

Capítulo 14.

Caracterización de dos productos de fotólisis

Tal como se mencionó en la sección anterior las denominadas sustancias **A** y **B** no pudieron ser identificadas empleando la metodología que tuvo éxito en la identificación de los otros fotoproductos. Sin embargo, se realizaron una serie de experimentos tendientes a caracterizarlas y estudiar algunas de sus propiedades. En este capítulo se resumen los resultados de tales experimentos y se discuten sus consecuencias.

14.1 Aislamiento y estudio espectrofotométrico.

Se empleó la técnica de TLC preparativa, expuesta en la sección 7.3.2, para aislar a estos dos compuestos. Se sembraron en banda soluciones alcalinas de ácido fólico irradiadas durante períodos de tiempo no menores que 50 minutos. Las corridas se realizaron usando solución acuosa de NH_4Cl 3%(p/v) como fase móvil. En estas condiciones, se obtiene una separación muy buena para la sustancia **A** que presenta un R_f de 0,63 y la sustancia **B** prácticamente no migra, quedando relativamente cerca de la banda del ácido fólico. No obstante, no pudieron encontrarse otras condiciones de corrida que mejoren la separación de esta sustancia.

La sustancia **A** fue separada de la fase estacionaria agitando la suspensión resultante de raspar su banda con el propio solvente de corrida (NH_4Cl 3%(p/v)). La sustancia **B**, por el contrario, no pudo ser extraída de la misma manera, pero se logró separar con una solución de HCl 0,5 M.

De este modo, se obtuvieron soluciones lo suficientemente concentradas como para poder obtener buenos espectros de absorción. Debe aclararse que todos los espectros que se

mostrarán en este capítulo presentan absorción relativamente muy elevada en el rango comprendido entre 200 y 240 nm, aproximadamente. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que todas las soluciones preparadas por esta vía, a pesar de haber sido centrifugadas y filtradas, presentan algo de material sólido en suspensión proveniente de la fase estacionaria de las placas de TLC. Esto provoca cierta dispersión de la luz que se hace muy evidente en esa zona del espectro. Por otra parte, estas soluciones contienen concentraciones elevadas de sales que pueden absorber luz a longitudes de onda cercanas a 200 nm. Además, debido a que las cantidades relativas del material remanente y de la sustancia extraída son diferentes para diferentes experimentos, puede apreciarse, en algunos casos, que dos soluciones de la misma sustancia presentan diferencias cualitativas en la mencionada región del espectro.

Del análisis espectrofotométrico se obtuvo información sobre la estabilidad térmica y fotoquímica de los compuestos estudiados. Se estudió también la influencia del pH sobre los espectros. A continuación se muestran, por separado, los resultados obtenidos para la sustancia **A** y para la sustancia **B**.

14.1.1. Sustancia A.

En la figura 14.1 se muestra el espectro de absorción de una solución de la sustancia **A** en NH_4Cl 3%(p/v) (pH=5,5). El mismo presenta características similares a las de otros derivados pterínicos, es decir, dos bandas; una, más intensa, a longitudes de onda menores a 300 nm y otra, menos intensa, a longitudes de onda mayores. La sustancia **A** parece ser estable térmicamente en estas condiciones, ya que no se observaron cambios espectrales cuando las soluciones analizadas fueron dejadas en la oscuridad durante varios días.

El estudio del efecto del pH sobre el espectro de la sustancia **A** reveló dos propiedades claramente distinguibles. Cuando se agregó álcali a una solución de sustancia **A** se observó, en primer lugar, un gradual cambio en el espectro en el cual la banda más intensa se corre hacia el ultravioleta y se hace más intensa aún; y la menos intensa se corre hacia el visible. Este cambio, que puede apreciarse en la figura 14.2, es reversible; es decir, se observó que al volver a disminuir el pH el espectro original se recuperaba. Este comportamiento, típico de un equilibrio ácido-base, está presente en el rango comprendido entre 5,5 (pH original de la solución recién extraída) y 9,0. Debe recordarse que en este rango de pH existe el equilibrio ácido-base amida-fenolato de la porción pterínica de los derivados estudiados en el capítulo 9. Además el sentido en el cual se modifica el espectro es similar al observado para dichos

compuestos. Por lo tanto, el comportamiento espectral observado para la sustancia **A**, muy posiblemente, responda al desplazamiento del mencionado equilibrio.

