

## Capítulo 17.

### Fotólisis de 6-carboxipterina y pterina.

---

---

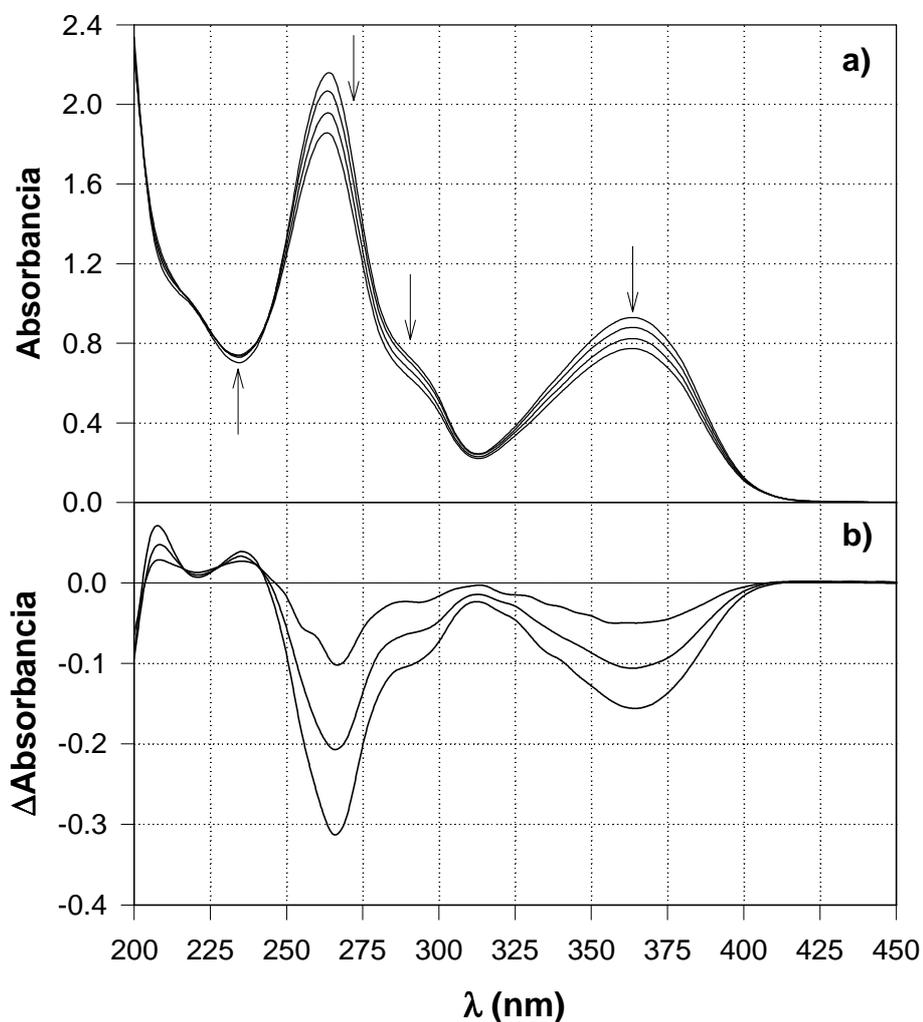
Este capítulo posee una estructura similar a la del capítulo 12, en el cual se presentaron los resultados de la fotólisis de la 6-carboxipterina en medio ligeramente ácido. En las primeras dos secciones se muestran los resultados obtenidos en presencia y ausencia de O<sub>2</sub>, los cuales son muy diferentes entre sí. Se investigaron los productos de reacción y se calcularon los correspondientes rendimientos. La fotodegradación de la pterina, expuesta sobre el final del capítulo, presenta amplias similitudes con aquella reportada en la sección 12.3 para experimentos realizados en medio ácido.

#### 17.1. Fotólisis de 6-carboxipterina en presencia de O<sub>2</sub>.

Como puede observarse en la figura 17.1, se producen importantes cambios espectrales cuando se irradia una solución aireada de 6-carboxipterina con luz UV-A. Sin embargo, estos cambios son muy diferentes a los observados para la forma ácida. En efecto, como puede apreciarse en la figura 17.2, el espectro DEN no es comparable al espectro DTN obtenido a partir de los espectros de soluciones patrón de 6-carboxipterina y pterina, sugiriendo que este último compuesto no es el principal producto de la reacción.

