuestas más arriba, pero sugiere que el alcohol furfurílico está involucrado en esta nueva vía fotodegradativa. Además se observa un consumo importante de 6-carboxipterina lo cual contribuye a que la suma disminuya.

Para obtener mayor información en este sentido, se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones que contenían solamente 6-formilpterina y alcohol furfurílico (recuérdese que el experimento anterior fue llevado a cabo sobre una mezcla que contenía ácido fólico además de estos dos compuestos). Se tomaron los espectros a distintos tiempos de irradiación (figura 11.10.a) y se obtuvieron los correspondientes espectros DE y DEN. Cuando se comparan los espectros DEN con el espectro DTN de la reacción que rinde como

producto 6-carboxipterina, puede apreciarse que existen diferencias entre ellos (figura 11.10.b). Resulta evidente que dicha reacción, si bien está presente, no es la única que está ocurriendo.

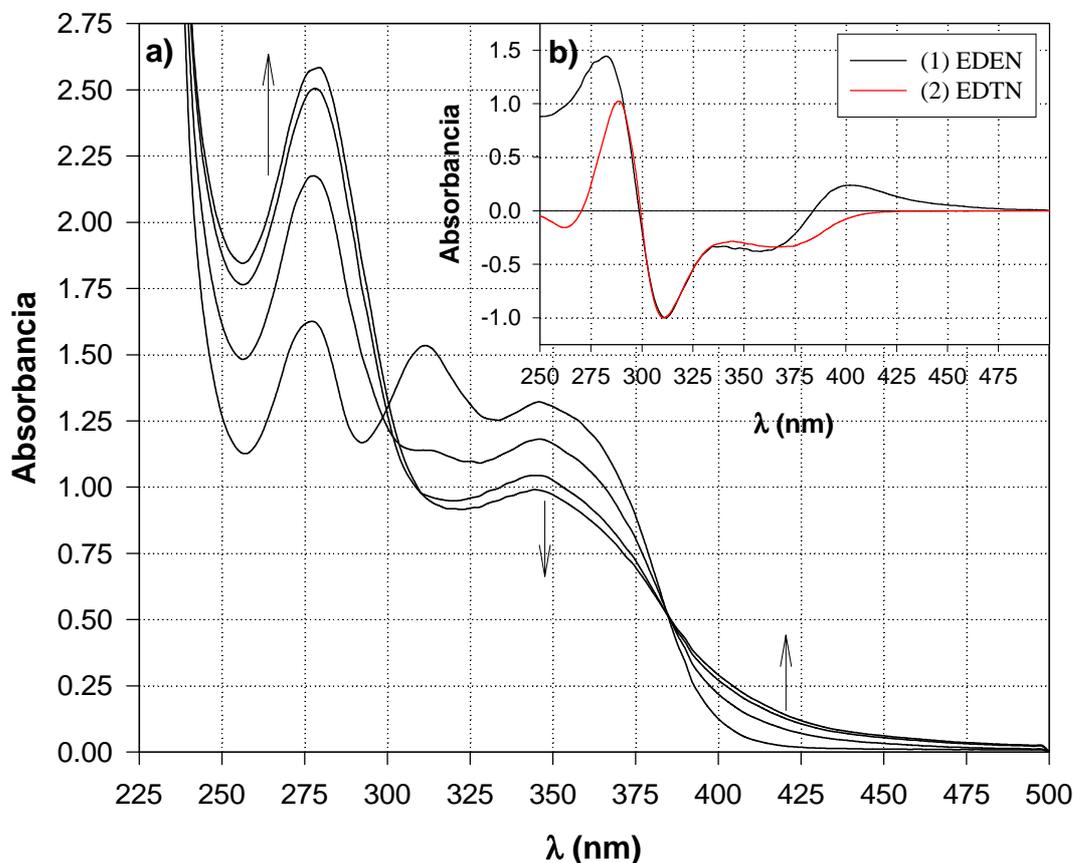


Figura 11.10. a) Evolución del espectro de una solución de 6-formilpterina ($160 \mu\text{M}$, $\text{pH}= 6,0$), y alcohol furfurílico (10 mM) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación. b) (1) Espectro DEN obtenido luego de 2 min de irradiación. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones que contiene 6-formilpterina $100 \mu\text{M}$ y 6-carboxipterina $100 \mu\text{M}$.

Debido a que las soluciones empleadas para estos experimentos son estables en la oscuridad, puede especularse sobre la posible reacción de la 6-formilpterina excitada con el alcohol furfurílico o con alguno de sus productos oxidados por reacción con el $^1\text{O}_2$. Sin embargo, no es objetivo de este capítulo profundizar sobre esta cuestión.