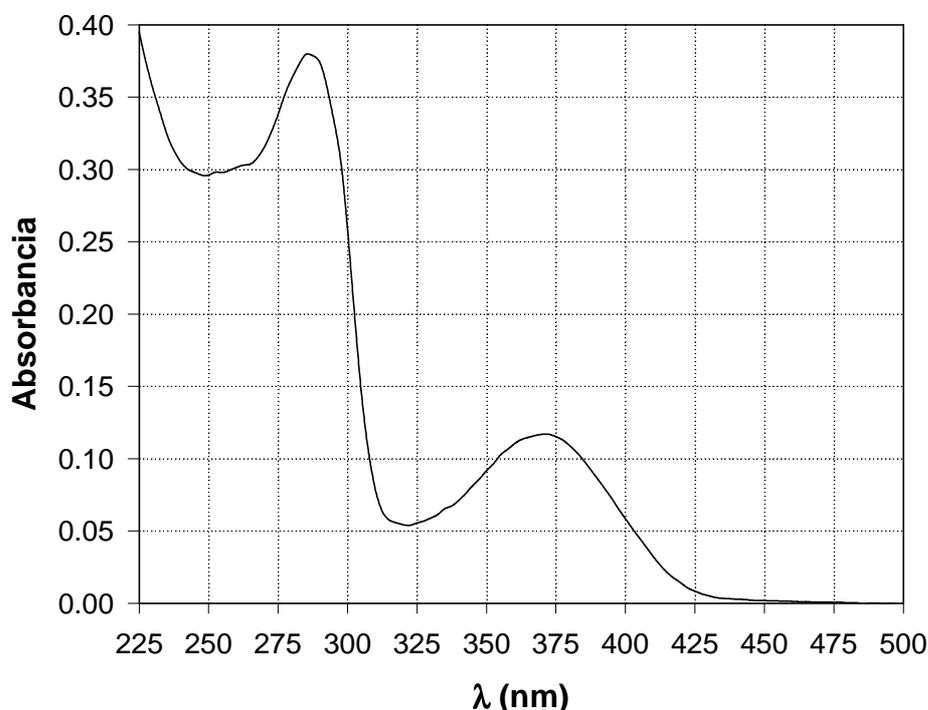


Figura 14.1. Espectro de absorción de una solución de la sustancia **A** en NH_4Cl 3%(p/v) (pH=5,5).

Los espectros DE de esta transformación (no mostrados), que fueron definidos como la diferencia entre los espectros de soluciones de pH mayor que 5,5 y el correspondiente a la solución a este pH (solución de partida) son, obviamente, muy diferentes a los espectros DE correspondientes al proceso térmico observado luego de la fotólisis del ácido fólico. Asimismo, debe aclararse que los espectros mostrados en la figura 14.2 presentan entre sus dos bandas principales una banda de baja intensidad en la zona comprendida entre 305 y 330 nm. La misma, como se comprenderá en breve, corresponde a la sustancia **B** que está presente en estas soluciones en baja proporción.

Por otro lado, se realizó otra serie de experimentos en la cual soluciones alcalinizadas de sustancia **A** fueron mantenidas en la oscuridad y a distintos tiempos fueron tomados sus espectros. Se observó que estas soluciones si eran alcalinizadas hasta un pH superior a 8, cambiaban su espectro irreversiblemente con el tiempo, indicando que dicho fotoproducto no es estable en tales condiciones. También se comprobó que la velocidad de estos cambios

dependía del pH. En efecto, las soluciones con valores de pH entre 8 y 9 modifican su espectro muy lentamente, durando el proceso varias horas. Por el contrario, si las soluciones se alcalinizan hasta un pH cercano a 12, la transformación es casi instantánea. En la figura 14.3.a pueden observarse los espectros de dos alícuotas de una misma solución. Una de ellas fue alcalinizada hasta pH 8,7 y se tomó el espectro inmediatamente después de realizar esta operación (corresponde a uno de los espectros mostrados en la figura 14.2). La otra fue alcalinizada hasta pH 12,7. Cabe aclarar que el volumen de base agregado a cada alícuota es despreciable.

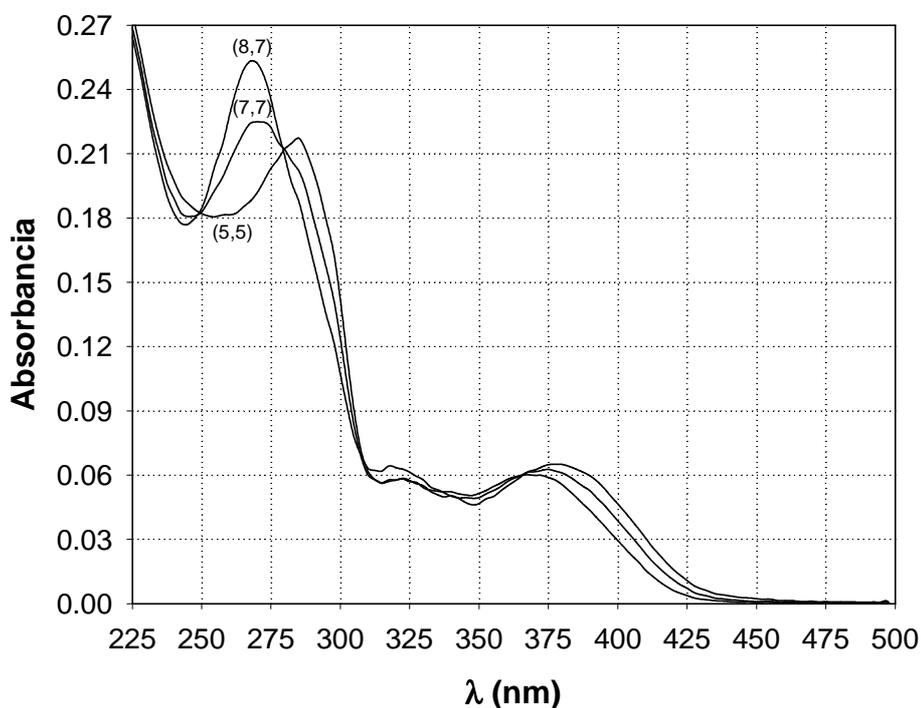


Figura 14.2. Espectros de soluciones de la sustancia A a distintos valores de pH, los cuales se especifican entre paréntesis.

Se obtuvo un espectro DE restando al espectro de la solución de pH 12,7 el espectro correspondiente a la solución de pH 8,7. Luego este espectro fue normalizado obteniéndose un espectro DEN, el cual se comparó con espectros DEN obtenidos luego de la fotólisis del ácido fólico, en diversos experimentos. Como puede verse en la figura 14.3.b estos espectros son muy parecidos entre sí, confirmando que el citado proceso térmico es la transformación de la sustancia A. Además, si tal como se concluyó de los resultados de los experimentos de TLC y HPLC expuestos en el capítulo anterior, el producto de este proceso es la sustancia B,

el espectro de la solución de pH 12,7 mostrado en la figura 14.3.a debe pertenecer a esta sustancia.

