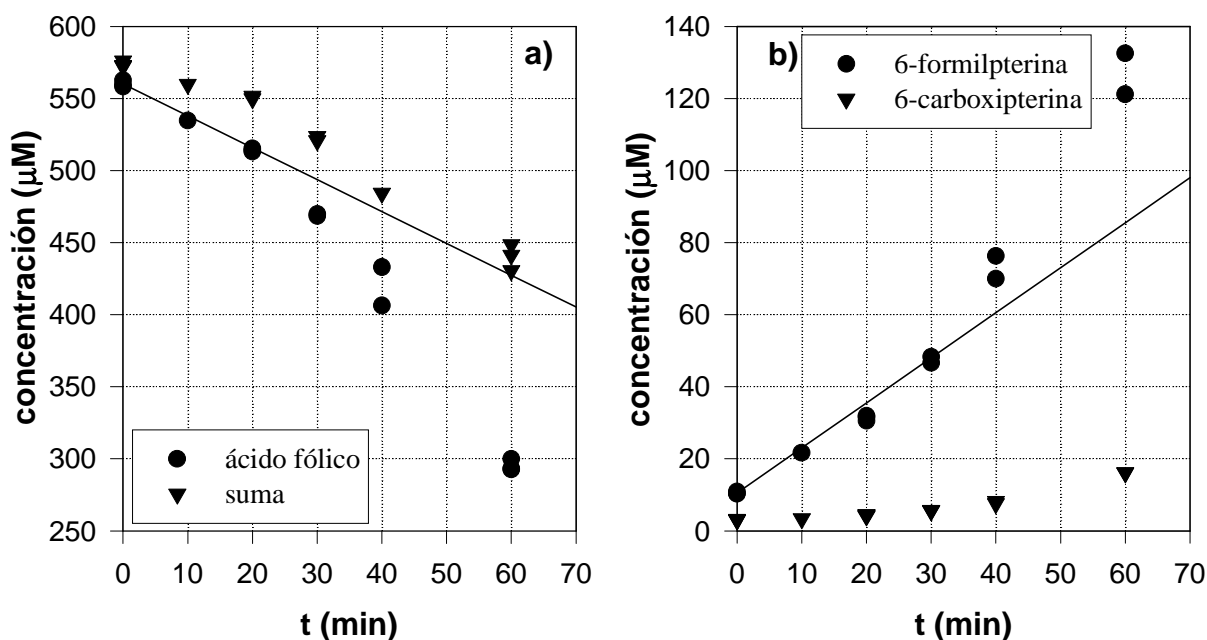


6-formilpterina, estaría indicando un comportamiento similar al de la misma.

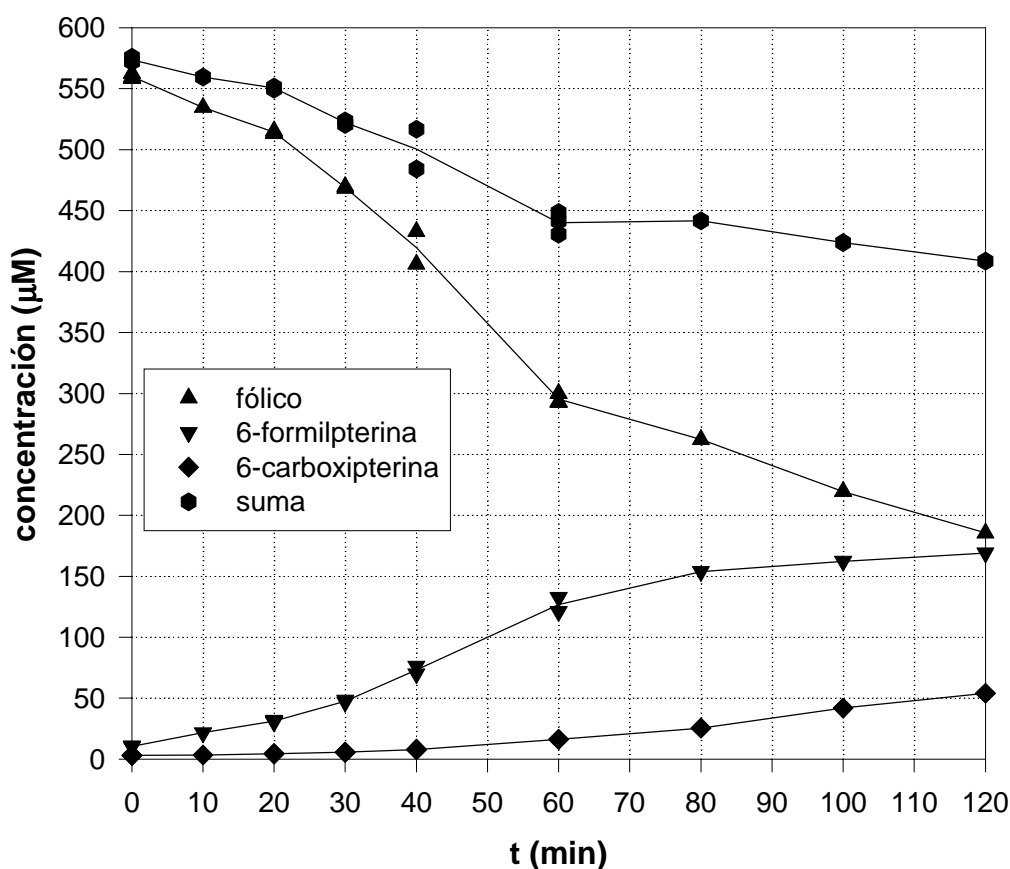


**Figura 13.9.** a) Evolución con el tiempo de irradiación de la concentración de ácido fólico y de la suma de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 13.8.a. b) Evolución con el tiempo de irradiación de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 13.8.b.

Se analizó la presencia de ácido *p*-aminobenzoilglutámico en forma análoga a lo realizado en las fotólisis en medio ácido, es decir empleando el sistema I de corrida (ver capítulo 7). En los cromatogramas de soluciones alcalinas de ácido fólico irradiadas se pudo observar un pico que coincidió en  $t_R$  con el del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Además, tal como puede apreciarse en la figura 13.12, este pico se observa claramente empleando luz de análisis de 280 nm, pero no se detecta a 340 nm, lo cual concuerda con el hecho de que esta sustancia no absorbe luz a esta longitud de onda.

Por otro lado, la solución obtenida con la técnica TLC preparativa mencionada anteriormente, es decir, la solución resultante de extraer la sustancia que corre con el frente del solvente, fue analizada por HPLC, empleando también el sistema I de corrida. El correspondiente cromatograma presenta un solo pico con un  $t_R$  que coincide con el del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Finalmente, se obtuvo, con el sistema de detección del equipo de HPLC, el espectro de absorción de la sustancia responsable de este pico. En la

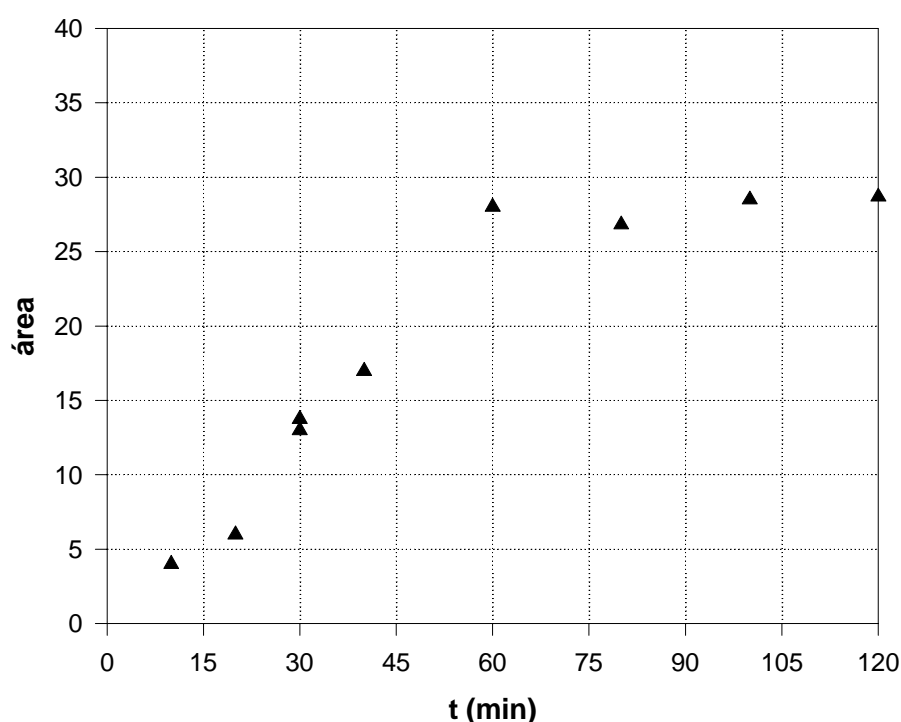
figura 13.13 se muestra este espectro normalizado junto con el correspondiente al del segundo pico del cromatograma de una solución de ácido fólico fotolizada. Además puede observarse el espectro normalizado de una solución patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, obtenido con el espectrofotómetro Cary3. Los tres espectros son muy similares, de lo cual puede desprenderse que, tanto la sustancia extraída en los experimentos de TLC como la sustancia responsable del segundo pico en los cromatogramas de las soluciones irradiadas de ácido fólico son, en efecto, ácido *p*-aminobenzoilglutámico.



