

Capítulo 16.

Fotólisis de 6-formilpterina.

En el capítulo 11 se expusieron los resultados del estudio de la transformación fotoquímica de la 6-formilpterina en 6-carboxipterina, en soluciones ácidas. En el capítulo 13, por otro lado, se mencionó que durante la irradiación de soluciones alcalinas de ácido fólico se detectaba la formación de 6-carboxipterina en una etapa posterior a la aparición de 6-formilpterina. A la luz de todos estos resultados se decidió investigar la fotólisis de la 6-formilpterina en soluciones alcalinas. En este capítulo se mostrarán los resultados de este estudio, realizado con una estructura similar al análogo llevado a cabo en medio ácido.

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

En la figura 16.1 pueden apreciarse los cambios espectrales que se generan cuando una solución alcalina de 6-formilpterina es irradiada con luz UV-A. Los espectros DE obtenidos durante la fotólisis se muestran en la figura 16.1.b, en la cual puede observarse un punto isobéptico en 274 nm. Si bien en estos gráficos sólo se observan los espectros obtenidos en los primeros 20 minutos, la solución fue irradiada durante 50 minutos, período en el cual el mencionado punto isobéptico se mantuvo invariante.

Más aún, las curvas de absorbancia en función del tiempo de irradiación no evidencian una transformación ulterior del fotoproducto. Además en 50 minutos las mismas no alcanzan un máximo. Algunas de estas curvas pueden observarse en la figura 16.2. Estos resultados sugieren que la 6-formilpterina se transforma en un producto fotoestable, o al menos, lo suficientemente estable como para que no se detecte su fotólisis en este experimento. Además, si estos resultados se comparan con los de los experimentos análogos obtenidos en medio ácido, puede inferirse que la 6-formilpterina es más estable fotoquímicamente en soluciones alcalinas que en soluciones ácidas.

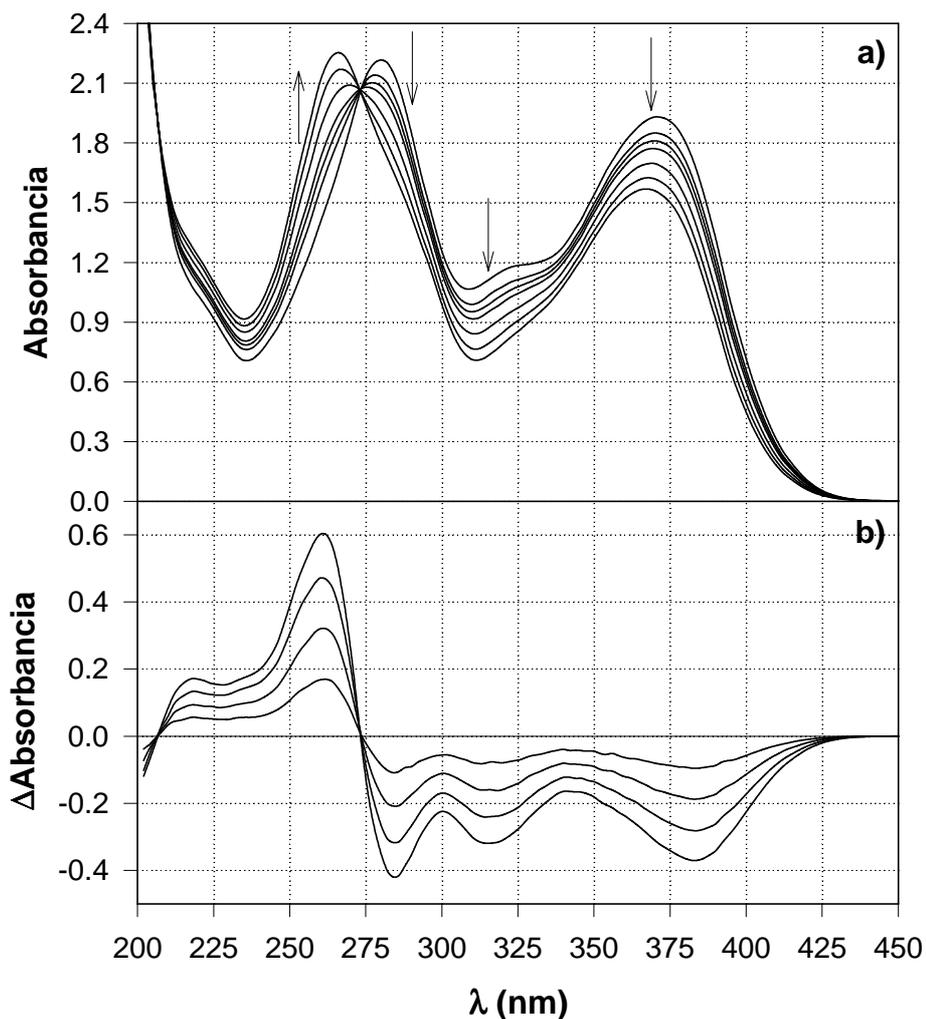


Figura 16.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (150 μ M, pH= 11,0) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 4 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.

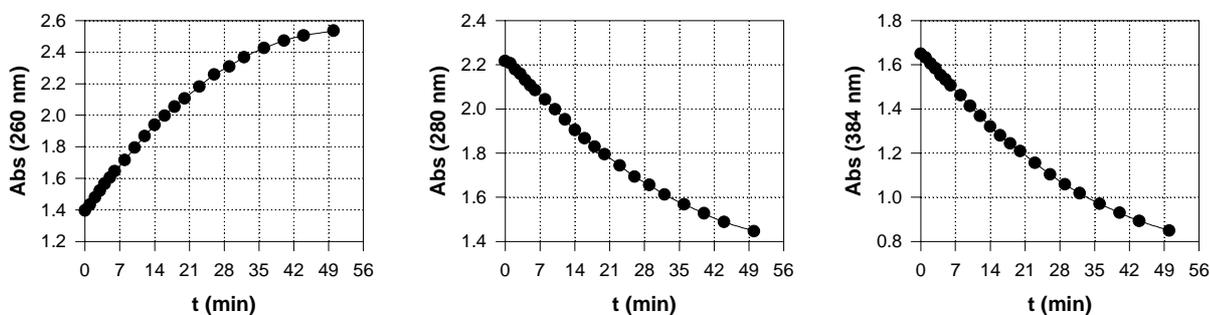


Figura 16.2. Variación con el tiempo de irradiación de la absorbancia a distintas longitudes de onda de una solución de 6-formilpterina (150 μ M, pH=11,0).