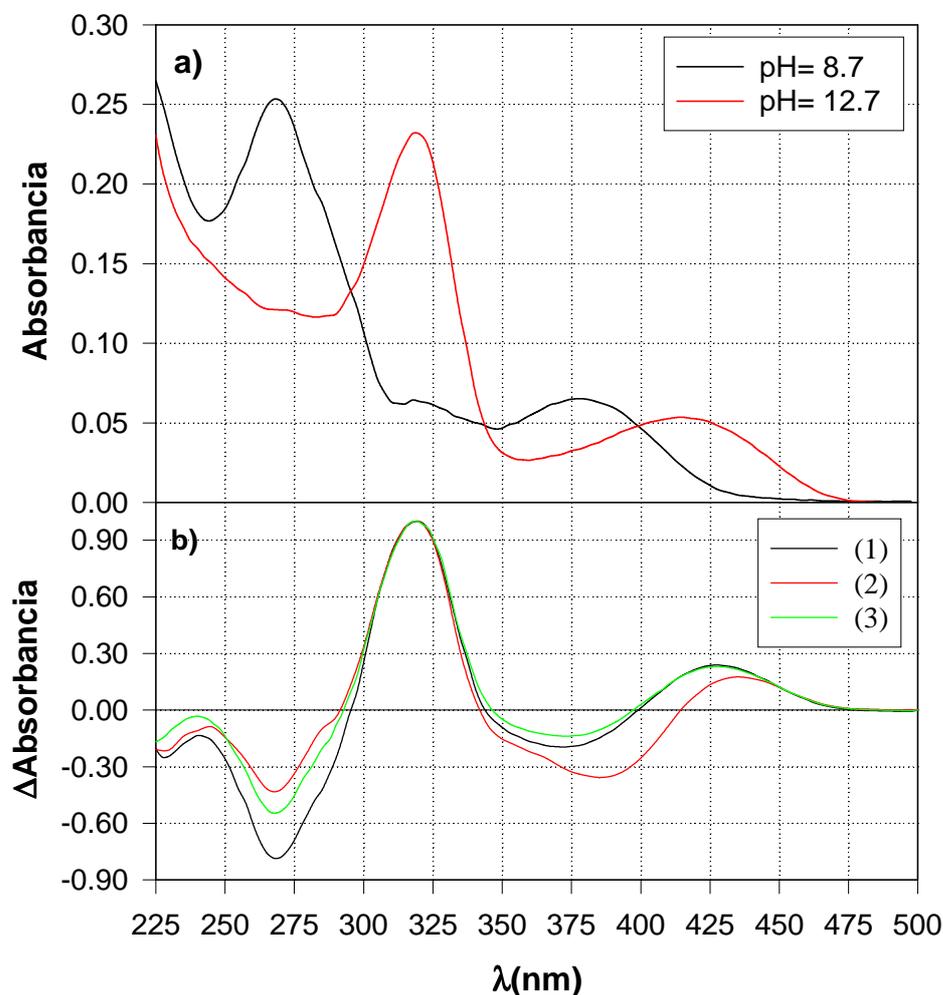


Figura 14.3. a) Espectros de absorción de una solución de la sustancia A obtenida mediante TLC preparativa y alcalinizada. b) Espectros DEN. (1) Obtenido de la diferencia entre los espectros de la figura a). (2) y (3) Obtenidos en experimentos de fotólisis de ácido fólico, luego de interrumpir la irradiación.

Además pudo comprobarse que estos cambios espectrales, como se mencionó anteriormente, son irreversibles; es decir, si una solución dejada unos minutos a pH 12, es luego acidificada hasta pH 8, el espectro no se modifica. Estos resultados sugieren que en medio alcalino, la sustancia **A** es inestable en la oscuridad y se transforma en otra sustancia estable, cuyo espectro no se modifica en el rango de pH comprendido entre 8 y 12.

En conclusión, los resultados del estudio espectral presentado en esta sección pueden

interpretarse de la siguiente manera. Cuando una solución de la sustancia **A** en NH_4Cl 3% (p/v) es alcalinizada gradualmente, primero se observa la transformación de su forma ácida a su forma alcalina. Esta última es inestable y se transforma a otra sustancia (**B**). Esta reacción es fuertemente dependiente del pH, aumentando su velocidad al aumentar el pH.

14.1.2. Sustancia B

La figura 14.4 muestra el espectro de absorción de la solución que se obtiene al realizar la extracción de la fracción **B** de las placas de TLC con HCl. Este espectro sufre modificaciones significativas cuando la solución es alcalinizada, observándose al menos tres espectros diferentes para distintos rangos de pH, los cuales podrían corresponder a las formas protonada, neutra y negativa del anillo pterínico.