11.3. Fotólisis de 6-formilpterina en ausencia de O₂.

Cuando se irradia una solución ligeramente ácida de 6-formilpterina burbujeada con N₂, se observa que la solución, inicialmente de un color amarillo muy pálido, se torna, en el término de unos pocos minutos, color naranja-rojizo. Este efecto queda registrado en los profundos cambios espectrales que ocurren como consecuencia de la irradiación. Estos resultados se muestran en la figura 11.11. Puede observarse la aparición de una banda de absorción, relativamente poco intensa y ancha, con un máximo en 480 nm. Ninguno de los patrones comerciales de pterinas mencionados presenta tal característica espectral. Por ende, los espectros DEN de la fotólisis no concuerdan con ninguno de los posibles espectros DTN obtenidos a partir de soluciones patrones. No puede, en consecuencia, proponerse la identidad de este "fotoproducto rojo" en base a comparaciones espectrofotométricas con soluciones de patrones comerciales.

El "fotoproducto rojo" no es estable en presencia de O₂. En efecto, cuando una solución de 6-formilpterina, irradiada durante unos minutos en condiciones anaeróbicas, es posteriormente puesta en contacto con el aire, se observa que su espectro cambia rápidamente. Estos cambios espectrales incluyen, como puede observarse en la figura 11.12 la desaparición de la banda con máximo en 480 nm. Esto implica, obviamente la pérdida del color rojo-anaranjado de la solución irradiada.

La figura 11.13.a muestra el espectro DEN obtenido en la reacción que ocurre al airear la solución irradiada en ausencia de O₂. El espectro de la figura 11.13.b es el espectro DEN global obtenido en el proceso de irradiación (en condiciones anaeróbicas) y posterior aireación. Es decir, este espectro se obtuvo restando al espectro 3 de la figura 11.11 el espectro 1 de la misma figura y luego normalizando. En la figura 11.13.b se muestra, además el espectro DTN obtenido con los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Nótese que son muy parecidos, sugiriendo que el producto final, luego de poner en contacto la solución irradiada con el O₂ del aire es la 6-carboxipterina.

Los experimentos de TLC muestran que, en las soluciones irradiadas en ausencia de O₂ y posteriormente aireadas, aparece una mancha fluorescente con R_f coincidente con el de la 6-carboxipterina. Estos resultados pueden apreciarse en la figura 11.14. Puede observarse además que la intensidad de la mancha del reactivo disminuye con el tiempo de irradiación y que no se detectan otras manchas que indiquen la presencia de otros fotoproductos.