En estas condiciones, al igual que en medio ácido, el análisis de los cambios espectrales sugiere la conversión de la 6-formilpterina en 6-carboxipterina. En efecto, como muestra la figura 16.3, el espectro DEN se corresponde muy bien con el espectro DTN, obtenido a partir de los espectros de soluciones patrón de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Más aún, como puede apreciarse en la figura 16.4, el espectro de la solución irradiada durante 50 minutos sugiere que el componente principal de la misma es la 6-carboxipterina.

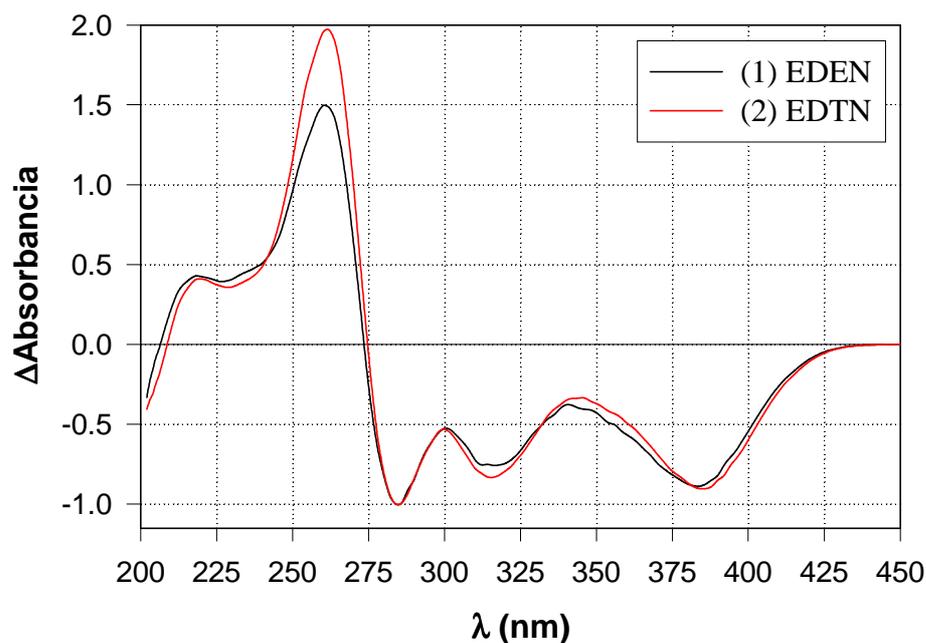


Figura 16.3. Comparación de espectros diferencia normalizados a 280 nm. (1) Espectro DEN ($t= 10$ min). (2) Espectro DTN obtenido a partir de sendas soluciones ($100 \mu\text{M}$, $\text{pH}=11$) de 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

El análisis por TLC de las soluciones irradiadas muestra la presencia de dos sustancias fluorescentes, con valores de R_f que se corresponden a los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Estos resultados se muestran en la figura 16.5, en la cual puede observarse que no se detectan otros productos fluorescentes, sugiriendo que la única vía de descomposición de la 6-formilpterina, en estas condiciones, es su oxidación a 6-carboxipterina.

En concordancia con estos resultados, el análisis por HPLC de las soluciones alcalinas de 6-formilpterina irradiadas muestra que el área del pico de este compuesto disminuye al avanzar la fotólisis, a la vez que se observa el crecimiento de un pico con t_R y forma coincidentes con las pruebas realizadas con una solución patrón de 6-carboxipterina. En la

figura 16.6 se muestra un cromatograma correspondiente a una solución irradiada. En él pueden observarse los picos pertenecientes a los dos compuestos involucrados en la reacción.

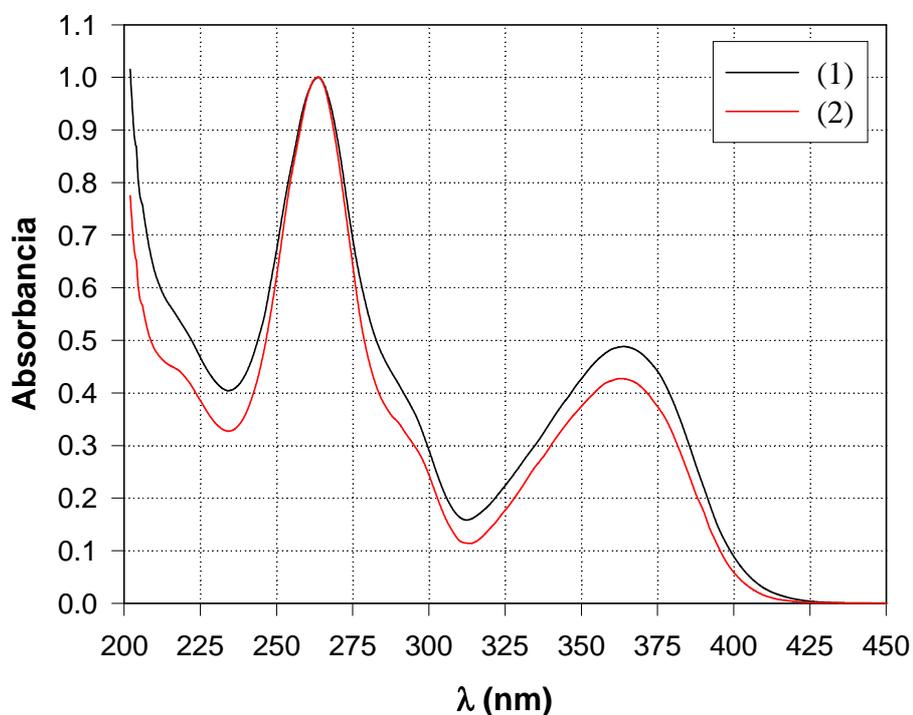


Figura 16.4. (1) Espectro normalizado de una solución de 6-formilpterina irradiada 50 min. (2) Espectro normalizado de una solución de 6-carboxipterina (100 μM , pH= 5,7).