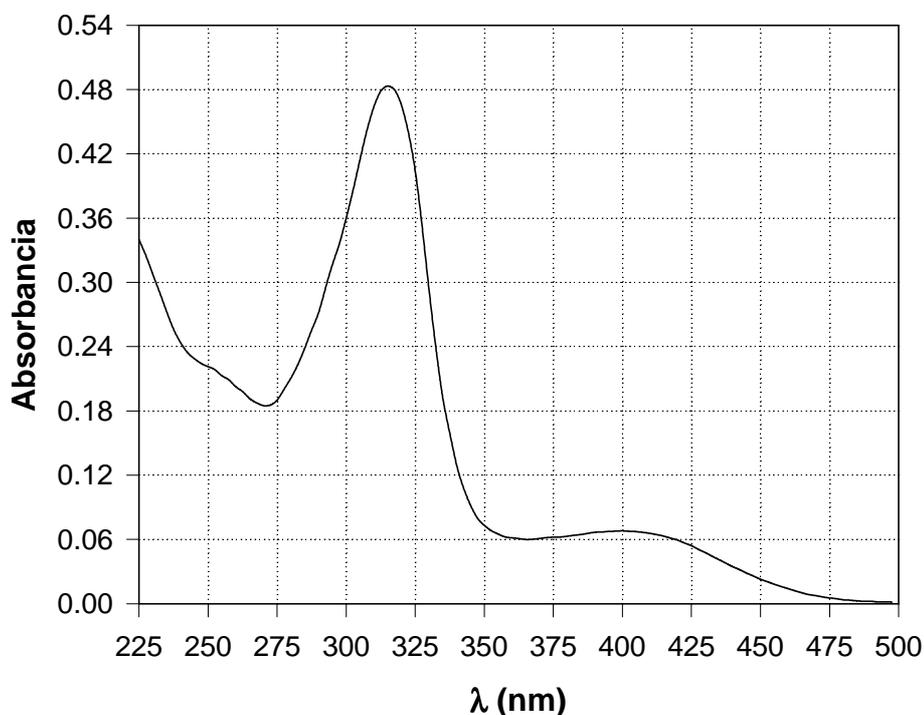


Figura 14.4. Espectro de una solución resultante de extraer la banda correspondiente a la fracción **B** con HCl 0,5 M.

En la figura 14.5 se muestra el espectro normalizado de esta solución llevada a pH 11 y el espectro normalizado de una solución de sustancia **A** alcalinizada y dejada en la oscuridad un tiempo suficiente para que la transformación térmica finalice. Puede observarse que, si bien la banda de absorción más intensa, tiene su máximo a la misma longitud de onda

para ambos espectros, existen diferencias significativas entre ambos. Estas diferencias podrían explicarse teniendo en cuenta que el R_f de la sustancia **B** es próximo al del ácido fólico y que, por ende, las bandas de estos dos compuestos se encuentran parcialmente solapadas. Por lo tanto, la solución de la sustancia **B** puede estar contaminada con ácido fólico.

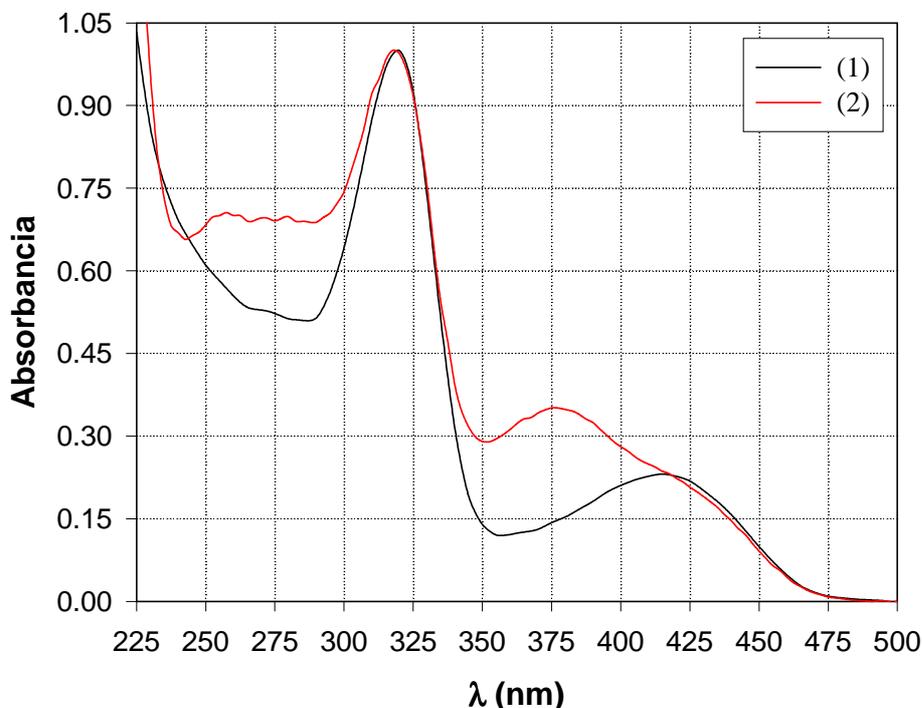


Figura 14.5. (1) espectro normalizado de una solución de sustancia **A** alcalinizada. (2) Espectro de una solución resultante de extraer la banda correspondiente a la fracción **B** (pH= 11).

14.2. Estudios adicionales realizados en soluciones de las sustancias **A** y **B**.

Una serie de experimentos fueron realizados sobre alícuotas de las soluciones preparadas mediante la técnica TLC preparativa. En el caso de la sustancia **B** estas pruebas se realizaron tanto con soluciones provenientes directamente de la extracción de la banda donde corre la sustancia **B**, como con soluciones de la sustancia **A** transformadas en **B** mediante alcalinización.

14.2.1. Análisis por TLC de solución alcalinizada de sustancia A.

Toda la evidencia mostrada hasta aquí indica que la sustancia **A** se transforma en la sustancia **B**. Esta hipótesis se puso a prueba mediante un experimento muy sencillo. Se tomó una porción de solución de sustancia **A**, se la alcalinizó hasta pH 11 y se la dejó 30 minutos en la oscuridad para completar la reacción térmica. La solución resultante fue analizada por TLC. Se encontró una mancha con color y R_f coincidentes con los de la sustancia **B**, presente en las soluciones irradiadas de ácido fólico. Por lo tanto, este resultado corrobora la citada hipótesis.