**Figura 13.10.** Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante 2 horas de fotólisis de una solución de ácido fólico 560  $\mu\text{M}$  y  $\text{pH}= 11,5$ .

En otro experimento se irradió una solución de ácido fólico y se obtuvieron los cromatogramas a distintos tiempos de irradiación empleando las mismas condiciones de corrida que las de la figura 13.12. La figura 13.14 muestra la evolución del área del pico correspondiente al ácido *p*-aminobenzoilglutámico con el tiempo de fotólisis. Puede observarse un aumento lineal en la concentración de este compuesto en los primeros 20

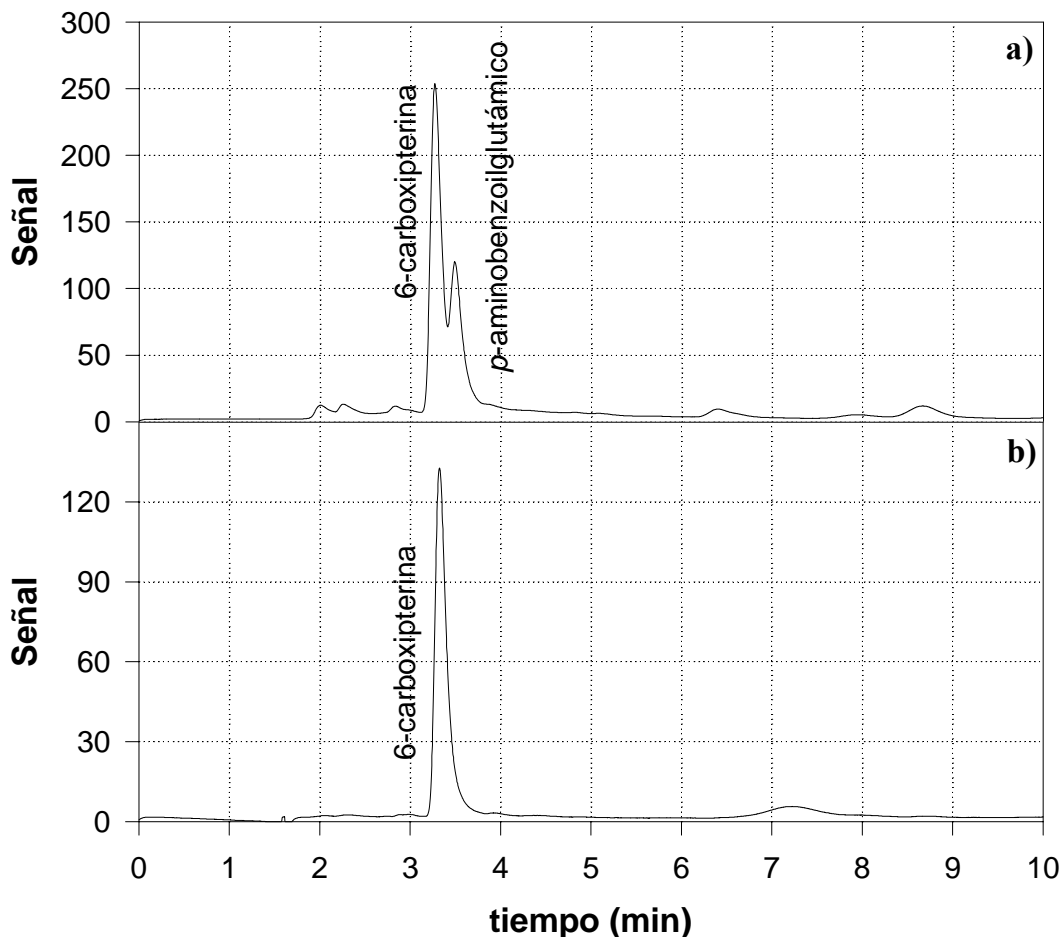
minutos, luego la velocidad de aparición aumenta y finalmente la concentración parece estabilizarse luego de los 60 minutos de irradiación. Este comportamiento es el esperado teniendo en cuenta el perfil de concentración de la 6-formilpterina analizado anteriormente. Sin embargo, estos resultados no pueden compararse cuantitativamente con los mostrados en las figuras 13.8, 13.9 y 13.10 debido a que este experimento fue realizado en otras condiciones experimentales (geometría y concentración inicial de reactivo). Por tal motivo, no se muestra la correspondiente curva de concentración en función del tiempo de fotólisis.



**Figura 13.11.** Evolución del área del pico correspondiente a la sustancia B con el tiempo de irradiación.

Los resultados expuestos hasta ahora indican que, ni la 6-carboxipterina, ni el ácido *p*-aminobenzoilglutámico participan en la reacción térmica que se detectó en las soluciones de ácido fólico irradiadas en medio alcalino. Con el fin de afianzar esta hipótesis, se realizaron experimentos de control del tipo del que se detalla a continuación. Se irradió una solución de ácido fólico (pH=11, 450  $\mu$ M) durante 45 min, luego de lo cual se apagó la lámpara y se inyectó inmediatamente en el equipo una muestra de la solución. El resto de la misma se mantuvo en la oscuridad y, a distintos tiempos, se tomaron sucesivas muestras y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas. Ninguno de las dos sustancias analizadas mostró

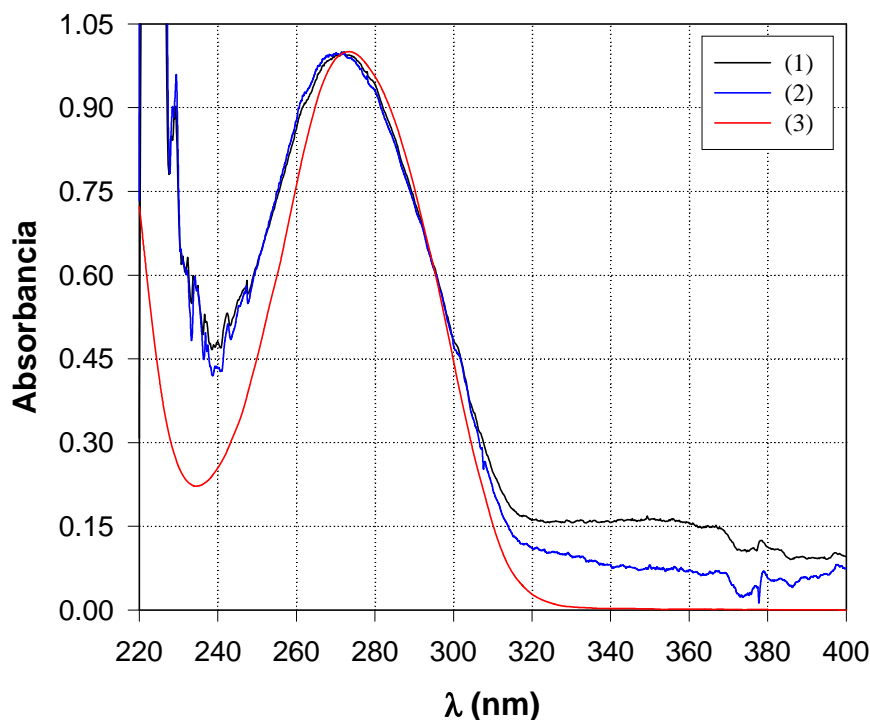
variaciones significativas en el área de sus respectivos picos en más de 2 horas de monitoreo. Como se mostrará más adelante, al valor de pH al cual se realizó este experimento, la vida media de la reacción térmica es de aproximadamente 10 minutos, por lo cual si alguna de las dos sustancias analizadas estuviera involucrada en dicha reacción, se deberían observar cambios en el área de los correspondientes picos cromatográficos.



**Figura 13.12.** Cromatogramas obtenidos al inyectar en el equipo de HPLC una solución de ácido fólico (450  $\mu\text{M}$ , pH= 11,0) irradiada durante 100 min. a)  $\lambda$  de análisis= 280 nm. b)  $\lambda$  de análisis 340 nm.