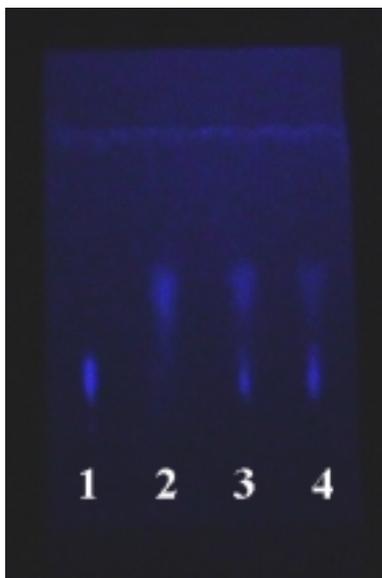


Figura 16.5. Corrida de TLC. Calles: 1, solución de 6-carboxipterina 150 μM ; 2, solución de 6-formilpterina 200 μM ; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 μM (pH= 11,0) irradiada 10 y 20 min, respectivamente.

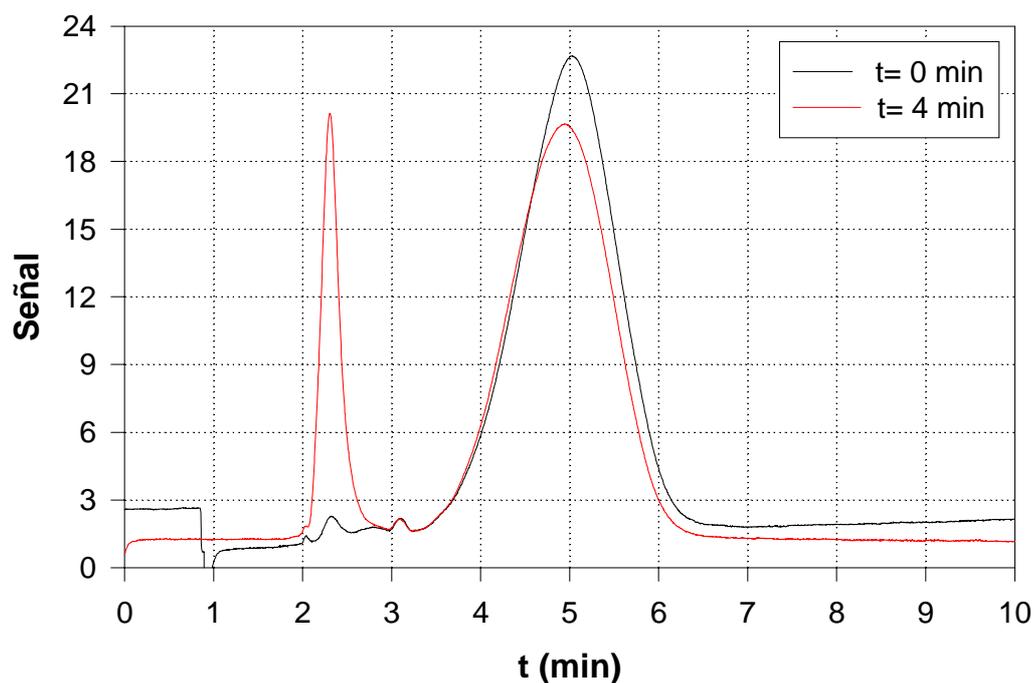


Figura 16.6. Cromatogramas. Solución de 6-formilpterina 150 μM (pH= 11,0) irradiada con luz UV-A de $\lambda= 350 \text{ nm}$. λ de análisis= 340 nm.

La figura 16.7 muestra la evolución de dichas concentraciones, observándose un comportamiento lineal para el intervalo de tiempo analizado.

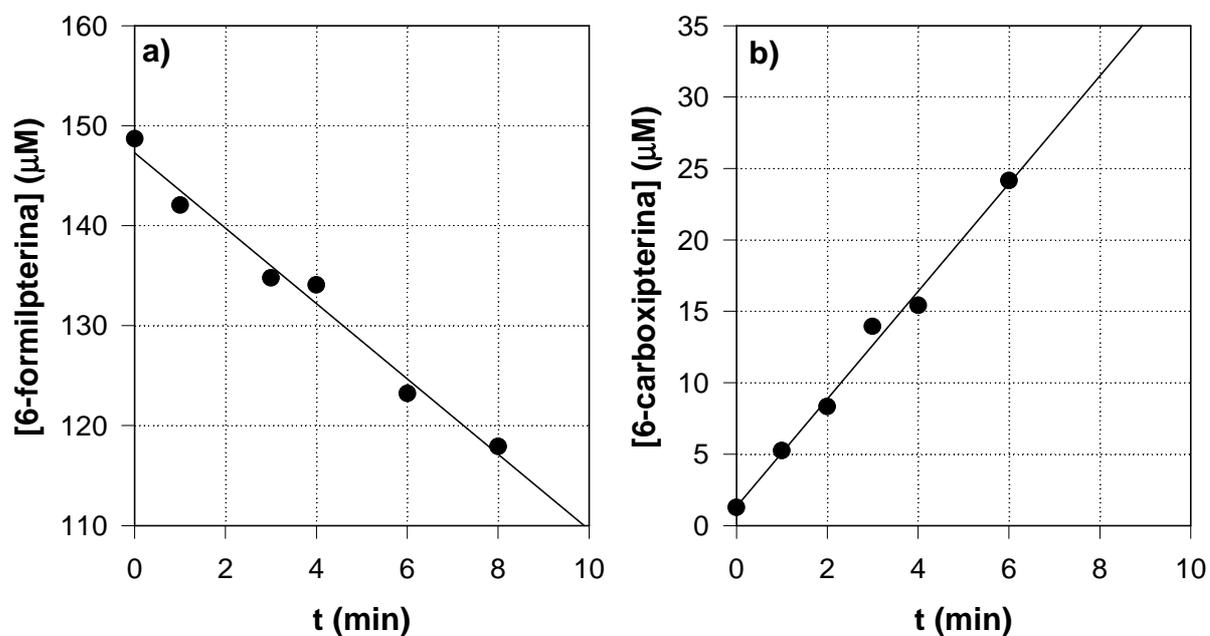


Figura 16.7. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina 150 μM y pH= 11,0. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC.