14.2.2. Investigación de aldehídos.

Por otro lado, se investigó la presencia de aldehídos en las soluciones estudiadas mediante la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. Este ensayo se realizó sobre la solución de sustancia **A** originada en la extracción de la correspondiente banda. También se realizó sobre una solución producto de la extracción de la fracción **B** que previamente fue neutralizada con Na(OH). En ambos casos el resultado fue negativo. Para corroborar dicho resultado se concentraron por evaporación las dos soluciones y se repitió el ensayo siendo, para ambas, una vez más, negativo. Se obtuvo el mismo resultado a partir de una solución de sustancia **B** generada alcalinizando una solución de sustancia **A**. En consecuencia, puede concluirse que ambas sustancias carecen de la función ceto o la función aldehído. Como control se realizó la extracción de la banda en la cual corre la 6-formilpterina dando, en esta oportunidad, un resultado positivo.

14.2.3. Irradiación con luz UV-A.

La sustancia **A** en NH_4Cl 3% (p/v) (pH= 5,5) fue irradiada durante 60 minutos. En este tiempo no se observaron modificaciones en el espectro de la solución, lo cual sugiere que la sustancia **A**, en estas condiciones experimentales, además de ser estable en la oscuridad, es fotoestable.

Se preparó una solución alcalina de sustancia **A** mezclando 1 mililitro de una solución de la misma en NH_4Cl 3% (p/v) con 3 mililitros de buffer fosfato (0,2 M) de pH 11,25. La solución resultante de pH= 9,45 fue irradiada. En este caso, se observaron cambios espectrales, pero los mismos obedecen a la reacción térmica y no a una fotodescomposición. Se arribó a esta conclusión debido a los resultados obtenidos en un experimento control en el

cual se preparó otra solución exactamente de la misma manera, pero la cual no fue fotolizada. Se tomaron espectros de esta solución a distintos tiempos luego de su preparación. Por último, se compararon los espectros DE y los espectros DEN obtenidos en ambos experimentos, siendo los mismos prácticamente iguales. Puede concluirse pues, que la forma alcalina de la sustancia **A** también es fotoestable. Además, queda claro que la luz UV-A no tiene ningún efecto sobre la transformación de **A** a **B**; es decir, esta reacción no se inhibe ni se acelera como consecuencia de la irradiación.

Asimismo se realizaron experimentos de fotólisis de la sustancia **B**. En este caso, se emplearon soluciones generadas a partir de la alcalinización de soluciones de sustancia **A**, debido a que el ácido fólico, presente en las soluciones obtenidas de la extracción directa de la sustancia **B** con HCl, podría modificar los resultados de este experimento. La solución irradiada no mostró cambios espectrales durante 120 minutos de irradiación, indicando que la sustancia **B** también es fotoestable.

14.2.4. Efecto del O₂ sobre la transformación de la sustancia A en la sustancia B.

Como fue explicado en el capítulo anterior, durante la irradiación de una solución de ácido fólico se produce un significativo consumo de O₂ disuelto en el medio. Este fenómeno está relacionado con las oxidaciones que se produce en la cadena lateral de la posición 6 de la molécula para generar 6-formilpterina y 6-carboxipterina y con la reacción de producción de la sustancia **A**. Se investigó la posibilidad de que la reacción térmica también contribuya a este consumo de O₂. Para decidir sobre esta cuestión, se procedió a realizar un experimento con el objetivo de averiguar si la reacción térmica puede ocurrir en condiciones anaeróbicas.

Se irradió una solución aireada de ácido fólico (450 μM, pH= 10,5) durante 50 minutos en una celda de cuarzo con llave. Inmediatamente después de apagar la lámpara se burbujeó N₂ en la solución durante 15 min, aproximadamente. Se cerró la llave de la celda para evitar el intercambio gaseoso y se dejó la solución en la oscuridad. Por último, se tomaron espectros a distintos tiempos a partir de la interrupción del burbujeo. En la figura 14.6 se muestran los resultados de esta prueba. Puede observarse que la solución irradiada sufre cambios espectrales en la oscuridad y en ausencia de O₂. El espectro DE de este proceso, mostrado en la figura 14.6.b, es comparable a los obtenidos en experimentos similares, pero en los cuales no se eliminó el aire luego de la irradiación. Se infiere de estos resultados que en la reacción térmica el O₂ no interviene.