Como ya fue mencionado anteriormente, el proceso térmico se acelera al aumentar el pH. Teniendo en cuenta esto, se llevó a cabo otro control en el mismo sentido. Se fotolizó durante 50 minutos una solución de ácido fólico (450  $\mu\text{M}$ , pH=11,0). Inmediatamente después de interrumpir la irradiación se separó una alícuota de la muestra irradiada a la cual se le agregó un volumen de solución de NaOH 0,5 M, adecuado como para producir un incremento de pH de por lo menos una unidad. Por último, se compararon las áreas de los picos en sendos

cromatogramas obtenidos a partir de la muestra con y sin el agregado del álcali. Tanto para la 6-carboxipterina como para el ácido *p*-aminobenzoilglutámico no se detectaron variaciones en las áreas de sus picos, corroborando que no participan en la reacción térmica.

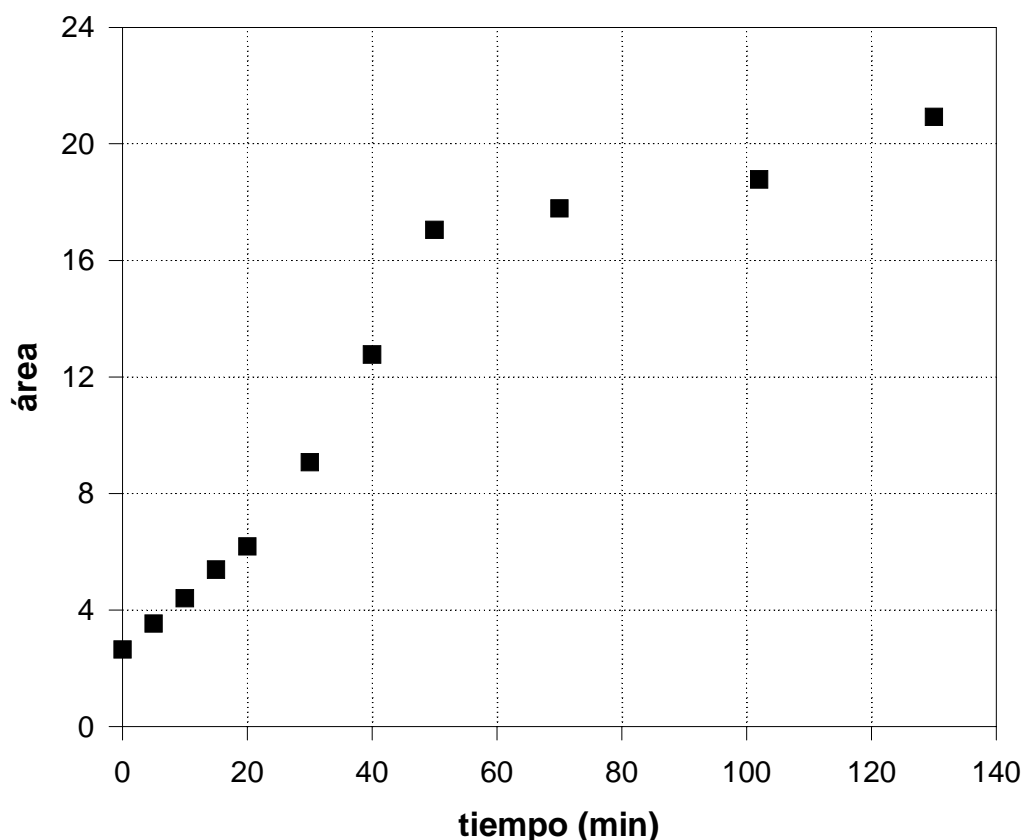


**Figura 13.13.** Espectros normalizados. (1) Sustancia responsable del segundo pico observado en los cromatogramas de soluciones irradiadas de ácido fólico, el espectro fue obtenido con el sistema de detección del equipo de HPLC. (2) Sustancia separada en los experimentos de TLC, el espectro fue obtenido con el sistema de detección del equipo de HPLC. (3) Solución patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, el espectro fue obtenido con el espectrofotómetro Cary3.

En las condiciones de corrida en las cuales se obtuvieron los resultados que sirvieron para analizar el comportamiento de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina (sistema de corrida III) se detecta la presencia de un pico que aparece superpuesto al de la 6-formilpterina. Este pico desaparece si se deja la solución irradiada suficiente tiempo en la oscuridad o si se la alcaliniza. Este comportamiento sugiere que este compuesto es la denominada sustancia A.

Ante estos resultados se buscaron condiciones que permitieran separar este pico de los demás. Ensayando el sistema de corrida IV sobre soluciones irradiadas de ácido fólico, efectivamente este pico ( $t_R=3,15$  minutos) aparece separado del de la 6-formilpterina; sin embargo, este último se solapa completamente con el del ácido fólico. Además, existe un pico

que coincide en  $t_R$  (2,3 minutos) con el de una solución patrón de 6-carboxipterina. Por último, con un  $t_R$  de aproximadamente 8,8 minutos existe otro pico que, como se verá más adelante, puede asignarse a la sustancia **B**. La figura 13.15 muestra un cromatograma típico realizado bajo estas condiciones de corrida.



**Figura 13.14.** Evolución del área del pico del ácido *p*-aminobenzoilglutámico con el tiempo de irradiación.

Se realizó una serie de experimentos para evaluar el comportamiento de estos dos picos que no pudieron identificarse con las soluciones patrones y que se sospechaba pertenecían a las sustancias **B** y **A**. En la figura 13.16 se muestra la variación de las áreas de estos picos, durante la fotólisis de una solución de ácido fólico (450  $\mu\text{M}$ ,  $\text{pH}=11$ ). Nótese que el comportamiento de ambas sustancias es diferente. El área del pico de  $t_R= 3,15$  min (sustancia **A**) crece mucho en los primeros 30 minutos de fotólisis, alcanza un máximo y luego podría tender a disminuir. El área del pico de  $t_R= 8,7$  min (sustancia **B**) crece poco en los primeros 20 minutos, resultando más importante su aumento luego de este período de tiempo.

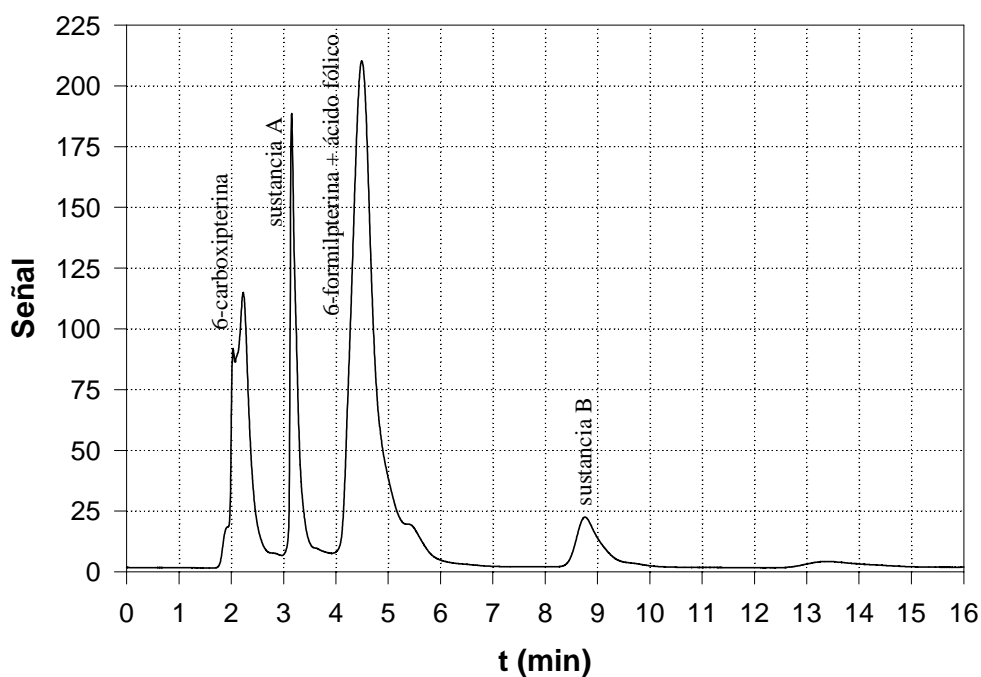


Figura 13.15. Cromatograma de una solución de ácido fólico ( $450 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH}=11$ ) irradiada durante 60 min. Sistema de corrida IV,  $\lambda$  de análisis 340 nm.