Se obtuvo un valor de $-3,7 \pm 0,3 \mu\text{M}/\text{min}$ para la velocidad de descomposición de 6-formilpterina y exactamente lo mismo para la velocidad de formación de 6-carboxipterina ($3,7 \pm 0,2 \mu\text{M}/\text{min}$). La concordancia entre estos dos datos obtenidos sugiere que la única vía de descomposición de la 6-formilpterina es su oxidación a 6-carboxipterina.

A estas velocidades le corresponde un rendimiento cuántico de $9,0 \times 10^{-3}$ que es sensiblemente menor al obtenido en medio ácido ($\sim 3,8 \times 10^{-2}$). Cabe aclarar que, en este caso, no se supuso absorción total de luz por parte de la 6-formilpterina, ya que la absorbancia inicial es de 1,54. Por este motivo, el cálculo de los rendimientos cuánticos se realizó empleando la luz absorbida y no el total de la luz incidente.

16.2. Papel del O_2 en la fotólisis de la 6-formilpterina.

Se midió la concentración del O_2 disuelto en el medio a distintos tiempos de irradiación. Como puede observarse en la figura 16.8, la misma disminuye al avanzar la fotólisis, indicando la participación de este elemento en la reacción.

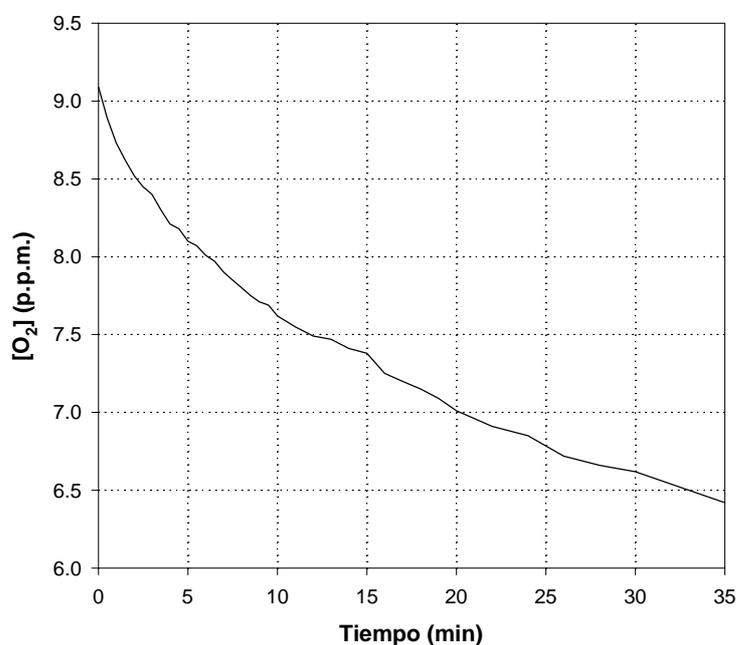


Figura 16.8. Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución de 6-formilpterina $150 \mu\text{M}$ ($\text{pH}=11,0$).

Se realizaron experimentos de fotólisis de 6-formilpterina en presencia de alcohol furfurílico. Sin embargo, no pudieron extraerse de estas pruebas conclusiones sobre el papel del $^1\text{O}_2$ en el mecanismo de la reacción estudiada debido a que, en estas condiciones, se detectó una reacción fotoinducida entre ambos compuestos. En efecto, si se mezclan soluciones alcalinas de 6-formilpterina y alcohol furfurílico el espectro de la solución resultante, estable en la oscuridad, puede obtenerse a partir de los espectros de las soluciones originales, teniendo en cuenta los volúmenes mezclados. Esto sugiere que, en estas condiciones, no existe ninguna reacción térmica. Sin embargo, como muestra la figura 16.9, cuando esta solución mezcla es irradiada se producen profundos cambios espectrales que no corresponden a la transformación de 6-formilpterina en 6-carboxipterina.