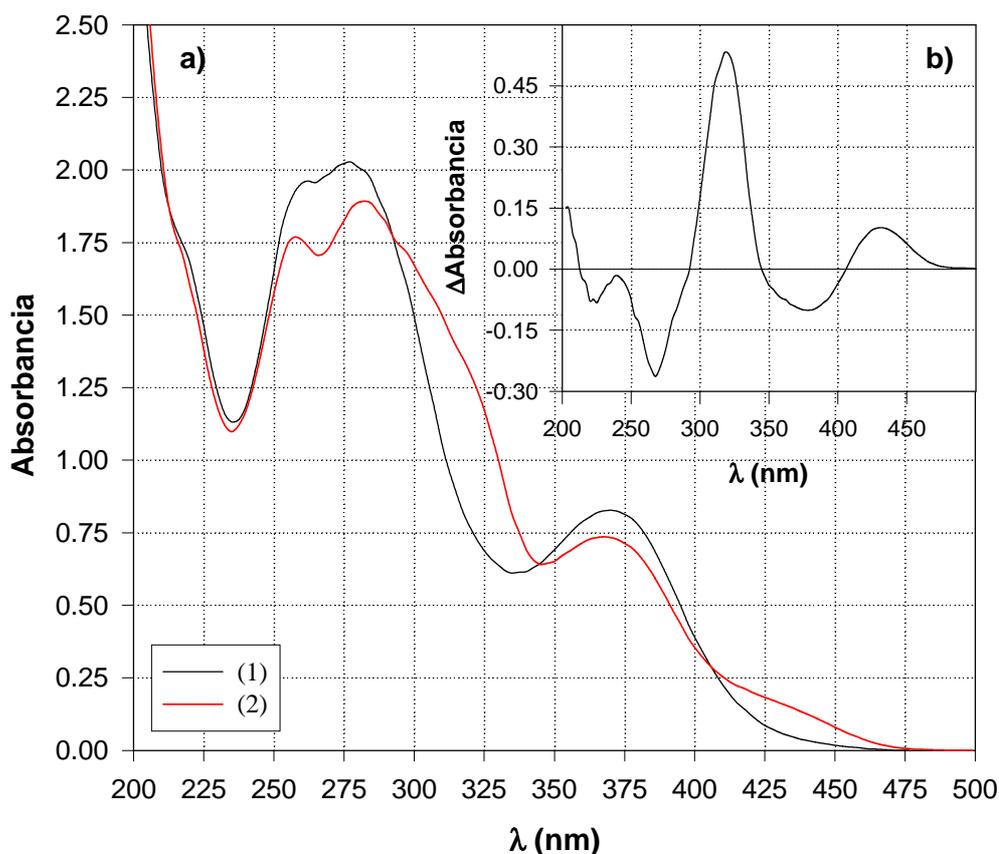


Figura 14.6. a) Evolución del espectro de absorción en una solución de ácido fólico fotolizada a pH=10,5 y luego burbujeada con N₂. (1) Espectro tomado inmediatamente después de burbujear la solución. (2) Espectro tomado 72 hs después. b) Espectro DE correspondiente.

14.3. Estudio empleando la técnica HPLC-masas.

Esta técnica, descrita brevemente en la sección 8.4, permitió determinar el peso molecular de las sustancias **A** y **B**. Se analizaron soluciones de estos productos obtenidas empleando la técnica TLC preparativa y se realizaron experimentos de control con soluciones de ácido fólico, 6-carboxipterina, 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico preparadas a partir de sus respectivos patrones.

Como puede observarse en la figura 14.7 el cromatograma obtenido con la solución de la fracción **B** presenta dos picos principales, uno con t_R de 19,4 min y otro, mucho más abundante con t_R de 22,5 min. El analizador de masas indica que las sustancias responsables de estos dos picos poseen pesos moleculares de 441 y 427, respectivamente. El primer peso

molecular corresponde al del ácido fólico. En efecto, el cromatograma obtenido en un experimento control realizado con una solución patrón de ácido fólico muestra un pico con el mismo t_R y el mismo peso molecular. Por lo tanto, puede inferirse que este compuesto se encuentra contaminando la solución de la sustancia **B**. Esto era esperable debido a que la presencia del ácido fólico en las soluciones de sustancia **B** ya fue sugerida por el análisis espectral mostrado anteriormente en este capítulo.

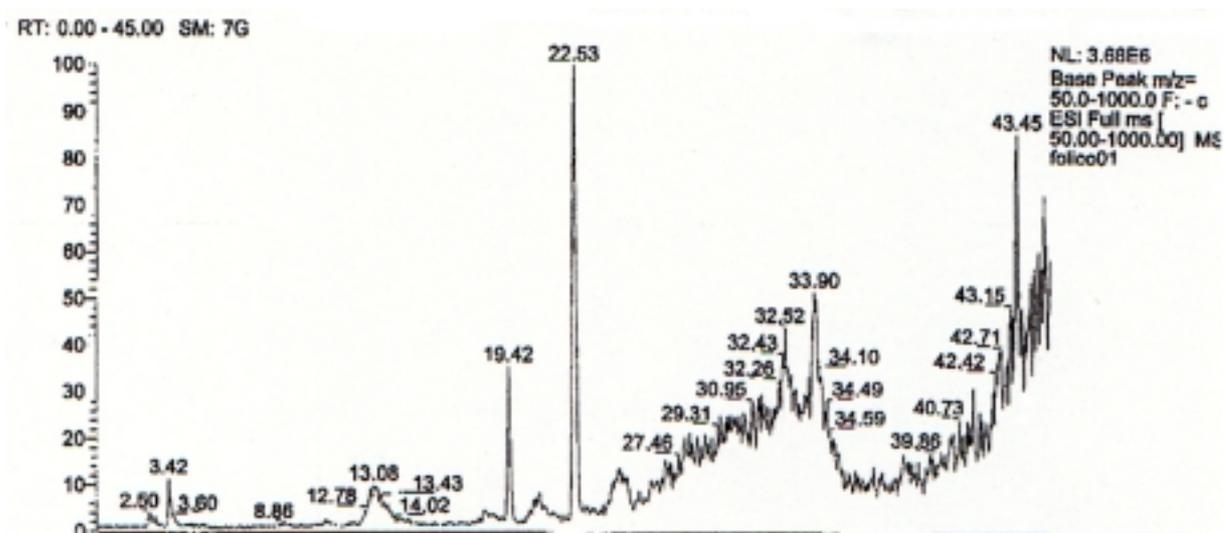


Figura 14.7. Cromatograma de una solución de sustancia **B** obtenida de la extracción de la correspondiente banda de una placa de TLC de celulosa (250 μm).