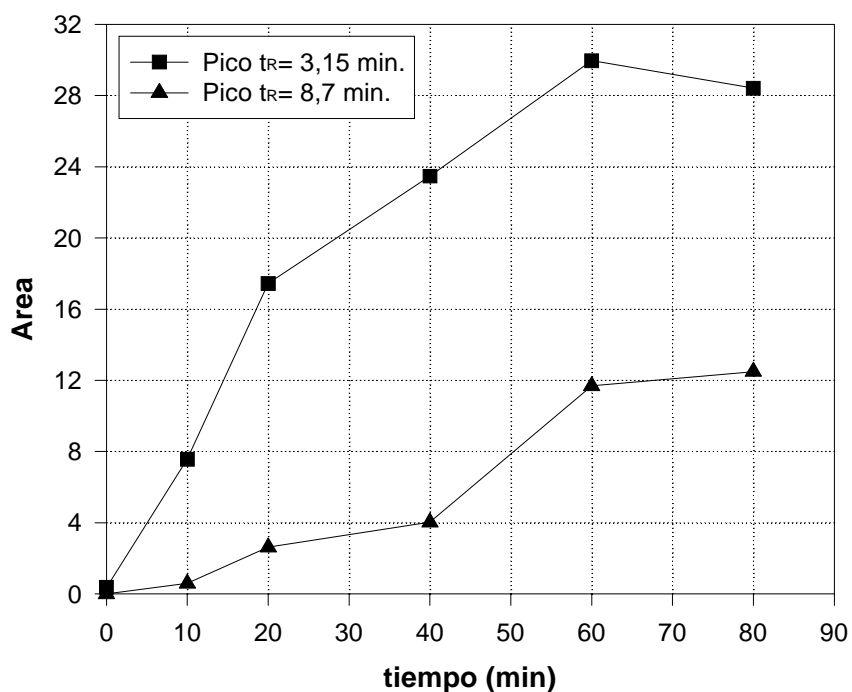
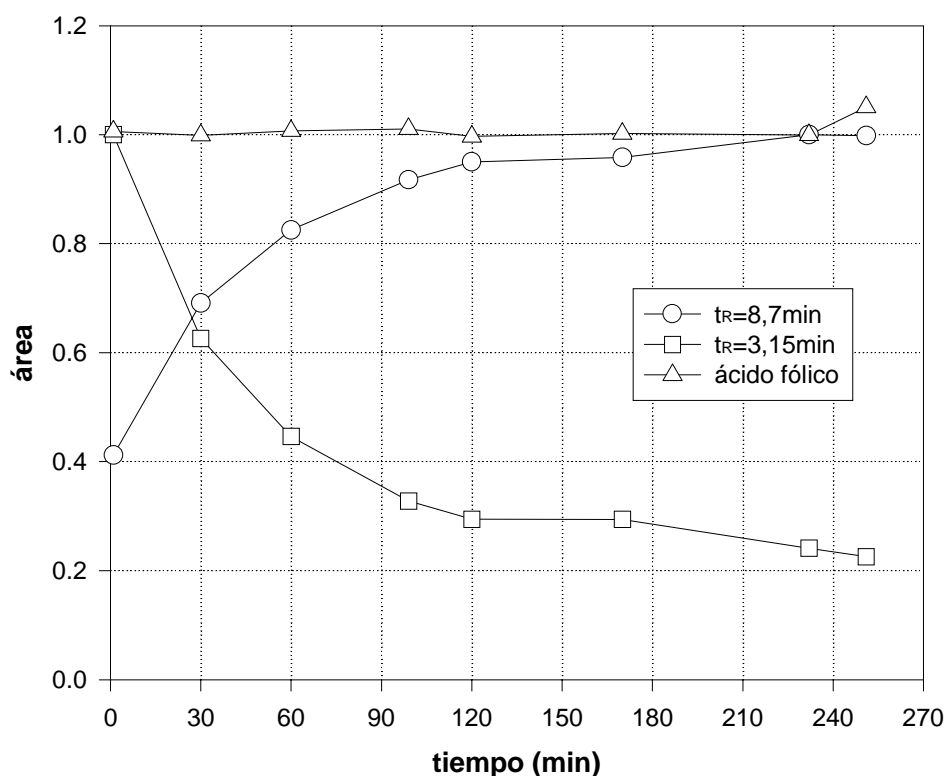


Figura 13.16. Variación del área de los picos de  $t_r$  3,15 (sustancia A) y 8,7 min (sustancia B).

Para corroborar que las sustancias responsables de estos dos picos participan en la

reacción térmica, se realizó otro experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 50 min. Una vez interrumpida la iluminación, la solución se dejó en la oscuridad. Posteriormente, se obtuvieron los correspondientes cromatogramas y se realizaron gráficas de área en función del tiempo, contado a partir de la interrupción de la irradiación de la solución. Estos resultados se muestran en la figura 13.17. Puede observarse claramente que mientras el área del pico de  $t_R = 3,15$  min disminuye con el tiempo, el pico de  $t_R = 8,7$  aumenta su área. Estos resultados sugieren fuertemente que la sustancia resuelta en el primer pico se trata de la sustancia **A**, mientras que el segundo se trata de la sustancia **B**. Se observa también que el área correspondiente al pico que incluye al ácido fólico y a la 6-formilpterina permanece constante durante el período abarcado por este estudio. Este hecho es una evidencia más a favor de la hipótesis de que estos dos últimos compuestos no participan en ningún proceso térmico luego de la irradiación.

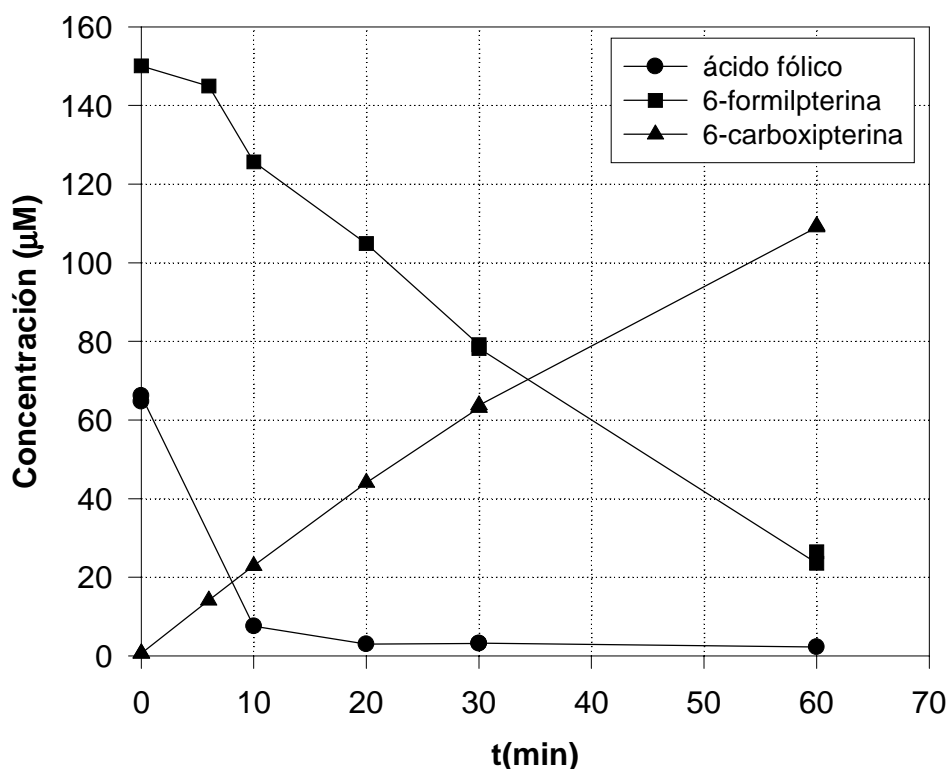


**Figura 13.17.** Variación de los tres picos resueltos en las condiciones de corrida mencionadas en el texto. Para facilitar la comparación de los resultados las áreas están normalizadas. Sistema de corrida IV,  $\lambda$  de análisis 340 nm.

Los resultados de los experimentos de HPLC mostrados hasta aquí han permitido evaluar la evolución de la concentración de las distintas sustancias involucradas en los



procesos estudiados, tanto durante la irradiación como en el proceso térmico subsecuente a la misma. Ahora se analizarán los resultados de un experimento realizado para corroborar que el fenómeno de aumento de la velocidad de descomposición del ácido fólico requiere la absorción de luz por parte de la 6-formilpterina. Este experimento es análogo al mostrado en el capítulo 10 (figura 10.14), en el cual se partió de una mezcla de ambas sustancias. En este caso, se irradió una solución que contenía  $65 \mu\text{M}$  de ácido fólico y  $150 \mu\text{M}$  de 6-formilpterina. La evolución de la concentración de las sustancias analizadas se muestra en la figura 13.18. Puede observarse que se produce una notable disminución en la concentración de ácido fólico en los primeros 10 minutos de fotólisis. La concentración de 6-formilpterina no muestra, como lo hacía en el experimento de la figura 10.14, un aumento inicial. Esto puede deberse a que en este experimento la relación de concentraciones iniciales ha cambiado; por lo cual, la cantidad de 6-formilpterina que se forma en los primeros minutos de fotólisis proveniente del ácido fólico es menor que la cantidad que se consume.



**Figura 13.18.** Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado partiendo de una solución mezcla ( $\text{pH}= 11,0$ ) que contenía  $65 \mu\text{M}$  de ácido fólico y  $150 \mu\text{M}$  de 6-formilpterina.