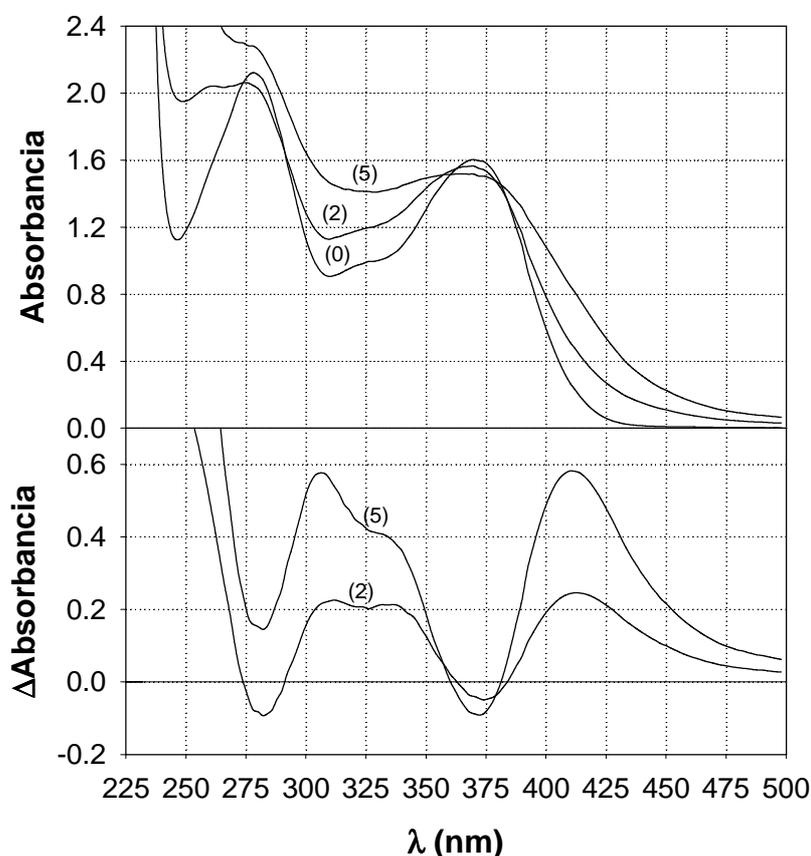


Figura 16.9. a) Evolución del espectro de una solución que contiene 6-formilpterina (125 μM) y alcohol furfurílico (10 mM) al ser irradiada (pH= 11,0). Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes. Entre paréntesis figuran los tiempos, en minutos, correspondientes a cada espectro.

Como puede apreciarse en la figura 16.9.b, los espectros DE, y por ende los espectros

DEN, obtenidos en este experimento, son muy diferentes a los correspondientes al de la fotooxidación directa de la 6-formilpterina que fueron mostrados en las figuras 16.1 y 16.3. Estos resultados implican que el alcohol furfurílico no se limita a capturar el $^1\text{O}_2$ generado por el sensibilizador, tal como lo hace en los experimentos realizados con ácido fólico. Por el contrario, reacciona con la 6-formilpterina.

Los resultados obtenidos en otro experimento realizado en condiciones similares al de la figura 16.9, pero en el que las soluciones irradiadas fueron analizadas por HPLC, revelan que la 6-formilpterina se consume muy rápidamente en presencia de alcohol furfurílico. En efecto, realizando una regresión lineal sobre los puntos de los primeros 4 minutos de irradiación se obtiene una velocidad de consumo de $-25,4 \mu\text{M}/\text{min}$, siendo este valor sensiblemente superior (en valor absoluto) al obtenido en ausencia de alcohol furfurílico ($-3,8 \mu\text{M}/\text{min}$). Además, la 6-carboxipterina no es el producto principal de esta reacción fotoquímica. En la figura 16.10 se muestran los perfiles de concentración obtenidos para ambos compuestos, pudiendo apreciarse que la cantidad de 6-carboxipterina generada es prácticamente despreciable respecto a la cantidad de reactivo consumido.

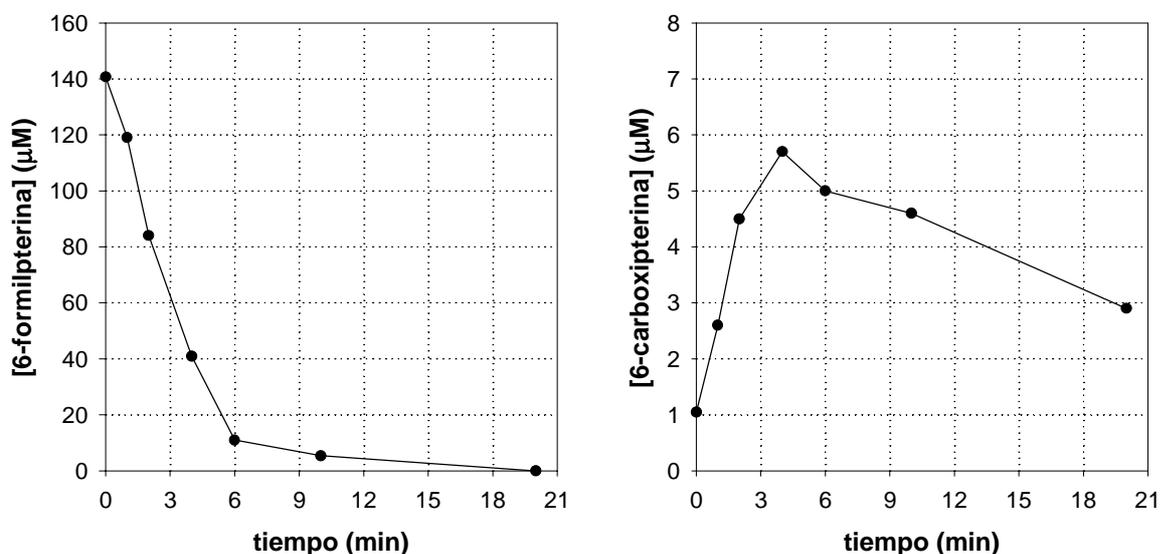


Figura 16.10. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina ($140 \mu\text{M}$, $\text{pH}= 11,0$) en presencia de alcohol furfurílico (10 mM). Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC.

Tal como fue discutido en el capítulo 11, experimentos similares realizados en medio ácido, también mostraron la existencia de un proceso fotoquímico que involucra a la

6-formilpterina y al alcohol furfurílico. Sin embargo, en aquellas condiciones de pH se detectó la formación de 6-carboxipterina, demostrándose que la transformación de 6-formilpterina a ese fotoproducto se encuentra inhibida sólo parcialmente.

Con respecto a la nueva reacción detectada en medio alcalino poco puede especularse a partir de los resultados presentados. Sólo es posible establecer que los experimentos en presencia de alcohol furfurílico no permiten definir si el $^1\text{O}_2$ participa o no en la reacción estudiada. No obstante, la evidencia presentada en la siguiente sección muestra claramente que en medio alcalino dicha especie activada del O_2 tampoco participa como intermediario.

16.3. Fotólisis de 6-formilpterina en ausencia de O_2 .

Análogamente a lo observado en medio ácido, cuando se irradia una solución alcalina de 6-formilpterina burbujeada con N_2 , se observa que la solución, inicialmente de color amarillo, se torna color naranja-rojizo. Sin embargo, este efecto se evidencia a tiempos mayores. Puede explicarse este fenómeno siguiendo un razonamiento similar al empleado en el capítulo 11 y, por ende, no será repetido aquí, en detalle. La figura 16.11 muestra la aparición, en el espectro de la solución irradiada, de una banda de absorción, relativamente poco intensa y ancha, con un máximo en, aproximadamente, 480 nm.