El tercer espectro mostrado en la figura 17.2 corresponde al espectro DTN esperado para una reacción en la cual los productos no absorbieran luz. Puede apreciarse que existe una buena correlación entre este último espectro y el espectro DEN, por encima de 250 nm. Esto sugiere que los productos de la fotólisis, en estas condiciones, no absorben luz en esta región del espectro; es decir, que no presentan la característica banda de absorción con máximo entre 320 y 400 nm presente en las demás pterinas. Por otra parte, la comparación de estos

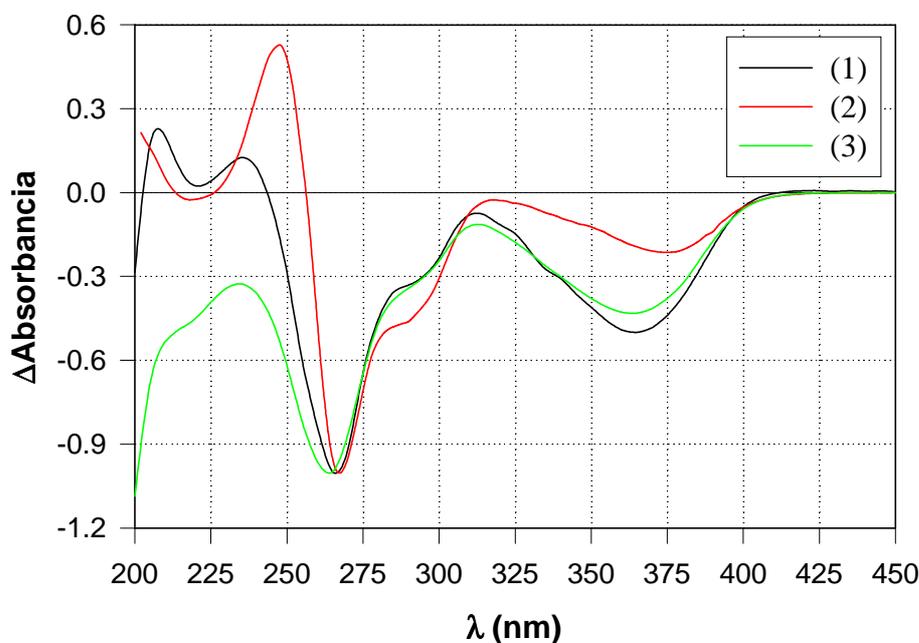
espectros muestra que los fotoproductos absorban luz en el rango comprendido entre 200 y 240 nm.



**Figura 17.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100  $\mu$ M, pH= 11,0) al ser irradiada en presencia de  $O_2$ . Los espectros fueron tomados cada 30 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.**

Los resultados de los experimentos realizados en TLC refuerzan estas hipótesis. Se sembró en placa una solución de 6-carboxipterina irradiada durante 150 min, junto con una solución sin irradiar y una solución patrón de pterina. Puede observarse en la figura 17.3 que en la calle correspondiente a la solución irradiada sólo existe una mancha, la correspondiente al reactivo sin fotolizar y, que la misma, presenta una disminución en la intensidad de la luz fluorescente emitida cuando se la compara con la de la mancha de la calle de la solución no

fotolizada. Estos resultados muestran que la 6-carboxipterina, en efecto, se consume; pero no se transforma en pterina como ocurre en medio ácido. Tampoco se detecta la aparición de otros productos que presenten la típica fluorescencia de las pterinas al ser irradiadas a 350 nm, lo cual sugiere que los productos no son de naturaleza pterínica.



**Figura 17.2.** (1) Espectro DEN obtenido luego de fotolizar durante 90 min una solución de 6-carboxipterina (100  $\mu\text{M}$ , pH= 11,0) en presencia de  $\text{O}_2$ . (2) Espectro DTN obtenido a partir de los espectros de una solución de pterina 100  $\mu\text{M}$  (pH= 11,0) y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración y pH. (3) Espectro DTN para un proceso en el cual el reactivo se transforma en productos que no absorben luz en el rango del espectro analizado.

Si se acepta que los fotoproductos no absorben luz a longitudes de onda mayores a 300 nm, puede suponerse que la totalidad de la luz absorbida por las soluciones irradiadas corresponde sólo a la porción no fotolizada de 6-carboxipterina. Puede, de esta manera, calcularse el consumo de la misma para distintos tiempos de irradiación y, a la vez, es posible estimar el rendimiento cuántico de consumo del reactivo. En la figura 17.4 se muestran los resultados de un experimento en el cual se calculó la concentración de 6-carboxipterina a partir del descenso de absorbancia a 364 nm (máximo de la banda). Se obtuvo un valor de  $1,3 \times 10^{-3}$  para el rendimiento cuántico, el cual es sensiblemente menor a los calculados para las experiencias realizadas en medio ácido.