Se calculó la cantidad de luz incidente que absorbe cada compuesto inicialmente

teniendo en cuenta los respectivos coeficientes de extinción molar a 350 nm, las concentraciones y la cantidad total de luz incidente (para un mayor detalle de este análisis véase sección 10.3).

Considerando despreciable la luz absorbida inicialmente por la 6-carboxipterina, se pueden plantear las siguientes relaciones.

$$A^{AF} = \epsilon_{350}^{AF} \cdot l \cdot [AF] = 6.757 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 6,50 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0,439$$

$$A^{FPT} = \epsilon_{350}^{FPT} \cdot l \cdot [FPT] = 9.779 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 1,50 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} = 1,47$$

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

$$A^T = A^{AF} + A^{FPT} = 0.439 + 1,47 = 1,91$$

Con este dato y conociendo la intensidad de luz incidente ( $I_0$ ) puede calcularse la intensidad de luz absorbida total mediante la siguiente relación.

$$I_a = I_0^v \cdot (1 - 10^{-A^T}) = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min} \cdot (1 - 10^{-1,906}) = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Con este valor, que es prácticamente igual a  $I_0^v$ , se pueden calcular la intensidad de luz inicial absorbida por el ácido fólico y por la 6-formilpterina ( $I_a^{AF}$  y  $I_a^{FPT}$ , respectivamente), es decir en el momento de iniciar la irradiación, a partir de las ecuaciones (1) y (2) planteadas en la sección 10.3.

$$I_a^{AF} = 9,8 \times 10^{-5} \text{ M/min} \quad I_a^{FPT} = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

En este experimento, entonces, el ácido fólico absorbe sólo un 23% de la luz incidente; la 6-formilpterina, por su parte, absorbe un 77%. De esta manera, se parte de una situación en la cual ambas sustancias son excitadas por la irradiación, pero el ácido fólico recibe sólo una pequeña proporción de la misma. Puede calcularse la velocidad inicial de conversión de ácido fólico a 6-formilpterina ( $v_0^{AF \rightarrow FPT}$ ) esperada en estas condiciones, teniendo en cuenta el valor de  $I_a^{AF}$  y el correspondiente rendimiento cuántico ( $\Phi_{AF}$ ), calculado anteriormente.

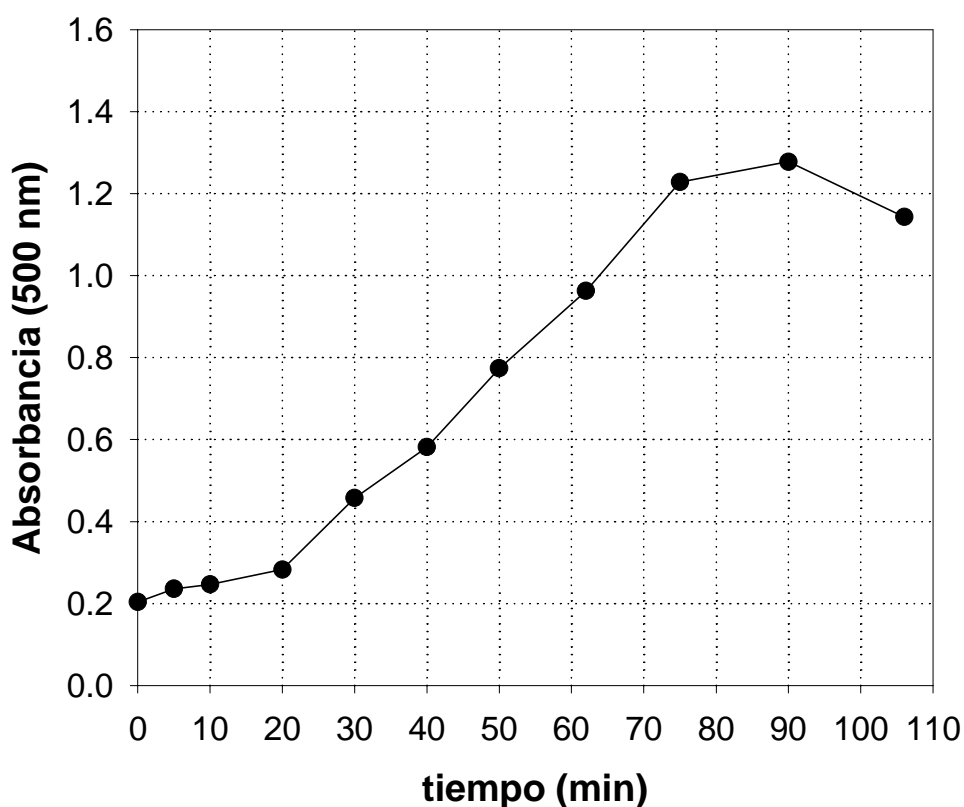
$$v_0^{AF \rightarrow FPT} = \Phi_{AF} \cdot I_a^{AF} = 5,14 \times 10^{-3} \cdot 9,8 \times 10^{-5} \text{ M/min} = 0,50 \text{ } \mu\text{M/min.}$$

Es necesario aclarar que si el mecanismo de estas reacciones involucra al  $^1\text{O}_2$  como intermediario, tal como será demostrado en la sección siguiente,  $\Phi_{AF}$  será dependiente de la concentración del ácido fólico y, por ende, la velocidad inicial que le correspondería sería aún menor a este valor calculado.

Sin embargo, se midió una velocidad global en los 10 primeros minutos de fotólisis para el consumo de ácido fólico de  $5,89 \text{ } \mu\text{M/min}$ . Puede apreciarse que este valor es un orden de magnitud mayor que el esperado. Estos resultados muestran que la velocidad de

fotodescomposición del ácido fólico se ve sensiblemente aumentada en presencia de 6-formilpterina.

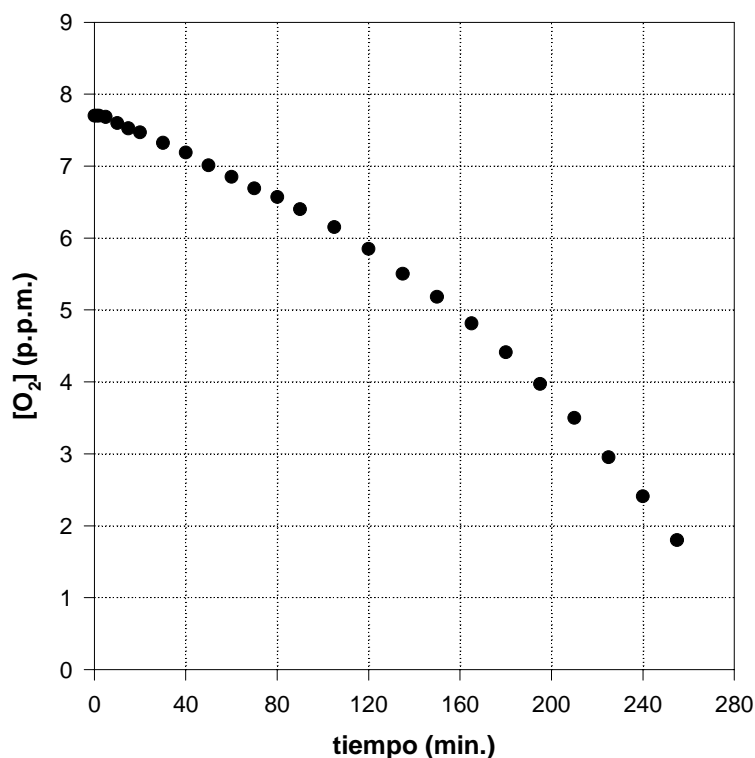
Para finalizar esta sección, se comentarán los resultados de los experimentos en los cuales se realizó la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina sobre soluciones irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Como se explicó anteriormente este ensayo permite monitorear la formación de derivados aldehídicos (sección 7.6.1). En la figura 13.19 se aprecian los resultados de uno de estos experimentos. Si bien esta fotólisis no está realizada en las mismas condiciones que las llevadas a cabo para los análisis por HPLC, puede observarse en ella el mismo comportamiento global que ya ha sido analizado. Es decir, un período inicial de unos 20 minutos en el cual se produce un aumento prácticamente lineal de la concentración de aldehídos. Luego se aprecia un aumento en la velocidad de formación de tales compuestos y, finalmente, se llega a una meseta cerca de los 80 minutos de fotólisis.



**Figura 13.19.** Determinación de aldehídos en una solución de ácido fólico ( $450 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH}=12,0$ ) contenida en un tubo de ensayo e 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.