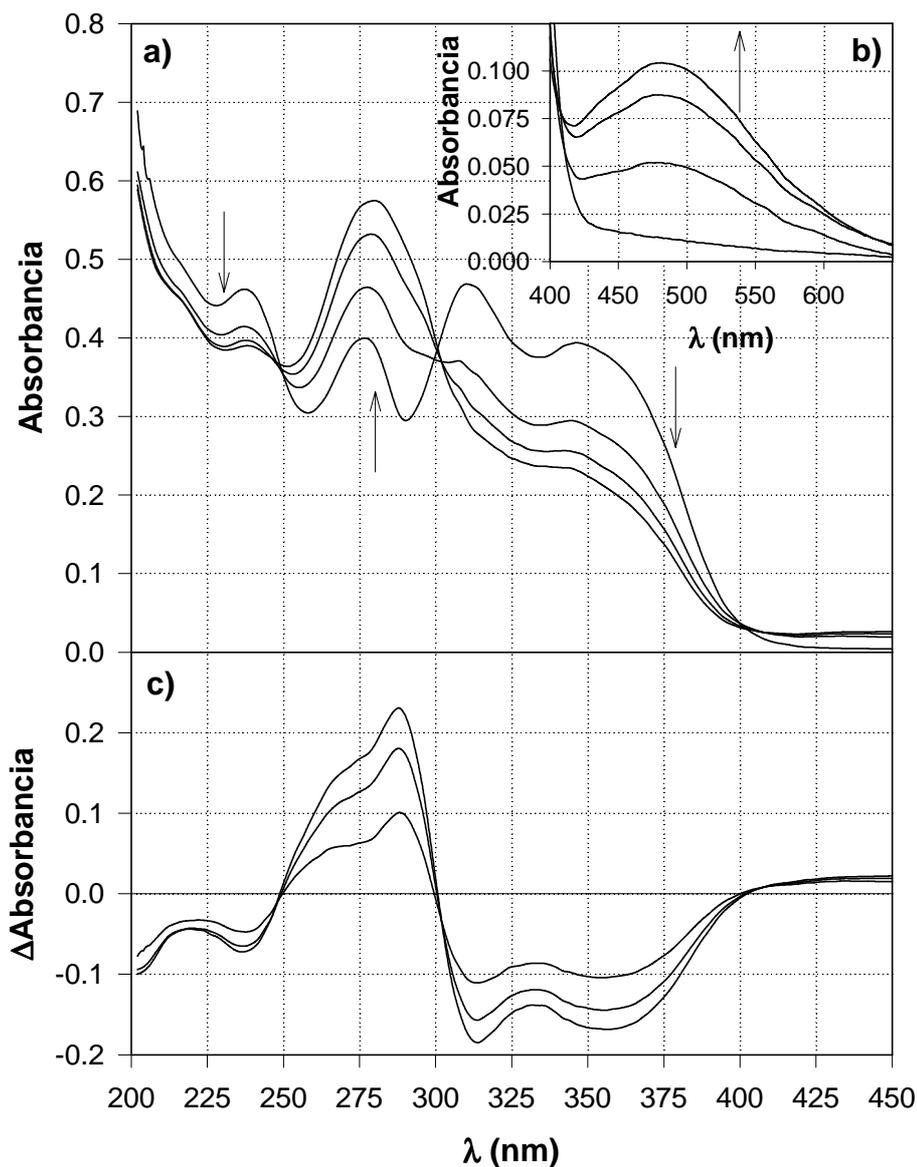


Figura 11.11. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (200 μM , $\text{pH}= 5,8$) al ser irradiada en ausencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min. y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Detalle de la zona del espectro comprendida entre 400 y 650 nm. Camino óptico= 1 cm. c) Espectros DE correspondientes.

Se analizaron por HPLC soluciones de 6-formilpterina irradiadas en condiciones anaeróbicas durante períodos crecientes de tiempo y posteriormente puestas en contacto con el aire. Se observa, en estas muestras, la aparición de un pico correspondiente a la 6-carboxipterina, el cual aumenta su área con el tiempo de irradiación. Simultáneamente se

observa una disminución del área del pico de la 6-formilpterina. En la figura 11.15 se muestra un cromatograma típico obtenido durante este experimento.

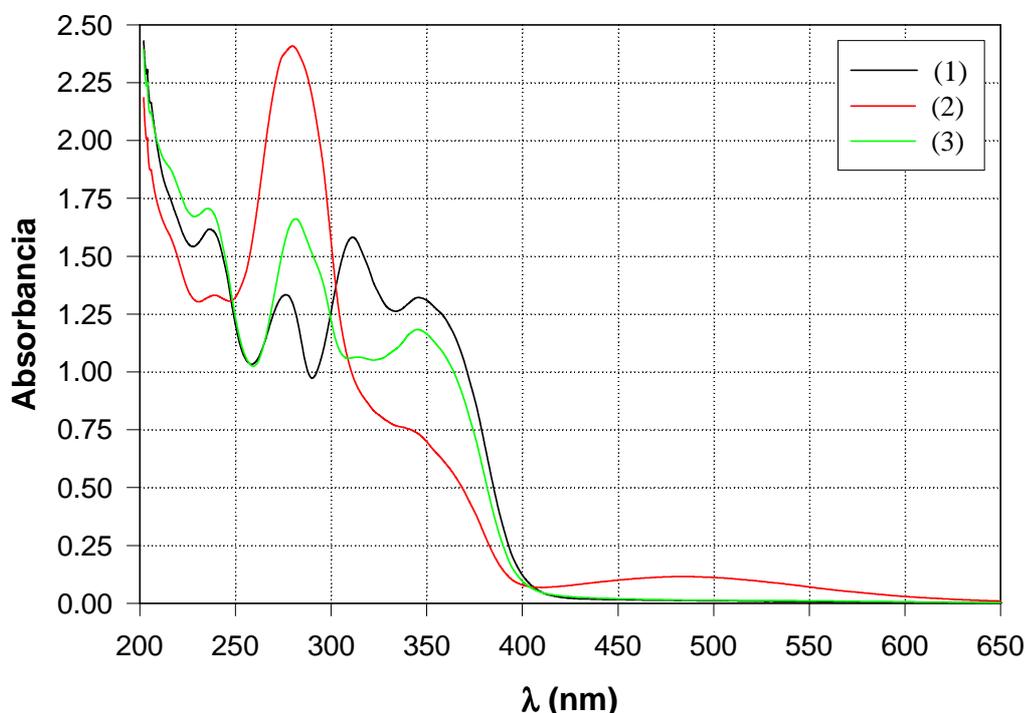


Figura 11.12. Espectros obtenidos en un experimento de fotólisis partiendo de una solución de 6-formilpterina (134 μM , $\text{pH}=5,0$) Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. (1) Espectro de la solución original no irradiada. (2) Espectro de la solución irradiada 10 minutos en ausencia de O_2 . (3) Espectro de la solución irradiada 10 minutos en ausencia de O_2 y luego aireada.