El compuesto responsable de la mencionada banda no es estable frente O_2 . 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 16.12 la desaparición de la banda con máximo en 480 nm.

La figura 16.13.a muestra el espectro EDN obtenido en la reacción que ocurre al airear la solución irradiada en ausencia de O_2 . El espectro de la figura 16.13.b es el espectro EDN global obtenido en todo el proceso de irradiación y posterior aireación. Es decir, este espectro se obtuvo restando el espectro 1 al espectro 3, ambos de la figura 16.12, y luego normalizando. En la figura 16.13.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 O_2 del aire es la 6-carboxipterina.

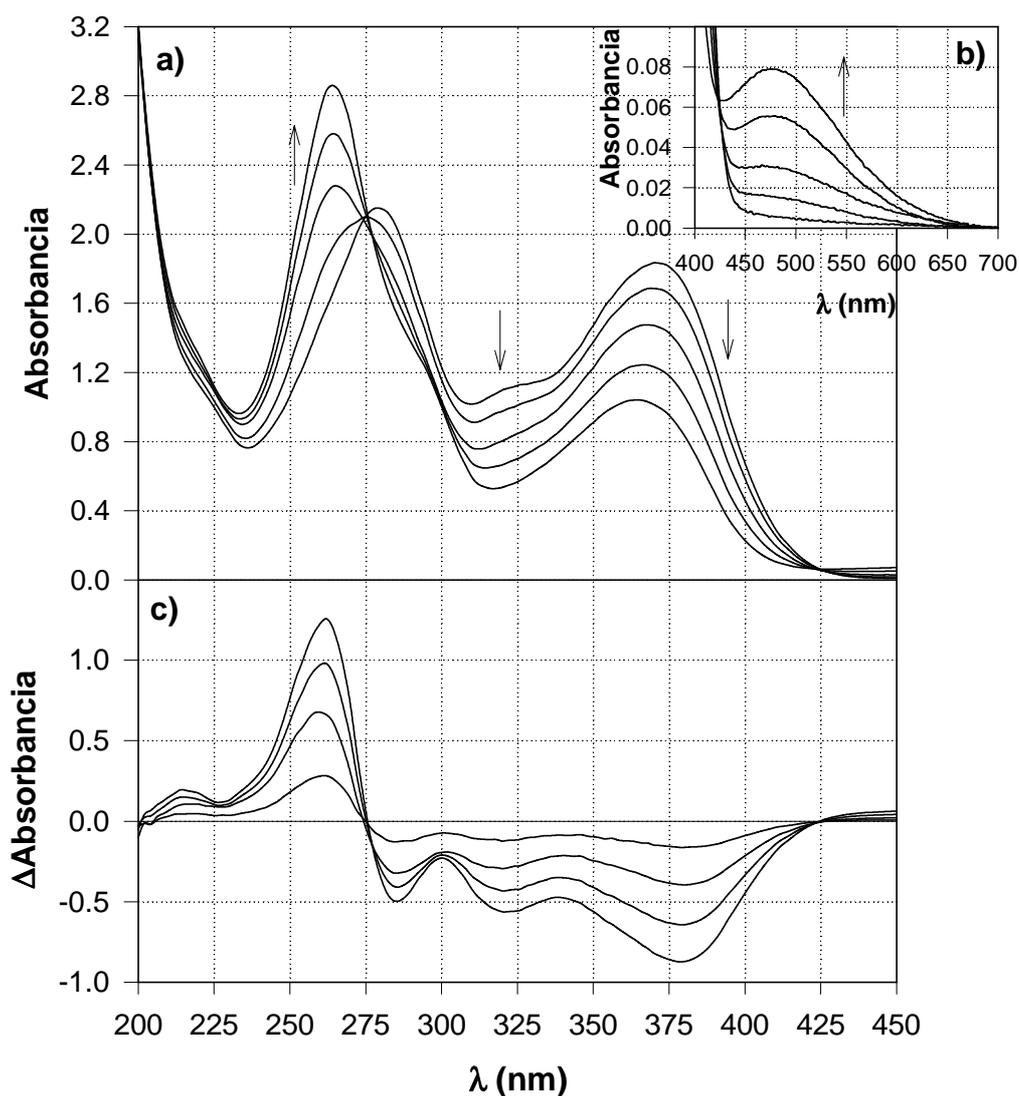


Figura 16.11. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (150 μ M, pH= 11,0) al ser irradiada en ausencia de O_2 . Los espectros fueron tomados a los 0, 4, 9, 17 y 33 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Detalle de la zona del espectro comprendida entre 400 y 700 nm. c) Espectros diferencia correspondientes.

Como puede apreciarse en la figura 16.14, los experimentos de TLC realizados sobre las soluciones irradiadas en ausencia de O_2 y posteriormente aireadas, muestran la presencia de una sustancia fluorescente con un R_f coincidente con el de la 6-carboxipterina. Se observa, además, una disminución en la intensidad de la mancha del reactivo con el tiempo de irradiación y no se detectan otras manchas que indiquen la presencia de otros fotoproductos.