Habiendo calculado la concentración del reactivo para distintos tiempos de irradiación

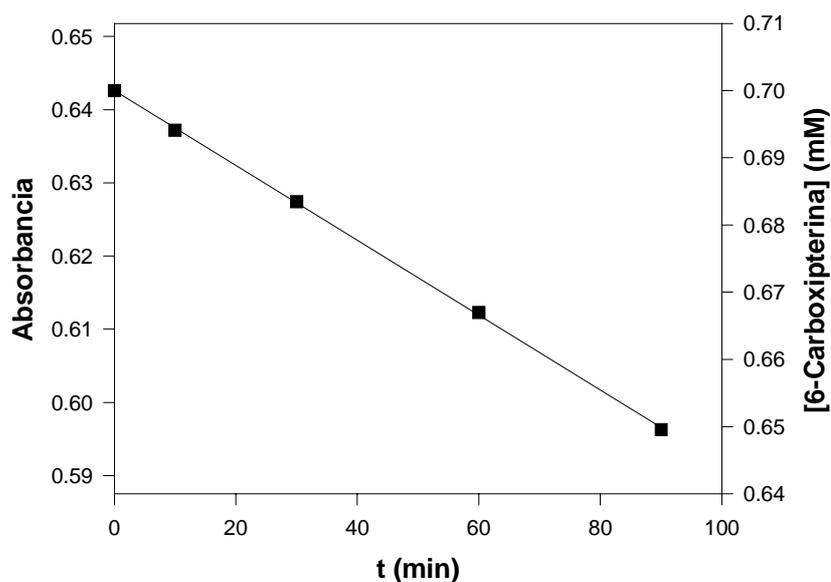
siguiendo el procedimiento que se acabada de explicar, puede abstraerse al espectro de la solución irradiada el espectro correspondiente a la 6-carboxipterina residual, obteniéndose el de los productos. Esta metodología fue empleada en el análisis de los espectros obtenidos en la fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 100  $\mu\text{M}$ . Los correspondientes espectros de los productos logrados en dicho experimento se muestran en la figura 17.5. Puede observarse que los productos presentan bandas de absorción relativamente intensas en la zona comprendida entre 200 y 260 nm.



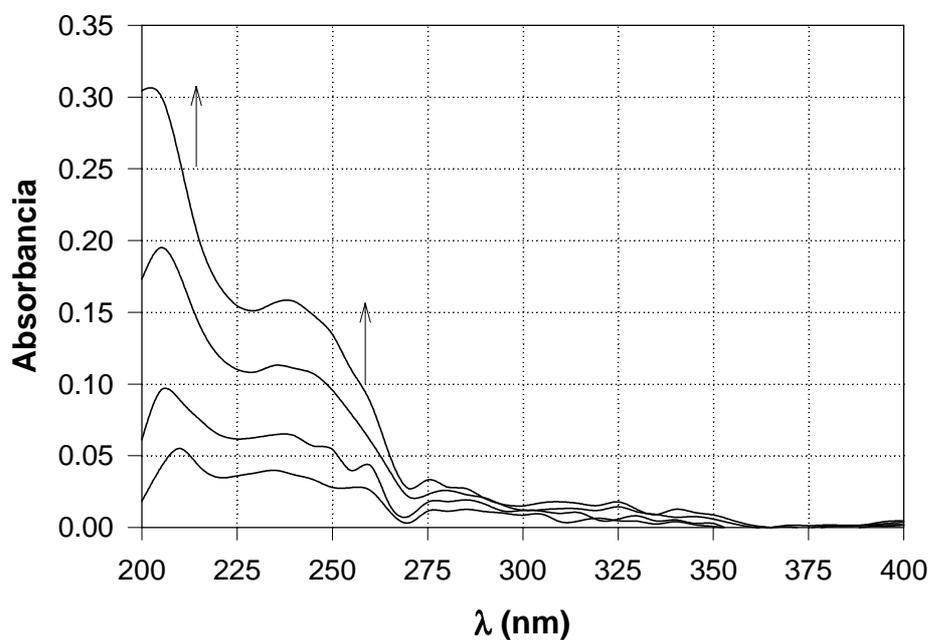
**Figura 17.3.** Corridas de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 200  $\mu\text{M}$  (pH= 11,0) irradiada 150 min; 2, solución de pterina 100  $\mu\text{M}$ ; 3, solución de 6-carboxipterina 200  $\mu\text{M}$ .