En la figura 11.16 se muestra la evolución de las concentraciones de los dos compuestos. Se obtuvieron las siguientes velocidades en este experimento: $-14 \pm 1 \mu\text{M}/\text{min}$ para la descomposición de la 6-formilpterina y $16,8 \pm 0,7 \mu\text{M}/\text{min}$ para la formación de 6-carboxipterina. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $3,5 \times 10^{-2}$ y $4,2 \times 10^{-2}$, respectivamente. Estos valores indican que la única vía cuantitativamente importante de descomposición de la 6-formilpterina es su oxidación a 6-carboxipterina. Además son comparables a los rendimientos cuánticos correspondientes a los experimentos realizados en presencia de O_2 . En definitiva, realizando la irradiación en ausencia de O_2 y luego aireando la solución, se obtiene el mismo producto y con el mismo rendimiento cuántico que en las fotólisis realizadas en condiciones aeróbicas. Esto sugiere que en ambas condiciones experimentales la reacción ocurre a través del mismo mecanismo: se genera un fotoproducto

que posteriormente reacciona con el O₂ disuelto en el medio.

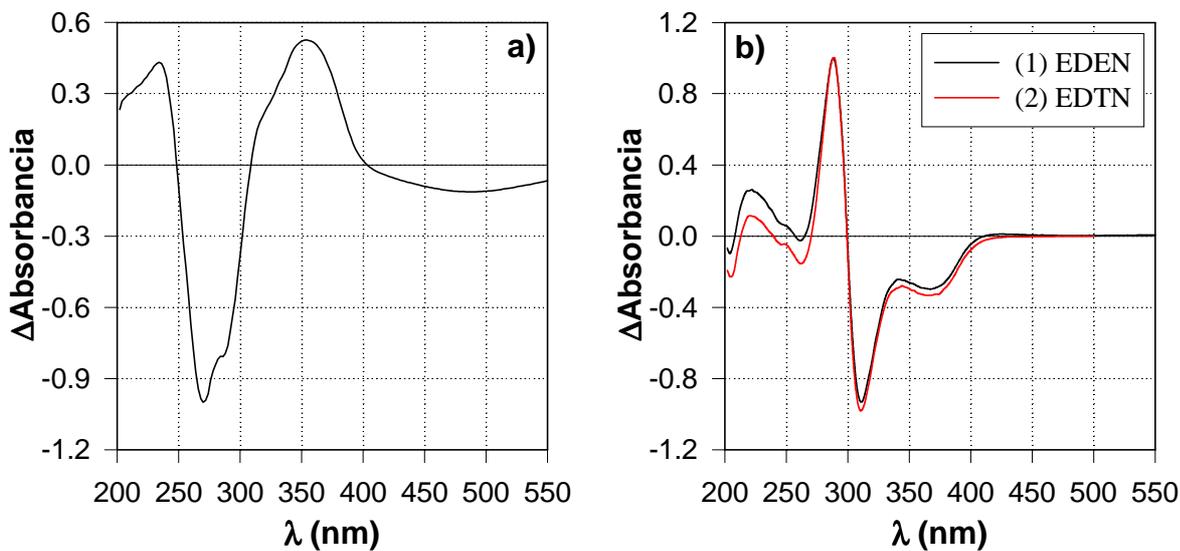


Figura 11.13. a) Espectro DEN obtenido entre los espectros 2 y 3 de la figura 11.11. b) (1) Espectro DEN obtenido entre los espectros 1 y 3 de la figura 11.11. (2) Espectro DTN entre una solución que contiene 6-formilpterina 100 μ M y 6-carboxipterina 100 μ M.

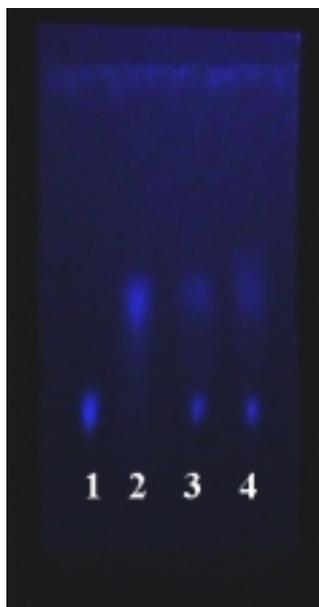


Figura 11.14. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 150 μ M; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 5,5) irradiada con luz de 350 nm; 10 min. y 30 min. respectivamente.