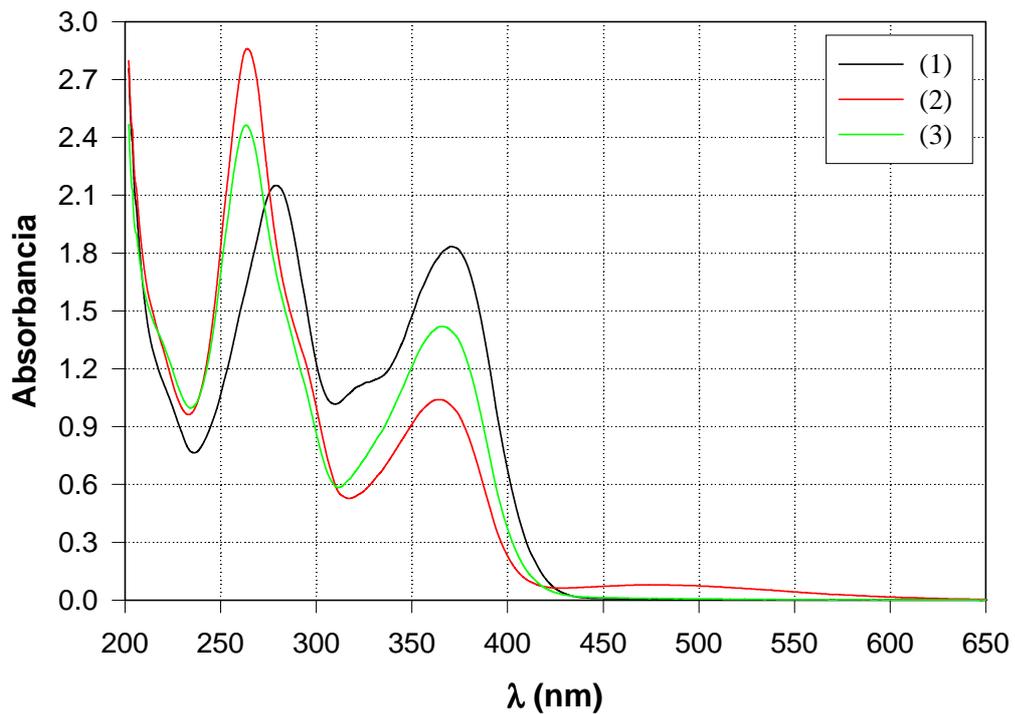


Figura 16.12. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina ($150 \mu\text{M}$, $\text{pH}=11,0$). Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. (1) Espectro de la solución original no irradiada. (2) Espectro de la solución irradiada 33 minutos en ausencia de O_2 . (3) Espectro de la solución irradiada 33 minutos en ausencia de O_2 y luego aireada.

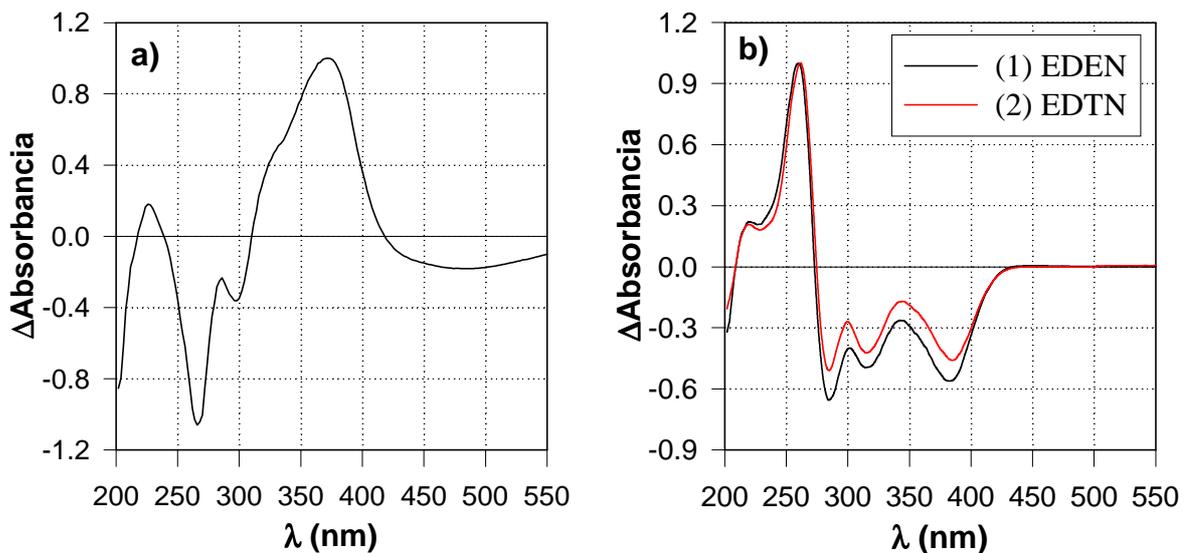


Figura 16.13. a) Espectro EDN obtenido entre los espectros 2 y 3 de la figura 16.12. b) (1) Espectro EDN obtenido entre los espectros 1 y 3 de la figura 16.12. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones patrones ($100 \mu\text{M}$, $\text{pH}=11$) de 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

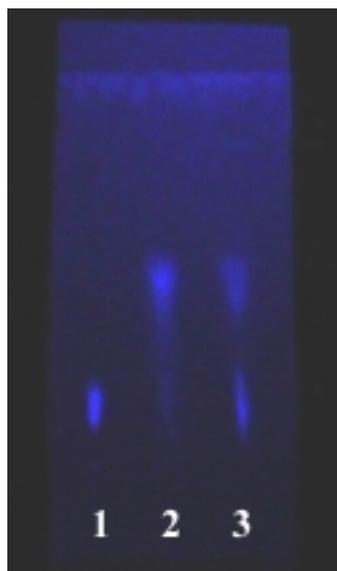


Figura 16.14. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 200 μM ; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 μM ; 3, solución de 6-formilpterina 150 μM (pH= 11,0) irradiada, en ausencia de O_2 33 min. y luego aireada.

En otra serie de experimentos se irradiaron, durante distintos períodos de tiempo, soluciones alcalinas de 6-formilpterina burbujeadas con N_2 . Posteriormente estas soluciones fueron puestas en contacto con el aire y agitadas; finalmente, fueron analizadas por HPLC. Se observó que en los cromatogramas correspondientes a estas muestras estaba presente el pico correspondiente a la 6-carboxipterina, el cual aumentaba su área con el tiempo de irradiación. Simultáneamente se observó una disminución del área del pico de la 6-formilpterina.

En la figura 16.15 se muestra la evolución de las concentraciones de los dos compuestos. En este experimento se obtuvieron las siguientes velocidades: $-4,7 \pm 0,3 \mu\text{M}/\text{min}$ para la descomposición de la 6-formilpterina y $3,3 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$ para la formación de 6-carboxipterina. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $1,1 \times 10^{-2}$ y $8,0 \times 10^{-3}$, respectivamente. En este caso, tampoco se supuso absorción total de luz por parte de la solución, por lo cual, el cálculo de los rendimientos cuánticos se realizó empleando la luz absorbida inicialmente y no el total de la luz incidente.