Soluciones irradiadas de 6-carboxipterina fueron analizadas por HPLC. Empleando el sistema de corrida III se comprobó que durante la irradiación la concentración de reactivo disminuye, a la vez que se confirmó que no se genera pterina. Se realizaron cromatogramas de soluciones de pterina y mezclas de pterina y 6-carboxipterina como control de que bajo estas condiciones de corrida ambos compuestos se separan adecuadamente.

Por otra parte, analizando las soluciones a 340 nm y empleando el mencionado sistema de corrida no pudieron detectarse productos aún luego de 2 horas de irradiación. Más aún, se realizaron corridas cromatográficas variando la relación de volúmenes acetonitrilo/buffer del solvente de corrida entre 0 y 50 y se obtuvieron los mismos resultados, reforzando la hipótesis de que los productos no absorben luz en la zona en la cual las pterinas presentan una de sus bandas características.



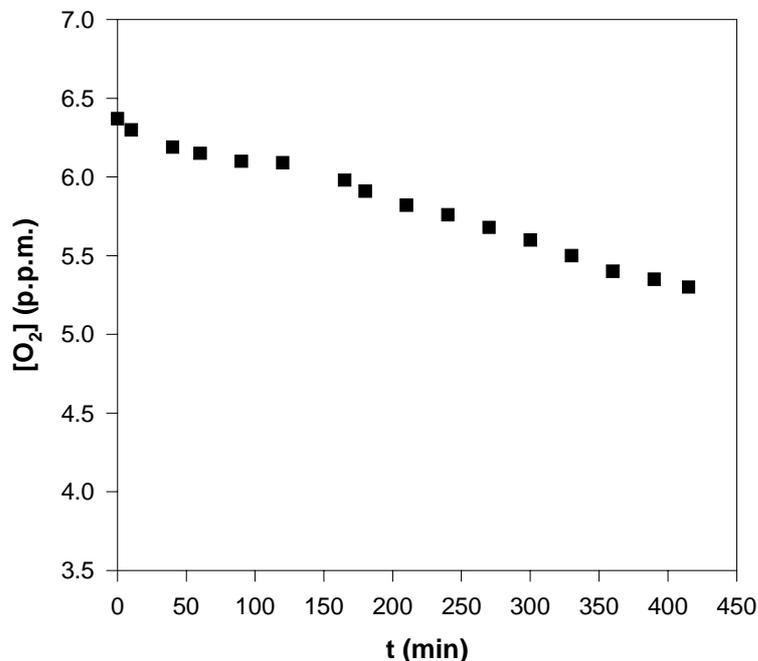
**Figura 17.4.** Evolución de la absorbancia a 364 nm y de la concentración, de una solución 700  $\mu\text{M}$  (pH= 11,0) en un experimento realizado para determinar el rendimiento cuántico. Camino óptico de irradiación: 10 mm; camino óptico para medir la absorbancia: 2 mm.



**Figura 17.5.** Espectros de los productos de fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 100  $\mu\text{M}$  (pH= 11,0) a distintos tiempos de irradiación. Los espectros corresponden a los siguientes tiempos: 15, 30, 60 y 90 min. Las flechas indican el sentido del cambio.

Como puede apreciarse en la figura 17.6, en estas condiciones también se observa

disminución de la concentración de  $O_2$  presente en la solución durante la fotólisis. Sin embargo, en este caso, el descenso en la concentración es menor al observado para las soluciones ácidas. Esto está de acuerdo con el menor rendimiento cuántico.