### 13.2. Papel del O<sub>2</sub> en la fotólisis del ácido fólico.

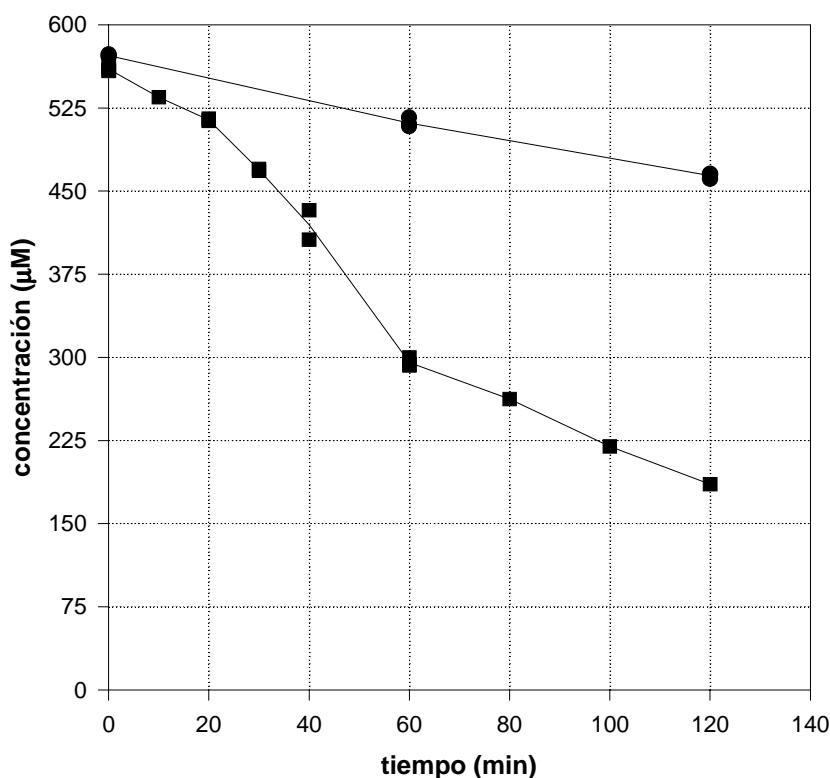
Se midió la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en soluciones de ácido fólico durante la irradiación con el dispositivo electroquímico especificado en la parte experimental. Puede observarse en la figura 13.20 que existe un importante consumo de O<sub>2</sub> durante la fotólisis.



**Figura 13.20.** Evolución de la concentración de O<sub>2</sub> durante la fotólisis de una solución de ácido fólico (450 μM, pH=11,0).

Para investigar la participación del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en las reacciones de fotodescomposición del ácido fólico, se realizaron experimentos de fotólisis en presencia de alcohol furfurílico. Las soluciones irradiadas en estas condiciones experimentales fueron analizadas por HPLC, empleando el sistema III de corrida. Los resultados se muestran en la figura 13.21, junto con los resultados obtenidos en un experimento similar pero realizado en ausencia del secuestrador (datos mostrados en la figura 13.10). Si bien se observa una disminución en la concentración del ácido fólico, la misma es muy pequeña en comparación con la observada en los experimentos realizados en ausencia de alcohol furfurílico. En este experimento no se detectaron aumentos en las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina, en las

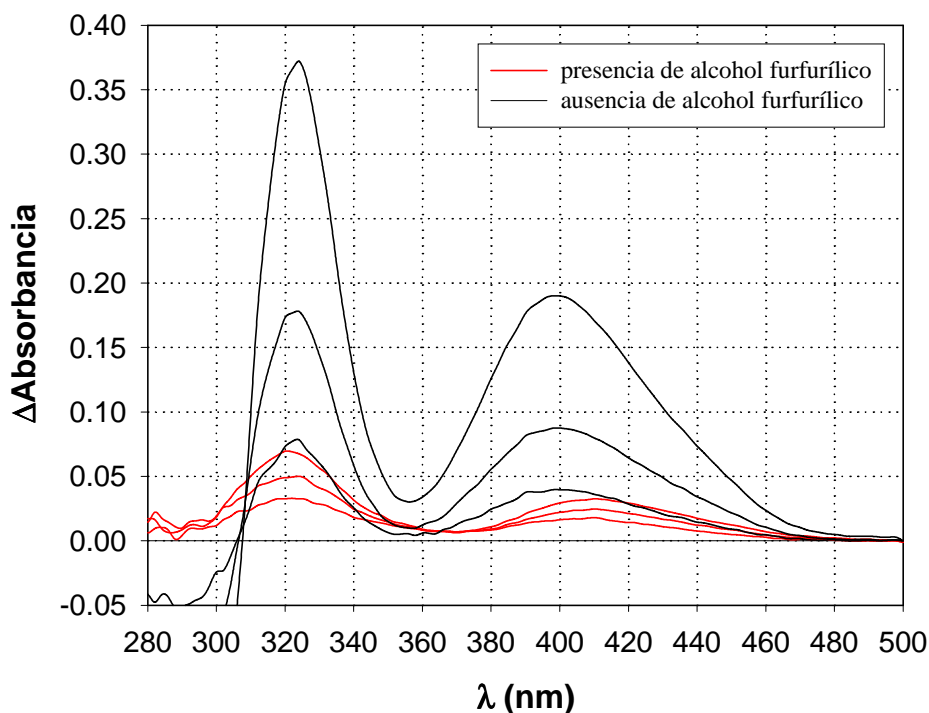
primeras 2 horas de irradiación. Asimismo, no se detectaron los picos de la sustancias **A** y **B** en ninguno de los cromatogramas de las muestras irradiadas analizadas. Estos resultados sugieren que el  $^1\text{O}_2$  es un intermediario fundamental para las dos vías de degradación fotoquímica del ácido fólico. Sin embargo, es necesario mencionar que la disminución de la concentración del ácido fólico podría deberse a la existencia de alguna otra vía de fotodescomposición independiente del  $^1\text{O}_2$  y cuantitativamente poco importante.



**Figura 13.21.** Evolución de la concentración del ácido fólico con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis de una solución de ácido fólico  $570 \mu\text{M}$  ( $\text{pH}=11,0$ ) en presencia de alcohol furfurílico  $10 \text{ mM}$ . (■) Fotólisis de una solución de ácido fólico  $560 \mu\text{M}$  ( $\text{pH}=11,5$ ).

En otra serie de experimentos se analizaron comparativamente los espectros de absorción de soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia y en ausencia de alcohol furfurílico. Estos experimentos fueron realizados a  $\text{pH}=11,8$  y luego de las correspondientes irradiaciones se esperó unos minutos antes de tomar los espectros para que la reacción térmica se completara. En la figura 13.22 pueden observarse estos resultados. Es evidente que, si bien en presencia del secuestrador selectivo se producen cambios espectrales, éstos son de

magnitud mucho menor a los observados en su ausencia. En este caso se analizó sólo la porción del espectros comprendida entre 280 y 500 porque a longitudes de onda menores el alcohol furfurílico presenta absorción muy intensa y no permite obtener los correspondientes espectros DE.



**Figura 13.22.** Espectros DE obtenidos durante sendas fotólisis de una solución de ácido fólico (450  $\mu$ M, pH=11,8). Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. Los espectros mostrados corresponden a 20, 40 y 60 minutos.

Una muestra de una solución de ácido fólico y alcohol furfurílico irradiada durante 80 minutos en las mismas condiciones del experimento que se acaba de describir, fue sembrada y corrida en una placa de TLC junto con una muestra sin irradiar del reactivo. En la figura 13.23 se muestra una fotografía de la mencionada placa. Puede observarse que en la calle correspondiente a la solución irradiada durante 80 minutos no se observa la aparición de 6-formilpterina ni 6-carboxipterina. Puede apreciarse una mancha muy tenue que pertenece a un compuesto que por su  $t_R$  podría ser la sustancia **B**. Teniendo en cuenta la intensidad de esta mancha puede concluirse que la sustancia **B**, si está presente, lo está en concentración muy baja respecto a experimentos similares realizados en ausencia de alcohol furfurílico (figura 13.5).

El análisis espectrofotométrico y por TLC de las soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia del secuestrador selectivo refuerzan la hipótesis planteada: el  $^1\text{O}_2$  participa en ambas vías de fotodescomposición del reactivo, tanto a la que rinde 6-formilpterina como fotoproducto, como la que rinde sustancia A.