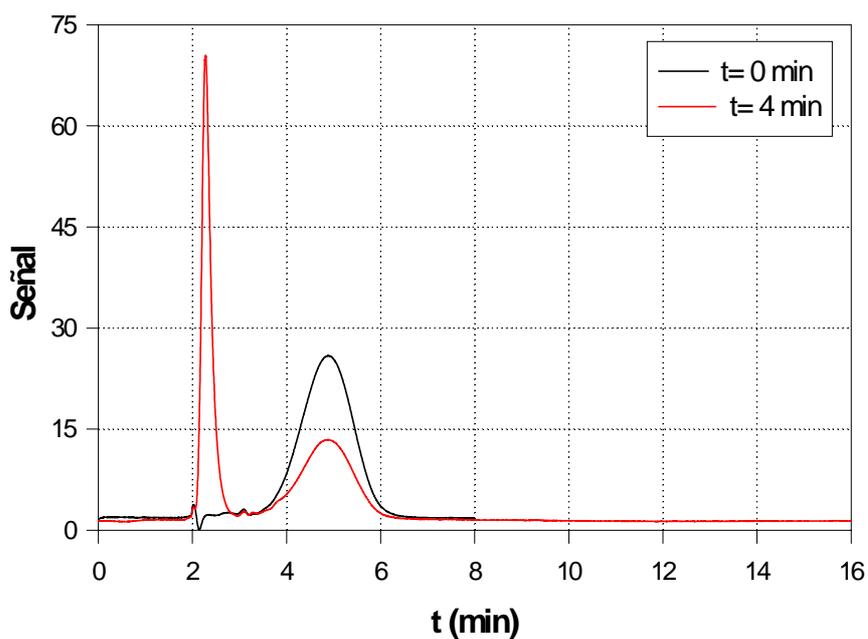


Figura 11.15. Cromatogramas. Solución de 6-formilpterina 150 μM (pH= 5,0) irradiada con luz UV-A de $\lambda= 350 \text{ nm}$. λ de análisis= 340 nm.

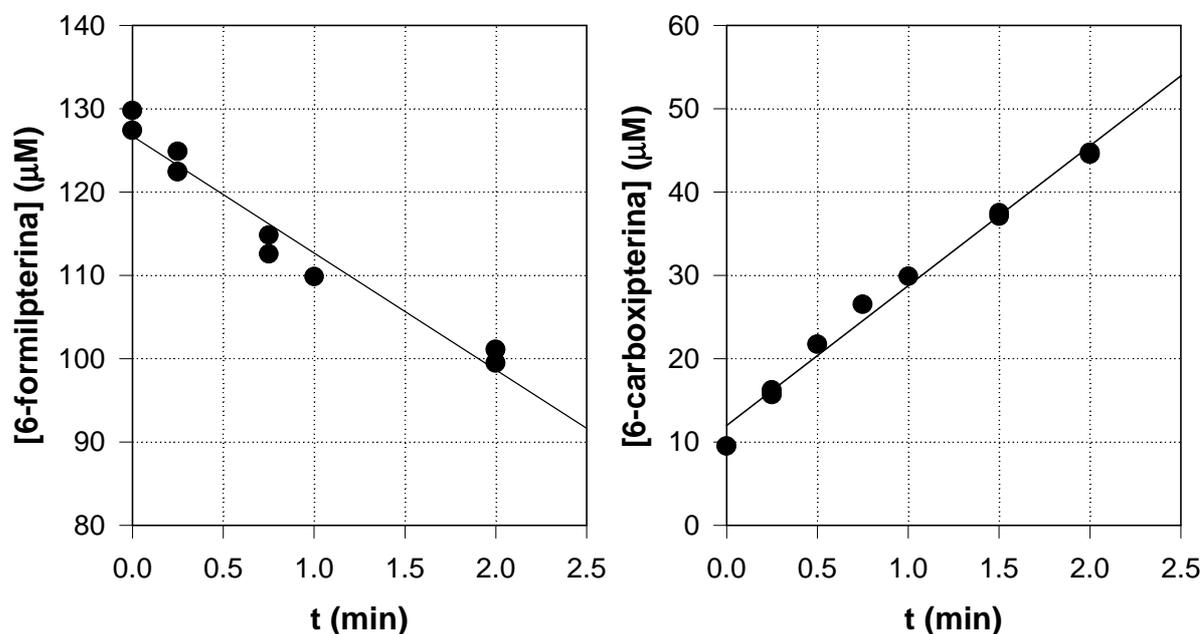


Figura 11.16. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina (130 μM y pH= 5,2).