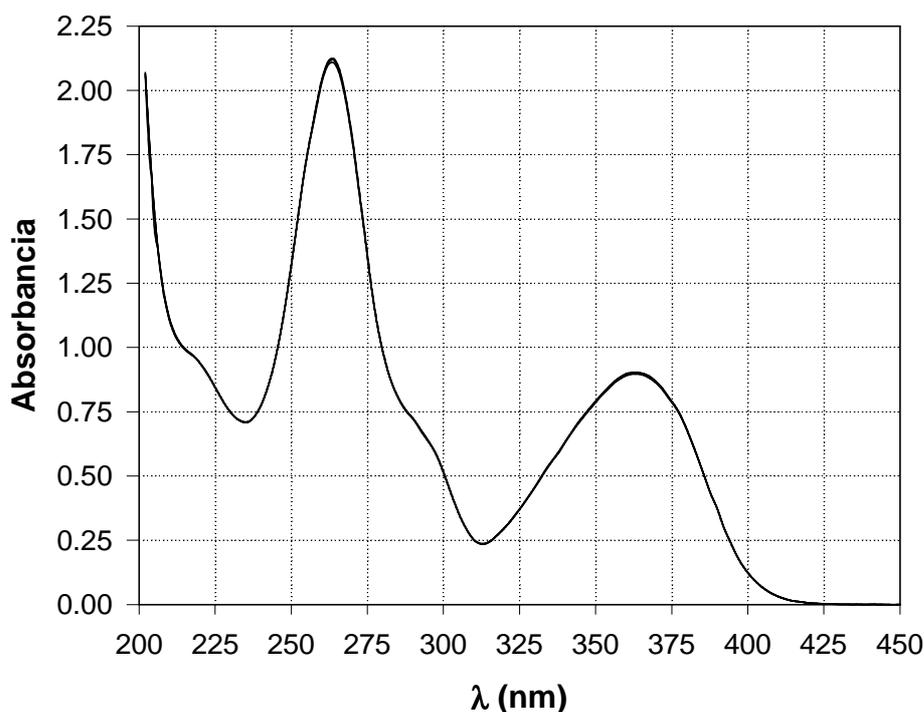


**Figura 17.6.** Disminución en la concentración de  $O_2$  disuelto durante la fotólisis de una solución de 6-carboxipterina  $200 \mu\text{M}$  ( $\text{pH}= 11,0$ ).

Considerando el descenso de absorción a  $364 \text{ nm}$  de la solución a la cual se le mide el  $O_2$  disuelto puede relacionarse la cantidad de 6-carboxipterina consumida con el  $O_2$  consumido. Para el experimento cuyos resultados son mostrados en la figura 17.6 se determinó en  $415 \text{ min}$  de fotólisis un descenso en la concentración de 6-carboxipterina de  $2,47 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Por su parte, el descenso de la concentración de  $O_2$  medido para la misma solución fue de  $2,72 \times 10^{-5} \text{ M}$ . El cociente de estas cantidades arroja un valor de  $0,91$  moles de 6-carboxipterina por cada mol de  $O_2$ . Este valor, próximo a  $1$ , indica que en la fotooxidación la reacción entre ambos reactivos tendría una relación estequiométrica  $1:1$ . Por otro lado sugiere que la vía oxidativa es la única relevante en estas condiciones.

## 17.2. Fotólisis de 6-carboxipterina en ausencia de O<sub>2</sub>.

Cuando se irradia una solución alcalina de 6-carboxipterina, previamente burbujeadada con N<sub>2</sub>, no se aprecian cambios espectrales en ninguna región del espectro UV-visible. Estos resultados se observan en la figura 17.7.

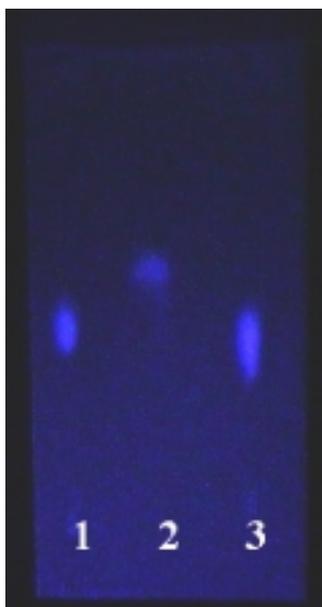


**Figura 17.7.** Espectros de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 μM, pH= 11,0) a distintos tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 min durante 3 horas. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación.

Las soluciones irradiadas fueron analizadas por TLC y HPLC. En el primer caso, como puede observarse en la figura 17.8, sólo se observó una mancha correspondiente al reactivo no fotolizado. El análisis por HPLC, por su parte, mostró que la pterina no estaba presente en las soluciones irradiadas. Tampoco se detectó ningún otro pico que no fuera el correspondiente a la 6-carboxipterina. Además la concentración del reactivo no mostró cambios apreciables durante 2 horas de irradiación.

Estos resultados muestran que el compuesto estudiado no es fotosensible en condiciones anaeróbicas. Esta conclusión es lógica teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio ácido (Capítulo 12). En efecto, en

ausencia de O<sub>2</sub> no es posible la vía oxidativa y, por otra parte, la forma alcalina de la molécula no sufre descarboxilación. Por lo tanto, en estas condiciones, están ausentes las dos vías de descomposición fotoquímica principales observadas y analizadas para la forma ácida de la 6-carboxipterina.