Por su parte, el cromatograma obtenido con la solución preparada a partir de la fracción **A**, mostrado en la figura 14.8, muestra dos picos principales con tiempos de retención de 17,7 y 22,9 minutos. El analizador de masas indica, en este caso, que los pesos moleculares son de 455 y 427, respectivamente. Está claro que el segundo pico, mucho menos abundante que el primero, corresponde a la sustancia **B** que se ha generado a partir de la sustancia **A** durante el procesamiento de las muestras.

Estos resultados muestran que el ácido fólico no sufre una ruptura en el puente existente entre el núcleo pterínico y la porción correspondiente al ácido *p*-aminobenzoico, como ocurre en la vía que genera 6-formilpterina. Por el contrario, en este caso, los productos poseen pesos moleculares similares al reactivo. En la figuras 14.9 y 14.10 se muestran los espectros de masas de ambos compuestos. Recuérdese que los picos que aparecen en ellos difieren en una unidad del verdadero peso molecular.

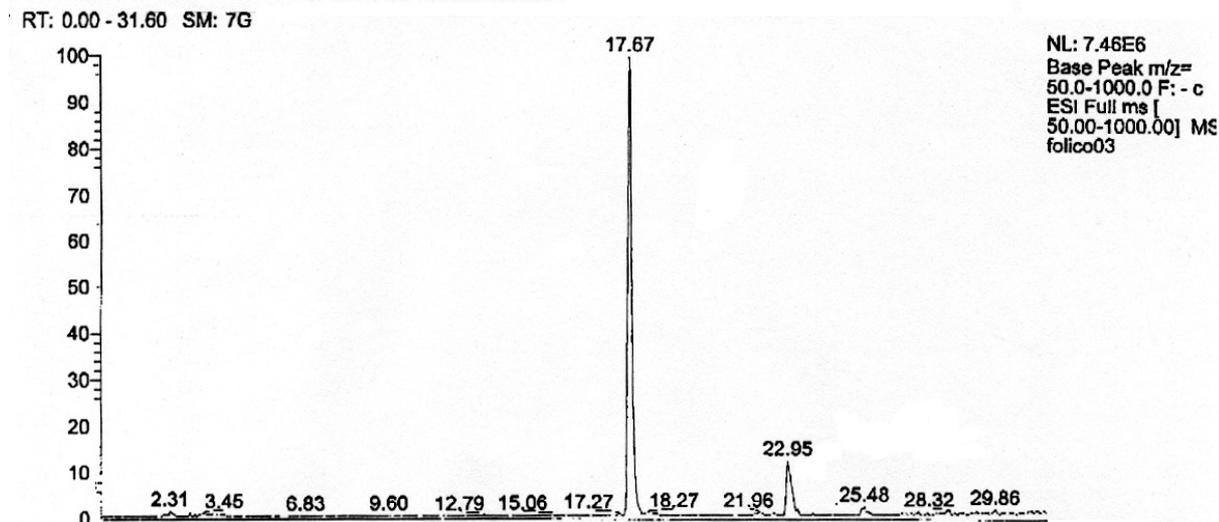


Figura 14.8. Cromatograma de una solución de sustancia A obtenida de la extracción de la correspondiente banda de una placa de TLC de celulosa (250 μm).