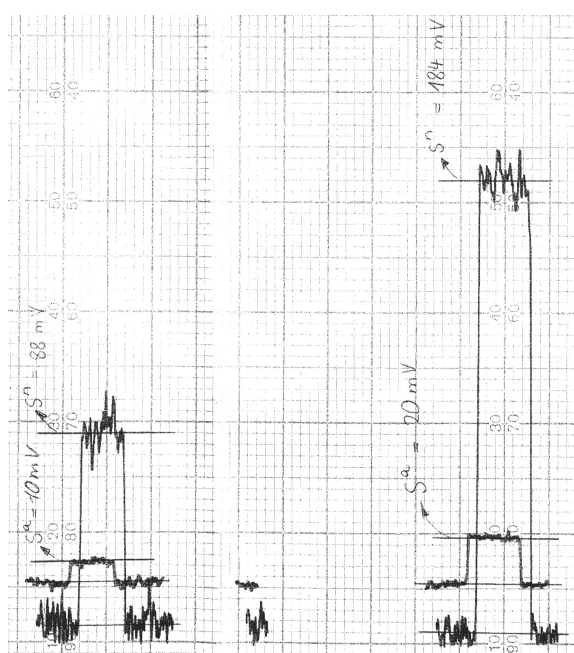


**Figura 13.23.** Corrida de TLC de solución de ácido fólico (450  $\mu\text{M}$ ) y alcohol furfurílico (10 mM). Solvente de corrida  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3,0%(p/v). Calles: 1, solución no irradiada; 2, solución irradiada durante 80 min.

Por otro lado, se realizaron medidas de  $^1\text{O}_2$  en soluciones de ácido fólico y 6-formilpterina disueltos en  $\text{D}_2\text{O}$  (sección 8.3). Para el primer compuesto no pudo detectarse la emisión del  $^1\text{O}_2$  en determinaciones realizadas a valores de pD de 9,04 y 11,40. Estos resultados implican que el rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) es menor al límite de detección del método (aproximadamente 0,03). Esto podría contribuir al menor rendimiento cuántico de fotodescomposición del ácido fólico observado en medio alcalino respecto al medido en medio ácido.

Por el contrario, la 6-formilpterina genera, en medio alcalino, cantidades considerables de  $^1\text{O}_2$ . En efecto, se obtuvo un valor para  $\Phi_\Delta$  igual a 0,31, a pD= 11,40. Este valor es muy próximo al correspondiente a soluciones ácidas (0,33). En la figura 13.24 se muestran las señales obtenidas con una solución de 6-formilpterina en  $\text{D}_2\text{O}$  y las de su correspondiente referencia.

Estos resultados permiten postular una hipótesis sobre el mecanismo de la reacción de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina y ácido p-aminobenzoilglutámico, como así también sobre la aceleración que sufre la misma luego de los 20 minutos de irradiación. Esta hipótesis es similar a la propuesta para la reacción en medio ácido. Es decir, cuando la cantidad de luz absorbida por la 6-formilpterina deja de ser despreciable, este compuesto se transforma en otra fuente de  $^1\text{O}_2$  y, una vez acumulada suficiente cantidad del mencionado compuesto, esta segunda fuente se transforma en la principal. En este caso, no se pudo estimar el valor de la constante cinética bimolecular de la reacción entre el ácido fólico y el  $^1\text{O}_2$  debido a que no se pudo obtener el valor de  $\Phi_{\Delta}$  del ácido fólico en estas condiciones.



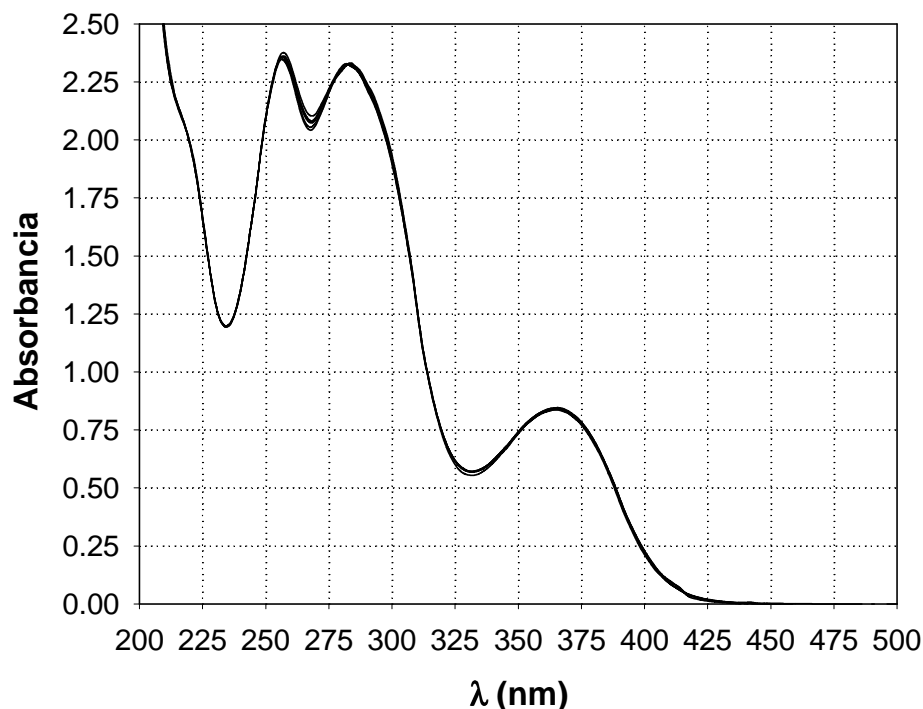
**Figura 13.24.** Determinación del  $\Phi_{\Delta}$  de la 6-formilpterina. Experimento realizado en  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{pD} = 11,40$ ). Las señales de la izquierda corresponden a una solución de 6-formilpterina, mientras que las de la derecha corresponden a una solución de rosa de bengala (referencia).

### 13.3. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de $\text{O}_2$ .

Se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones de ácido fólico previamente burbujeadas con  $\text{N}_2$  para eliminar el  $\text{O}_2$ . Estas soluciones fueron analizadas con el objeto de investigar la existencia de reacciones fotoquímicas en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, al igual que en medio ácido, tales reacciones no fueron detectadas.



La figura 13.25 muestra los espectros de absorción de una solución de ácido fólico irradiada en ausencia de  $O_2$ . Puede observarse que los cambios espectrales son despreciables respecto a experimentos similares realizados en presencia de  $O_2$ .



**Figura 13.25. a) Irradiación de una solución de ácido fólico (450  $\mu$ M, pH= 11,0) en ausencia de  $O_2$ . Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. Los espectros de absorción fueron tomados cada 15 min durante 60 min.**

Soluciones irradiadas en ausencia de  $O_2$  fueron analizadas por TLC. En estos experimentos no se detectó la presencia de 6-formilpterina, ni de 6-carboxipterina. Una sustancia que por su movilidad podría ser la sustancia **B** pudo ser detectada. Sin embargo, la intensidad de las correspondientes manchas es despreciable en comparación con las manchas observadas en experimentos realizados en presencia de  $O_2$ . En la figura 13.26 se muestran fotografías de placas de TLC realizadas en diferentes condiciones.

El análisis por HPLC realizado sobre soluciones irradiadas de ácido fólico muestran que la concentración de este compuesto disminuye muy poco con el tiempo de irradiación (9% en 2 horas) en comparación con el consumo observado en experimentos similares realizados en presencia de  $O_2$  (67% en 2 horas). En la figura 13.26 se presentan los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 120 min. Se muestra, además, comparativamente la evolución de la concentración de ácido fólico en el

experimento expuesto en la figura 13.10. Además los picos correspondientes a la 6-formilpterina y a la 6-carboxipterina no crecen con el tiempo de exposición a la luz UV. Tampoco se detectó la aparición de otros picos.

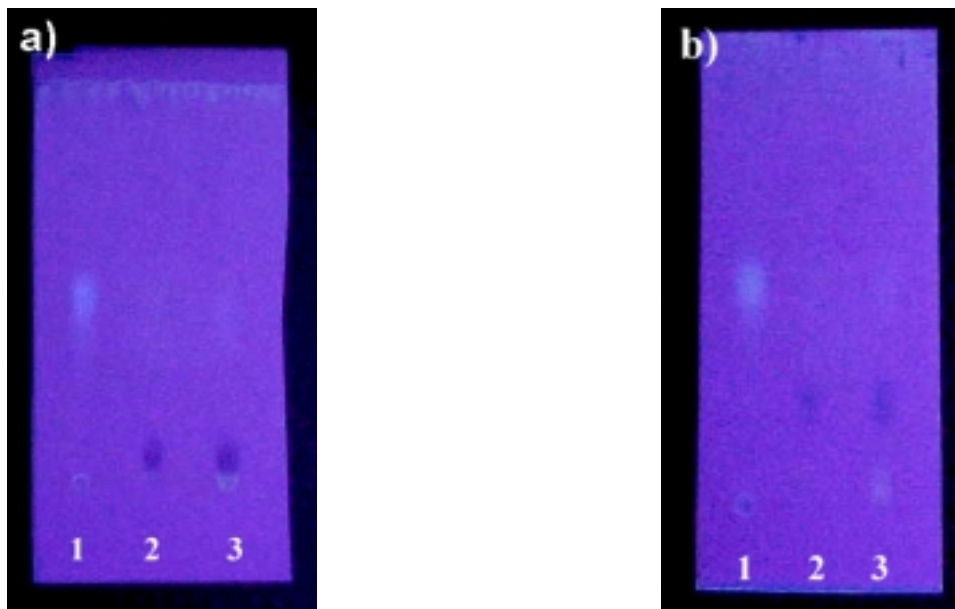


Figura 13.26. Corridas de TLC. a) Solvente de corrida  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,3%(P/V); b) Solvente de corrida  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3,0%(P/V). Calles: 1, solución de 6-formilpterina 150  $\mu\text{M}$ ; 2, solución de ácido fólico 450  $\mu\text{M}$ ; 3, solución de ácido fólico 450  $\mu\text{M}$  (pH=11,8) irradiada durante 60 min con luz UV-A.