**Figura 17.8.** Corrida de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 200  $\mu$ M (pH= 11,0) irradiada 150 min; 2, solución de pterina 100  $\mu$ M; 3, solución de 6-carboxipterina 200  $\mu$ M.

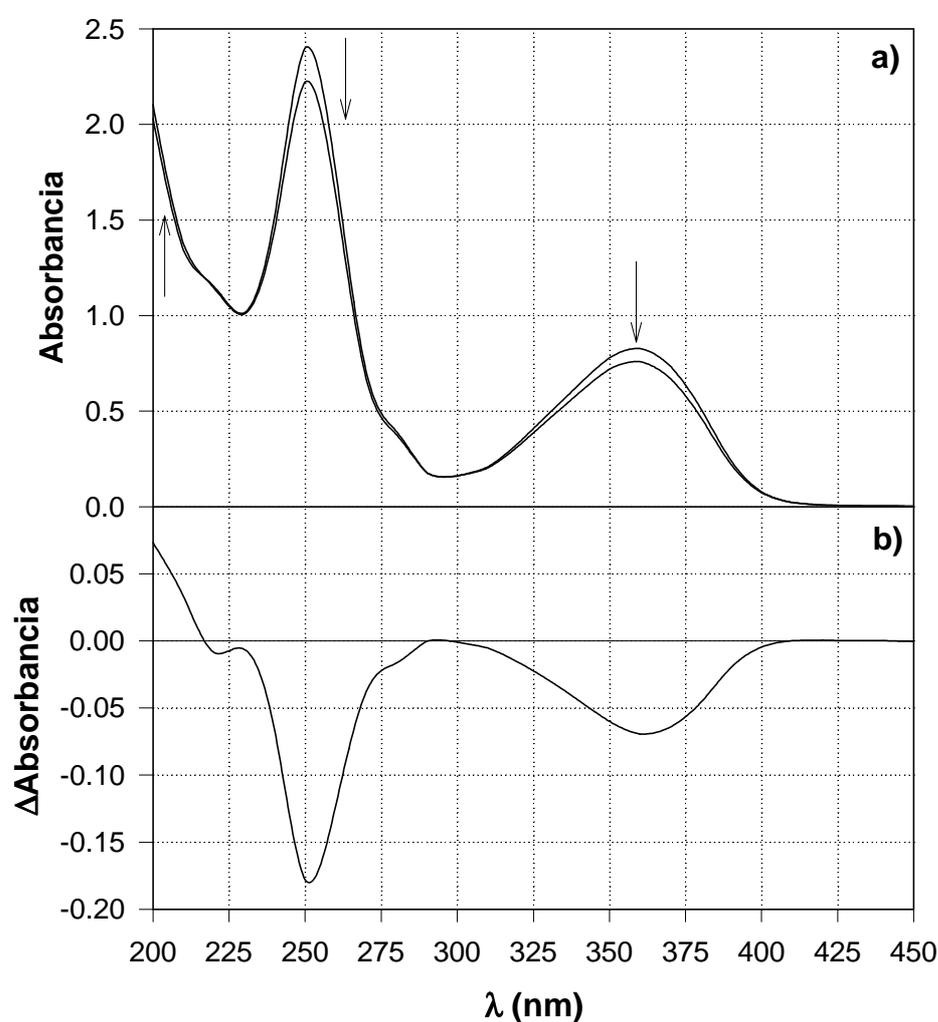
### 17.3. Fotólisis de pterina.

En un experimento de fotólisis, realizado en presencia de O<sub>2</sub>, se observó que la solución de pterina modificaba muy lentamente su espectro con el tiempo de irradiación. Estos cambios espectrales pueden apreciarse en la figura 17.9. Los correspondientes espectros DEN se mantuvieron invariantes durante todo el período de irradiación indicando la existencia de un único proceso fotoquímico.