En el experimento recién descrito, se obtuvieron los espectros de absorción de las

soluciones irradiadas antes de ser aireadas. Luego, como se explicó, se pusieron en contacto con el aire y fueron analizadas por HPLC, obteniéndose las concentraciones de las sustancias involucradas en la reacción para los distintos tiempos de irradiación. A partir de estos datos y el espectro de una solución patrón de 6-formilpterina se obtuvo la evolución de los espectros de dicha sustancia durante el experimento. Pudo, entonces, obtenerse el espectro del "compuesto rojo" de la siguiente manera: para un tiempo de irradiación dado, al espectro de la solución irradiada, pero aún no aireada, se le restó el espectro de la 6-formilpterina (correspondiente a la concentración a ese tiempo determinada por HPLC). Los espectros así determinados a distintos tiempos, se dividieron por la concentración del "compuesto rojo" que es igual a la concentración determinada por HPLC para la 6-carboxipterina, y se promediaron obteniéndose el espectro que se muestra en la figura 11.17.

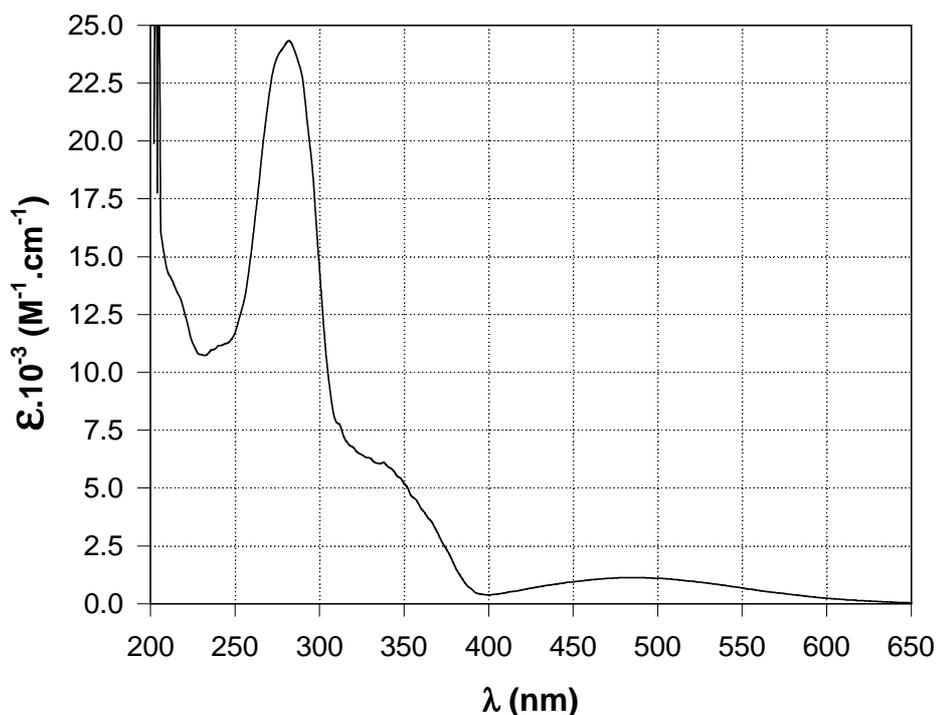


Figura 11.17. Espectro del "compuesto rojo" obtenido según se explica en el texto.

11.4. Estudio de fotólisis de flash.

Se realizaron experimentos de fotólisis de flash empleando la técnica descrita en la sección 8.1 sobre soluciones ligeramente ácidas de 6-formilpterina en presencia de O₂.

Variando la concentración del reactivo y la longitud de onda de análisis se buscaron las condiciones experimentales óptimas. De esta manera, se emplearon soluciones de concentración comprendidas entre 25 y 100 μM y longitudes de onda comprendidas entre 390 y 550 nm. A longitudes de onda superiores no se observan cambios espectrales. Por otro lado, los altos coeficientes de extinción molar de la 6-formilpterina, junto con el relativamente bajo rendimiento cuántico de los procesos observados, evitaron que se pudieran apreciar señales por debajo del mencionado rango espectral.

Las trazas obtenidas son compatibles con la formación de un intermediario que absorbe más luz que la 6-formilpterina a longitudes de onda superiores a 420 nm y que se genera, mayoritariamente, dentro del período de tiempo que dura el flash de luz. Este intermediario se transforma, posteriormente, en un producto estable. La cinética de esta última reacción puede ser analizada debido a que la misma ocurre en el rango de los milisegundos. Se encontró que la amplitud de las señales es máxima a 480 nm; en la figura 11.18 se observa una señal obtenida a dicha longitud de onda.