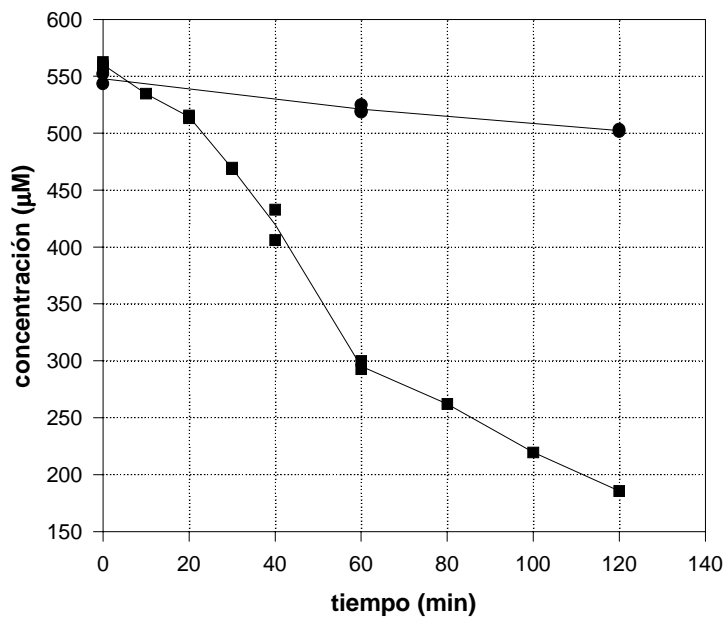


Figura 13.26. (●) Fotólisis de una solución de ácido fólico 550  $\mu\text{M}$  (pH=11,0) en ausencia de  $\text{O}_2$ . (■) Fotólisis de una solución aireada de ácido fólico (560  $\mu\text{M}$ , pH=11,5).

### 13.4. Conclusiones.

Los resultados expuestos en este capítulo permitieron demostrar que la fotoquímica del ácido fólico en soluciones acuosas alcalinas presenta similitudes y diferencias respecto a aquella estudiada en medio ácido. Tanto la 6-formilpterina como el ácido *p*-aminobenzoilglutámico son los productos de la fotooxidación del mencionado reactivo. El mecanismo de esta reacción involucra al  $^1\text{O}_2$  como intermediario reactivo, siendo este generado por el propio ácido fólico. Hasta aquí, el comportamiento es análogo al observado en medio ácido; sin embargo, el análisis de los rendimientos cuánticos de consumo de reactivo y formación de productos muestra que, en primer lugar, el ácido fólico, en iguales condiciones de concentración (600  $\mu\text{M}$ ), es menos fotosensible en soluciones básicas ( $\Phi_{\text{AF}}=5,1 \times 10^{-3}$ ) que en soluciones ácidas ( $\Phi_{\text{AF}}=2,5 \times 10^{-2}$ ). En segundo lugar, no todo el reactivo consumido se transforma en 6-formilpterina, siendo el rendimiento cuántico de formación de este compuesto de sólo  $2,9 \times 10^{-3}$  para las mencionadas condiciones de concentración.

Se detectó la presencia de dos productos de reacción adicionales en las soluciones irradiadas, los cuales no pudieron ser identificados directamente mediante el empleo de soluciones de compuestos patrón y a las que se denominó arbitrariamente sustancias **A** y **B**. La primera es un fotoproducto directo de la fotólisis del ácido fólico, siendo el mecanismo de la correspondiente reacción similar al de la formación de 6-formilpterina; es decir, se trata de una fotooxidación en la cual el  $^1\text{O}_2$  es el intermediario reactivo. La sustancia **B**, por su parte, proviene de la descomposición de la sustancia **A**. Esta transformación es una reacción térmica lo suficientemente lenta como para que ambos compuestos puedan ser detectados, pero cuya velocidad es fuertemente dependiente del pH, acelerándose al aumentar el mismo.

En medio alcalino se observa un efecto de aceleración de la fotólisis cuando la misma avanza que puede ser explicado de la misma manera que en medio ácido. La 6-formilpterina genera, en estas condiciones,  $^1\text{O}_2$ , con una eficiencia ( $\Phi_{\Delta}=0,31$ ) similar a la que muestra en soluciones de pH menor a 7 ( $\Phi_{\Delta}=0,33$ ). El rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  del ácido fólico es, por su parte, muy pequeño. En consecuencia, cuando la concentración del citado 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 degradación del ácido fólico a través de las dos vías

aumenta al avanzar la fotólisis, en vez de disminuir por agotamiento del reactivo.

La figura 13.27 muestra las vías de la fotodescomposición del ácido fólico y el mecanismo que involucra al  $^1\text{O}_2$  como especie activada del  $\text{O}_2$ . Nótese que la diferencia fundamental con el esquema presentado en la figura 10.24, para la fotólisis en medio ácido, radica en que el ácido fólico reacciona por dos vías distintas con el  $^1\text{O}_2$ .

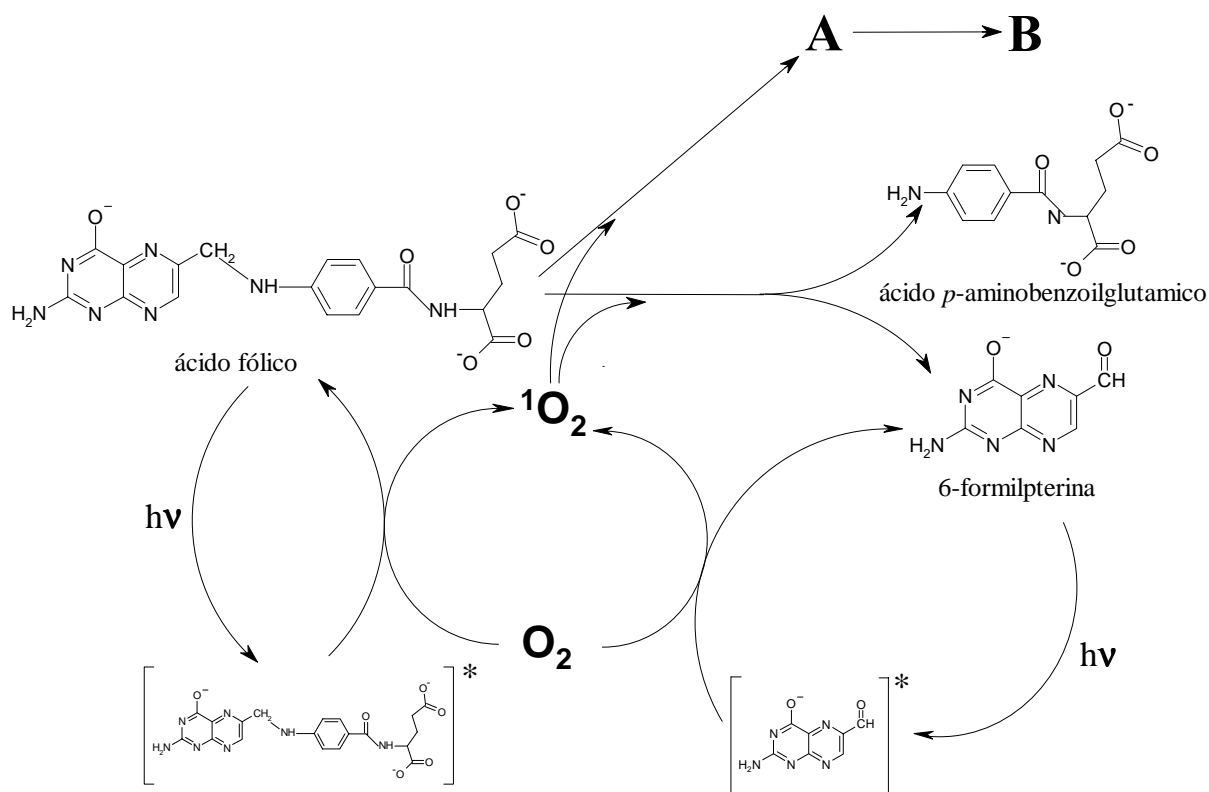


Figura 13.27. Esquema de reacciones desencadenadas por la irradiación de luz UV-A sobre una solución de ácido fólico.