El análisis espectral permite apreciar un comportamiento similar al observado para la fotólisis de 6-carboxipterina. Es decir, el espectro DEN es comparable, por encima de 250 nm, al espectro DTN correspondiente a una fotólisis que rinde productos que no absorben luz. Ambos espectros se muestran comparativamente en la figura 17.10, donde puede observarse que por debajo de 250 nm el espectro DEN presenta diferencias de absorbancia positivas, lo

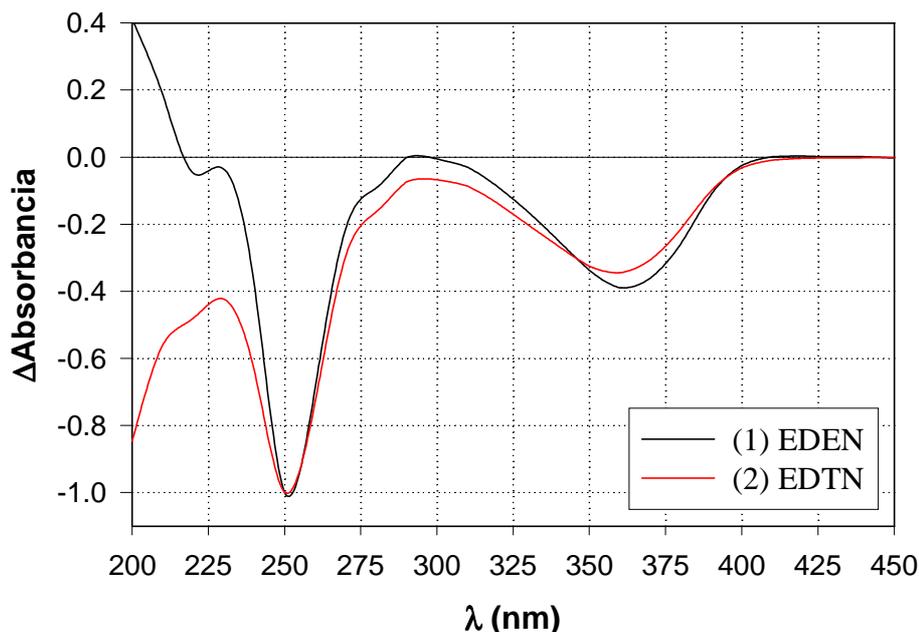
cual sugiere que durante la fotólisis se producen fotoproductos que absorben luz en esta región.

Considerando que en la zona comprendida entre 320 y 400 nm la única especie que absorbe es la pterina, puede calcularse la concentración de pterina residual para distintos tiempos de irradiación. Por lo tanto, siguiendo un procedimiento similar al explicado en la sección 17.1 para la fotólisis de 6-carboxipterina en presencia de O<sub>2</sub>, puede obtenerse el espectro de los productos, el cual es mostrado en la figura 17.11. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, se produce fotooxidación sobre la molécula de pterina produciéndose importantes cambios químicos en la estructura de doble anillo.



**Figura 17.9.** a) Evolución del espectro de absorción de una solución de pterina (125  $\mu$ M, pH=11,0) al ser irradiada en presencia de O<sub>2</sub>. Los espectros fueron tomados a tiempo 0 y 220 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectro DE correspondiente.

Las soluciones de pterina irradiadas en presencia de  $O_2$  fueron analizadas aplicando la técnica TLC. Se realizaron corridas cromatográficas empleando como solvente de corrida solución acuosa de  $NH_4Cl$  0,3% (p/v) y 3%(p/v) y se usaron placas con y sin marcador fluorescente. Bajo estas condiciones de corrida se sembraron soluciones no irradiadas e irradiadas durante 60 y 120 min. En estos experimentos no fueron detectados productos de reacción.