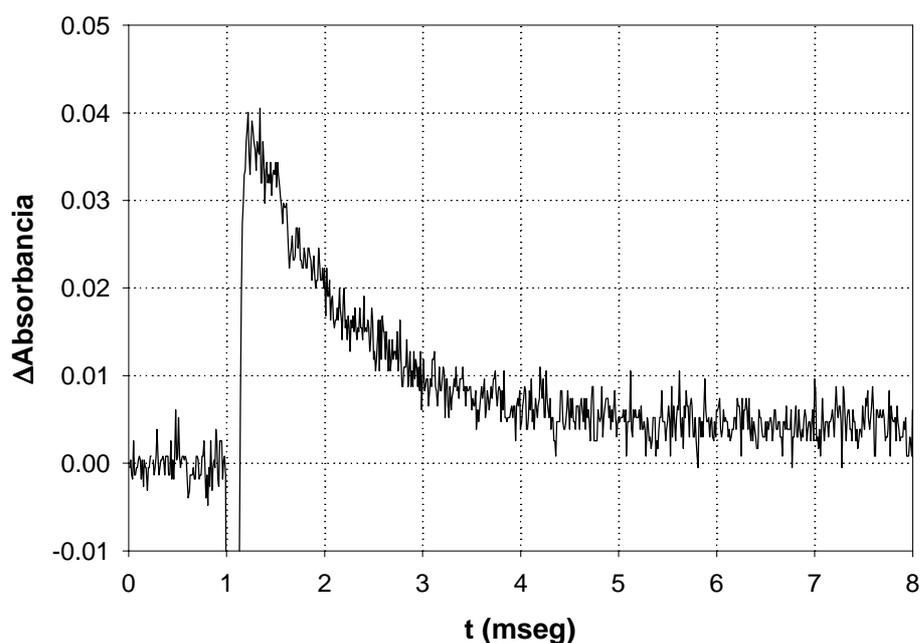


Figura 11.18. Experimento de fotólisis de flash realizado sobre una solución de 6-formilpterina (50 μM , pH= 5,9), en presencia de O_2 .

Se encontró que el proceso observado se ajusta a una cinética de primer orden y que la constante cinética aparente obtenida a partir de las distintas señales es independiente de la longitud de onda. En la figura 11.19 se muestra una de las señales estudiadas. El análisis de

quince señales obtenidas en el rango de longitudes de onda comprendido entre 470 y 490 nm, arrojó un valor de $0,95 \pm 0,09 \text{ mseg}^{-1}$ para la constante cinética aparente (k_{ap}).

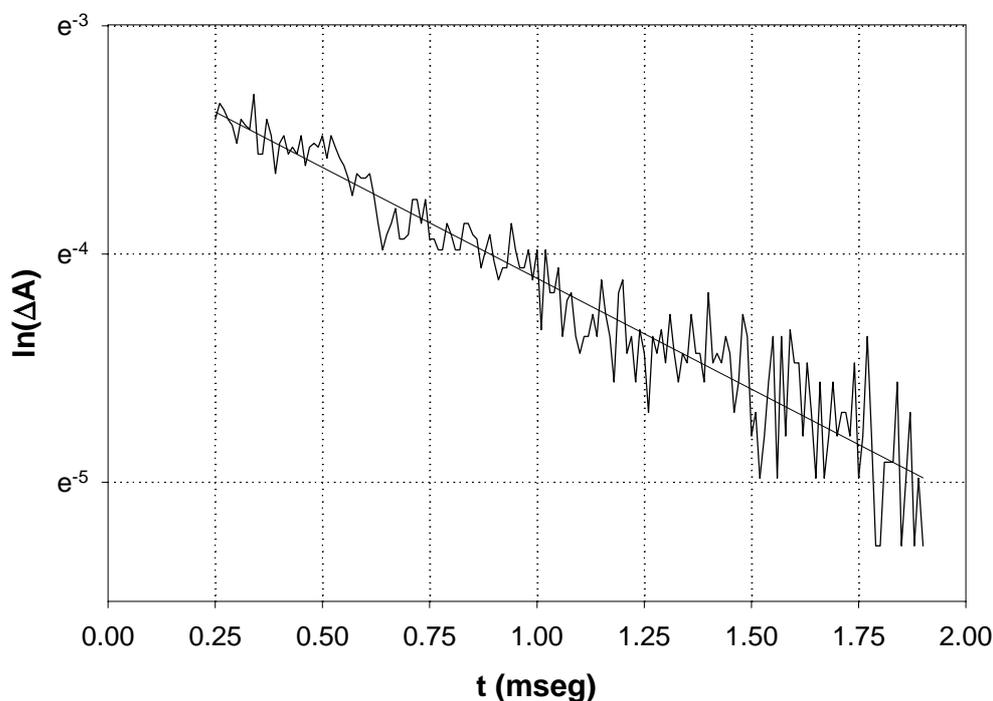


Figura 11.19. Regresión lineal sobre una gráfica en escala logarítmica que muestra el comportamiento cinético de primer orden del proceso analizado.