Estos valores, si bien bastante diferentes entre sí, son comparables a los valores obtenidos en presencia de O_2 ($9,0 \times 10^{-3}$). Las conclusiones a las que pueden arribarse a partir de estos resultados son similares a las conclusiones obtenidas de los experimentos realizados en medio ácido. Es decir, llevando a cabo la irradiación en ausencia de O_2 y luego aireando la

solución, se obtiene el mismo producto y con el mismo rendimiento cuántico que si se realiza la fotólisis directamente sobre una solución aireada.

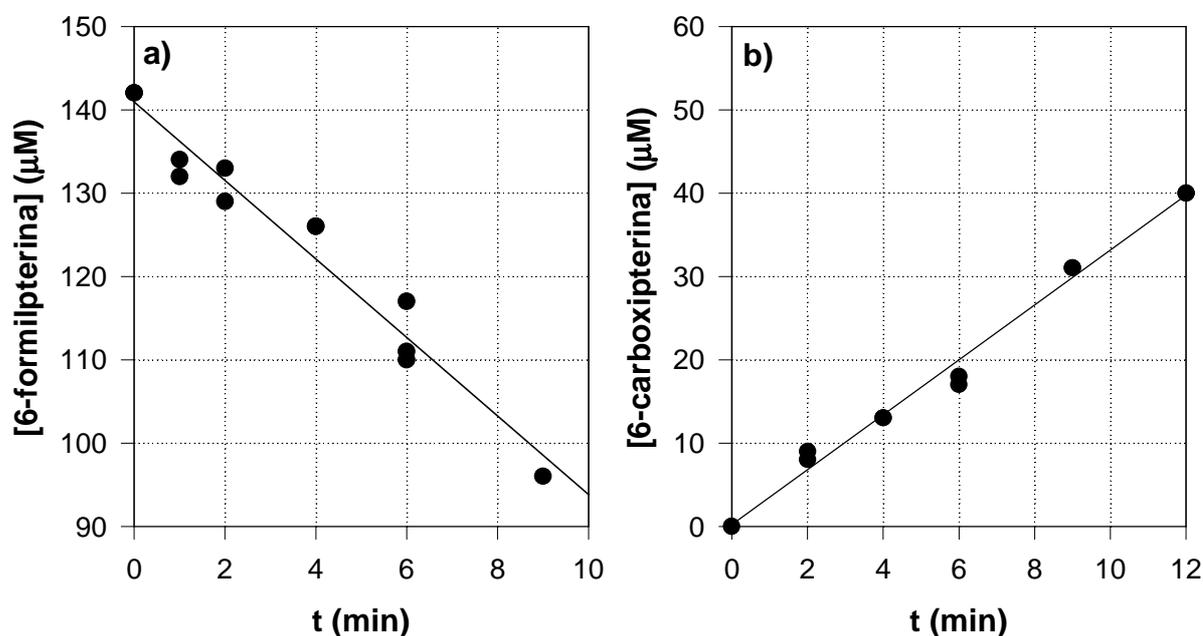


Figura 16.15. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina (140 μM y pH=11,0) en ausencia de O₂.

Puede ahora volver a considerarse la participación del ¹O₂. Si bien los experimentos realizados con secuestrador selectivo no fueron útiles, la participación de esta especie reactiva puede descartarse considerando la información que se acaba de presentar. En efecto, en este capítulo se demostró que puede obtenerse el mismo producto y con el mismo rendimiento cuántico ya sea irradiando las soluciones de 6-formilpterina directamente equilibradas con aire o haciéndolo en condiciones anaeróbicas y luego aireando. Es evidente que por esta segunda ruta el ¹O₂ no puede participar debido a que en ningún momento se irradia la solución en presencia de O₂.

16.4. Conclusiones

La 6-formilpterina, en soluciones acuosas alcalinas, sufre una oxidación fotoinducida similar a la observada en medio ácido. En efecto, en una primera etapa, en la cual no participa

el O₂, la excitación de la molécula conduce a la formación de un “compuesto rojo” que posee características espectrales muy particulares. En una segunda etapa, en la cual no se requiere luz, este fotoproducto reacciona con el O₂ del medio formándose 6-carboxipterina que es el producto final. Esta secuencia de reacciones está representada en el esquema de la figura 16.16.

Debido a las características espectrales y a su reactividad puede proponerse que el compuesto rojo detectado en medio alcalino es el mismo que el detectado en medio ácido. Podría tratarse pues, de acuerdo a las consideraciones planteadas en la sección 11.4, del derivado 6-carboxi-5,8-dihidropterina, cuya estructura fue mostrada en la figura 11.22.

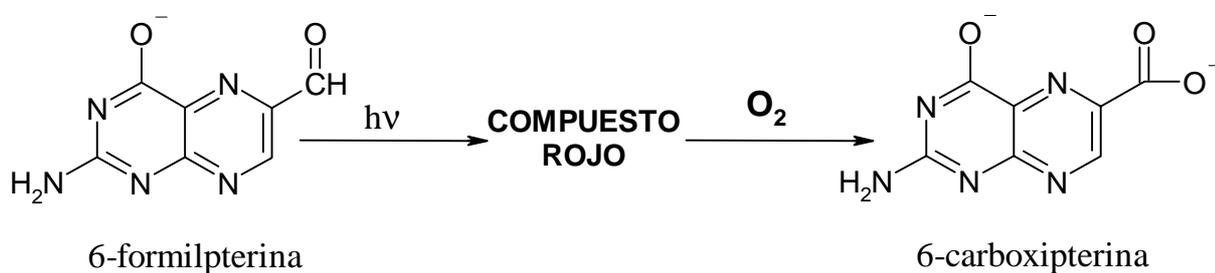


Figura 16.16. Fotólisis de 6-formilpterina.