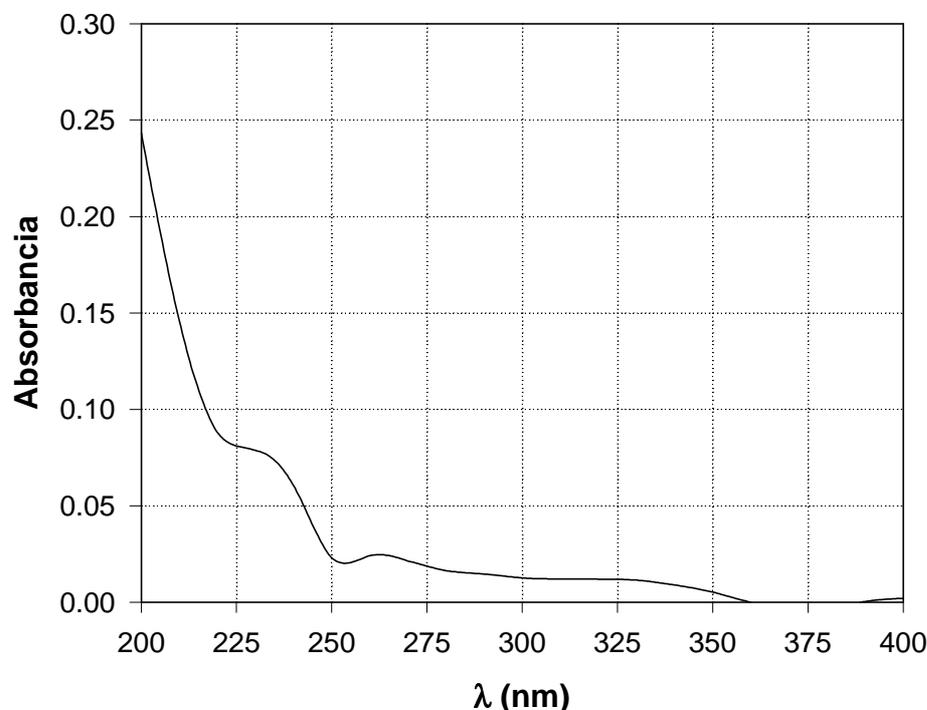


**Figura 17.10. (1) Espectro DEN obtenido luego de fotolizar durante 221 min una solución de pterina (pH= 11,0) en presencia de  $O_2$ . (2) Espectro DTN correspondiente a un proceso en el cual los productos no absorben luz en el rango del espectro analizado.**

Los estudios empleando la técnica HPLC revelan una ligera disminución en la concentración del reactivo con el tiempo de irradiación. En efecto, en un experimento en el cual las muestras fueron analizadas usando el sistema de solvente de corrida III se observó una velocidad de consumo de reactivo de sólo  $0,19 \mu M/min$ , a la cual corresponde un rendimiento cuántico de  $4,6 \times 10^{-4}$ . Es necesario aclarar que el error relativo que afecta a este valor puede ser alto debido a que fue calculado analizando una única solución irradiada 180 min. De todos modos, este resultado permite apreciar que la pterina es mucho menos fotosensible que todos los demás compuestos estudiados en las mismas condiciones.

En otra serie de experimentos, muestras irradiadas durante distintos períodos de tiempo, fueron analizadas por HPLC empleado como solvente de corrida mezclas del buffer y

acetonitrilo en distintas proporciones. En ningún caso se detectaron productos que absorban luz a 340 nm; estando estos resultados de acuerdo con aquellos obtenidos del análisis espectrofotométrico y del análisis por TLC.



**Figura 17.11.** Espectro de los productos de fotólisis de una solución de pterina (pH= 11,0) irradiada durante 221 min.

En experimentos realizados en condiciones similares al experimento de la figura 17.9, pero con soluciones de pterina burbujeadas con  $N_2$ , no se aprecian cambios espectrales en ninguna región del espectro UV-visible, aún luego de 3 horas de irradiación. Estos resultados sugieren que la pterina, al igual que la 6-carboxipterina, es fotoestable en ausencia de  $O_2$ . Corroborando esta hipótesis, el análisis de una solución de pterina 200  $\mu M$  irradiada en condiciones anaeróbicas durante 120 min, reveló que durante este tiempo la concentración del reactivo se mantiene constante.

Se buscaron fotoproductos tanto por TLC como por HPLC, realizando experimentos similares a los descritos para las fotólisis en presencia de  $O_2$ . Los resultados obtenidos fueron los mismos: en las soluciones irradiadas en condiciones anaeróbicas no se detectó ninguna sustancia aparte del propio reactivo.

## **17.4. Conclusiones**

Los resultados expuestos en este capítulo muestran que la 6-carboxipterina y la pterina presentan, en medio alcalino, comportamientos fotoquímicos similares. Ambos compuestos son fotoestables en condiciones anaeróbicas, mientras que se degradan fotoquímicamente en presencia de O<sub>2</sub> en procesos en los cuales la concentración de dicho gas disminuye en el medio a medida que avanza la fotólisis. Los análisis de las soluciones irradiadas revelan que los fotoproductos han perdido la estructura básica de doble anillo común a todos los compuestos pterínicos.

Por otra parte, los rendimientos cuánticos de estas reacciones son mucho menores que los correspondientes a las reacciones estudiadas en los capítulos anteriores. Esta comparación permite inferir que, para la familia de compuestos estudiada, el doble anillo pterínico es mucho más resistente a las reacciones de fotooxidación que los sustituyentes unidos al mismo. Asimismo, debe admitirse, tal como se hizo en el estudio realizado en medio ácido, que reacciones de fotooxidación del doble anillo pueden estar presentes en las fotólisis de ácido fólico y 6-formilpterina y no ser detectadas por sus eficiencias despreciables frente a la de los otros procesos exitentes.