Como fue demostrado anteriormente, el compuesto rojo es estable en ausencia de O_2 , lo cual implica que, en estas condiciones, el valor de k_{ap} es 0. Puede suponerse que la ecuación de velocidad de la reacción entre el mencionado intermediario y el O_2 es la siguiente:

$$-d[CR]/dt = k \cdot [CR] \cdot [O_2]$$

donde CR es el compuesto rojo y k es la constante de velocidad bimolecular de la reacción.

Por lo tanto, la constante k_{ap} obtenida puede escribirse como:

$$k_{ap} = k \cdot [O_2]$$

Los experimentos de fotólisis de flash fueron realizados con soluciones saturadas en aire y la concentración en agua del O_2 en estas condiciones es $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Con este valor y el obtenido experimentalmente para k_{ap} puede determinarse k . Este cálculo arroja un valor de $3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En la figura 11.20 se muestra un espectro diferencia normalizado obtenido en esta serie de experimentos. El mismo fue construido a partir de la diferencia, a distintas longitudes

de onda, entre la absorbancia un milisegundo después del flash y la absorbancia antes del mismo. En dicha figura se muestra también, con fines comparativos, un espectro DEN obtenido en una fotólisis estacionaria llevada a cabo en ausencia de oxígeno, tal como se detalló en la sección anterior. Puede apreciarse que los puntos correspondientes a los experimentos de fotólisis de flash, si bien presentan una dispersión considerable, son compatibles con el espectro DEN que se obtiene en los experimentos donde se genera el “compuesto rojo” descrito anteriormente.

Estas consideraciones permiten proponer que el intermediario detectado con la técnica de fotólisis de flash es el “compuesto rojo” y que la reacción cuya cinética se ha analizado es la reacción entre dicho intermediario y el O_2 presente en el seno de la solución.

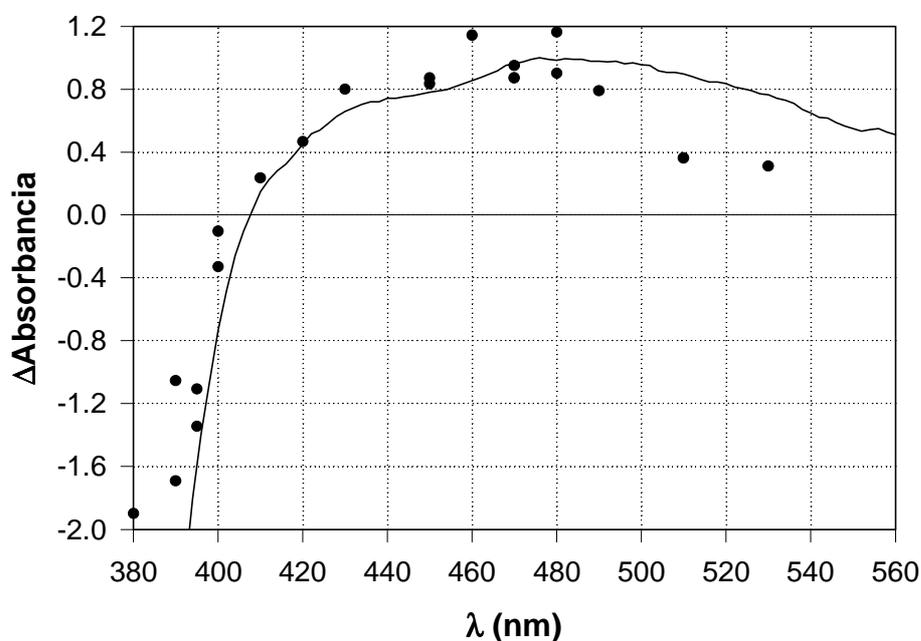


Figura 11.20. La línea corresponde a un espectro DEN obtenido luego de 6 minutos de irradiación en la fotólisis estacionaria descrita en la figura 11.10. Los puntos representan el espectro DEN obtenido en los experimentos de fotólisis de flash 1 milisegundo después del flash.

11.5. Conclusiones

La fotooxidación de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina ocurre a través de un proceso que puede ser dividido en dos etapas. En la primera, la excitación de la molécula conduce a la formación de un “compuesto rojo” con características espectrales muy

6-acil-5,8-dihidropterinas se oxidan rápidamente en presencia de O₂, no se realizó un estudio cinético sobre estas reacciones. Es más, no fueron encontrados en literatura reportes de constantes de velocidad de reacciones de este tipo.