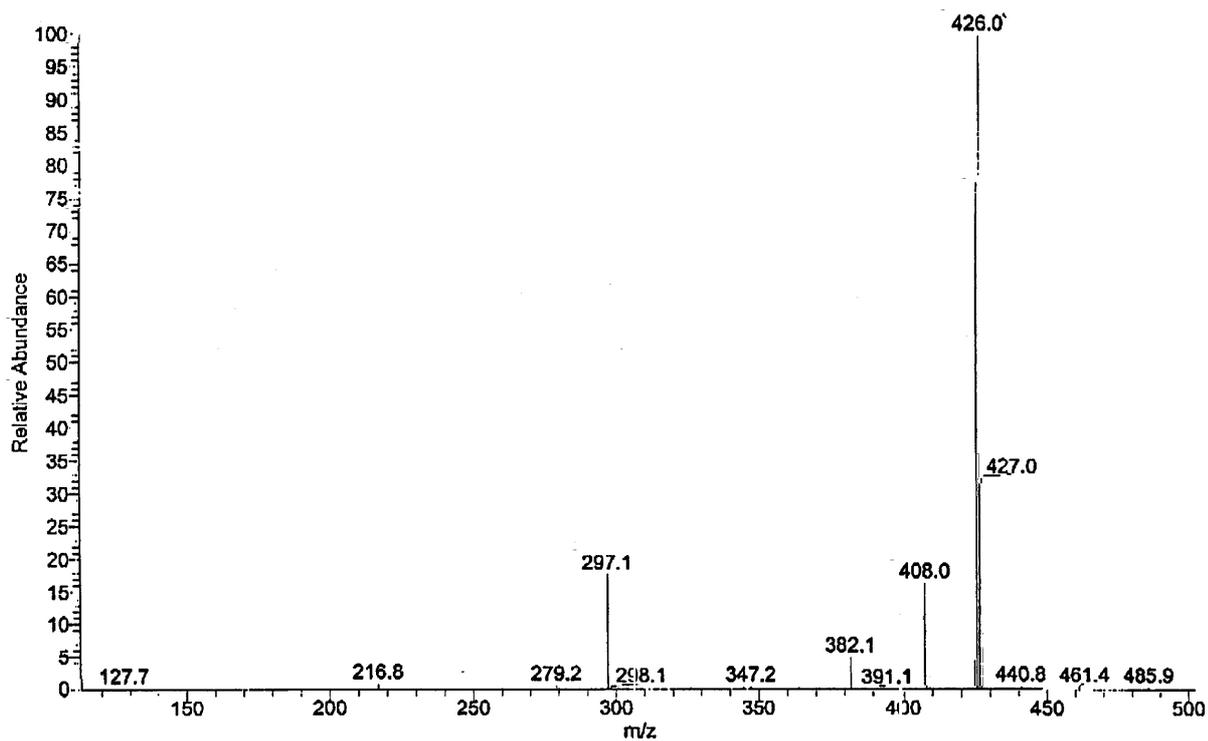


Figura 14.9. Espectro de masas de la sustancia B

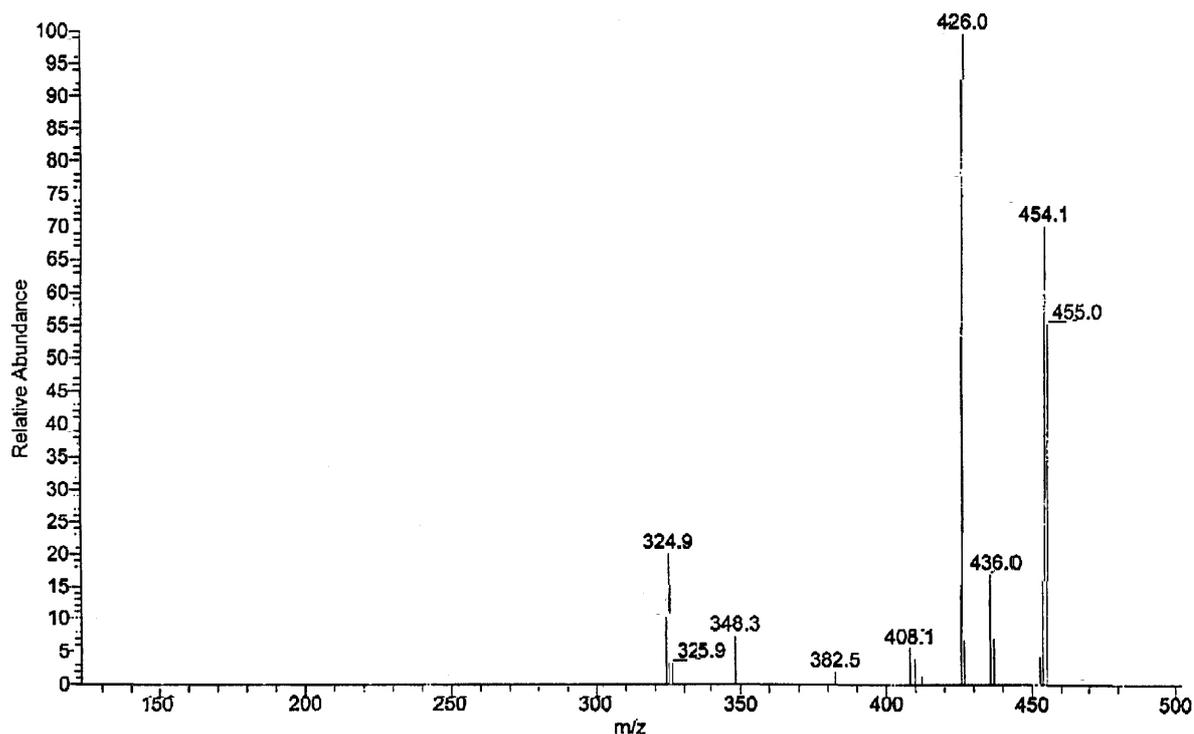


Figura 14.10. Espectro de masas de la sustancia A.

Una observación importante que surge del espectro de masas de la sustancia **A** es que en el mismo se observa un fragmento de peso molecular 427, igual al de la sustancia **B**. Estos resultados parecen indicar que la manera de fragmentarse de la sustancia **A** coincide con su manera de degradarse fotoquímicamente. Los otros fragmentos aparecen con abundancias relativas mucho menores.

14.4. Conclusiones

Los resultados expuestos en este capítulo muestran que la sustancia **A** posee un equilibrio ácido-base debido, muy probablemente, a la ionización del grupo amida del núcleo pterínico. La forma ácida es estable térmica y fotoquímicamente, mientras que la forma alcalina se transforma térmicamente en la sustancia **B**. Sin embargo, no sufre fotodegradación si es irradiada. La sustancia **B**, por su parte, es un producto estable tanto térmica como fotoquímicamente.

La reacción térmica de transformación de la sustancia **A** a la sustancia **B** no involucra

al O₂ disuelto. Además teniendo en cuenta que no existen otros oxidantes en el medio, puede inferirse que en esta reacción no se produce una oxidación neta. Por otro lado, quedó bien establecido que su velocidad es fuertemente dependiente del pH. En efecto, la reacción se acelera al aumentar el valor del mismo.

El otro punto que merece ser destacado es que el peso molecular de la sustancia **A**, en lugar de ser menor al del ácido fólico es ligeramente superior. Esto implica que el reactivo no sufre una ruptura de su estructura como ocurre en la vía que rinde 6-formilpterina como producto. Asimismo, teniendo en cuenta que, tal como se concluyó en el capítulo anterior, esta ruta fotoquímica se inicia por el ataque de ¹O₂ a la molécula de ácido fólico el incremento en el peso molecular puede justificarse por la adición de átomos de oxígeno a la estructura del reactivo. Por otro lado, la diferencia entre el peso molecular de la sustancia **A** y el de la sustancia **B** es de 28 unidades, lo cual podría corresponder a la pérdida de una molécula de CO.