

Capítulo 1.

Presentación y objetivos

La absorción de radiación electromagnética por parte de una molécula puede conducir a la formación de especies electrónicamente excitadas, las cuales pueden exhibir una química diferente a la de su predecesor, la especie en su estado basal. Existen muchos posibles destinos para la molécula excitada, alguno de los cuales implican cambios químicos y otros no. En aquellos casos en los cuales ocurren los primeros, se habla de procesos fotoquímicos, mientras que los segundos son denominados genéricamente procesos fotofísicos. Este trabajo de tesis doctoral trata fundamentalmente sobre la fotoquímica del ácido fólico y de aquellas pterinas que resultan de su degradación fotoquímica, particularmente 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

1.1. ¿Por qué estudiar la fotoquímica del ácido fólico y pterinas?

Las pterinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están ampliamente distribuidos en los sistemas biológicos, desempeñando diversas funciones. El ácido fólico que, como se explicará en el próximo capítulo, puede considerarse un derivado de las pterinas, está también presente en los seres vivos, constituyendo para los mamíferos una importante vitamina.

Algunos integrantes de este grupo de sustancias participan, o se ha propuesto su participación, en procesos fotobiológicos, los cuales pueden considerarse como procesos fisiológicos desencadenados por la luz. Estos fenómenos se inician, en general, por la captación de la luz por determinada molécula que actúa a modo de antena. Este acontecimiento inicial conduce a un cambio químico inicial que dispara una serie de

reacciones químicas que terminan produciendo una respuesta fisiológica de la célula a la luz. Debido a que muchos de estos procesos fotobiológicos han sido descubiertos y caracterizados recientemente, a las dificultades experimentales de trabajar con sistemas biológicos y a la escasez de información respecto al comportamiento fotoquímico de las pterinas, la mayor parte de ellos aún no han sido explicados en detalle.

Es evidente que el conocimiento de la fotofísica y la fotoquímica de las pterinas y compuestos relacionados permitirán una mejor comprensión de su participación en estos fenómenos fotobiológicos. Sin embargo, es notable la poca información fisicoquímica y, en particular, fotoquímica y fotofísica que existe sobre estos compuestos en la literatura. Esto puede deberse, en parte, a que sólo recientemente se ha mostrado interés en ellos, a la luz de su descubrimiento en un creciente número de seres vivos. Las dificultades técnicas en su preparación, también pueden haber contribuido a este fenómeno.

Por otra parte, la fotoquímica de estos compuestos reviste cierto interés desde el punto de vista técnico. En efecto, patrones de estas sustancias son empleados en diversos estudios bioquímicos y químicos orgánicos. En general, si bien estos compuestos son reconocidos como fotosensibles desde hace mucho tiempo (Bloom et al., 1944; Forrest y Mitchell, 1955; Patterson et al., 1956), existe muy poca información sobre su susceptibilidad a la degradación fotoquímica bajo distintas condiciones. El conocimiento de la influencia de diversos factores, tales como la presencia de sustituyentes en la estructura básica de las pterinas, el pH de la solución, el rango de longitudes de onda de la luz incidente y la presencia del O₂, sobre la sensibilidad a la luz permitirá tomar las precauciones necesarias para evitar su descomposición fotoquímica.

En este trabajo se presenta un estudio *in vitro* de la fotoquímica del ácido fólico y las pterinas. En particular, se optó por investigar las transformaciones químicas que sufren estos compuestos al ser irradiados en solución acuosa. Se eligió luz UV-A, que es la que presenta longitudes de onda comprendidas entre 320 y 400 nm, para realizar este estudio. La causa de esta elección reside en que este tipo de luz UV es la que llega en mayor proporción a la superficie de la tierra desde el sol y, por ello es la que tiene mayor importancia desde el punto de vista fotobiológico. Por otro lado, estos compuestos no absorben luz visible (aquella de longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm), o lo hacen en muy baja proporción, y, por ende, son estables o muy poco sensibles a este tipo de radiación electromagnética.

1.2. Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es aportar información sobre reacciones fotoquímicas desencadenadas al irradiar con luz UV-A soluciones acuosas de ácido fólico y otros derivados pterínicos, en distintas condiciones de pH. En particular, pueden mencionarse algunos objetivos más puntuales que han dirigido el diseño de los experimentos.

- *Identificación de fotoproductos.* El único trabajo encontrado en la literatura, realizado específicamente sobre la fotoquímica del ácido fólico, es un estudio llevado a cabo por Lowry, Bessey y Crawford en 1949 sobre los efectos de la luz UV-A sobre ácido fólico disuelto en soluciones acuosas de ácido acético 0,01 M. En esta publicación se señala que esta sustancia origina 6-formilpterina, 6-carboxipterina y pterina. Sin embargo, no se analiza el efecto del pH ni se proponen mecanismos de reacción. Tampoco se reportan rendimientos cuánticos. El citado trabajo, que será expuesto con mayor detalle más adelante, fue tomado como base para la realización de los experimentos dirigidos a la identificación de los productos originados en la degradación fotoquímica de los distintos compuestos estudiados.
- *Evaluación de la influencia del pH.* Tanto el ácido fólico como las distintas pterinas estudiadas en este trabajo presentan equilibrios ácido-base en solución acuosa. Los primeros experimentos de fotólisis realizados en distintas condiciones de pH mostraron una fuerte dependencia de la fotoquímica de los compuestos estudiados con este parámetro experimental. Como consecuencia de estos resultados preliminares se decidió estudiar sistemáticamente la influencia del pH sobre la velocidad y mecanismo de las diferentes reacciones de degradación fotoquímica analizadas.
- *Determinación de las constantes de ionización:* Se establecieron los equilibrios ácido-base existentes en solución acuosa para los distintos compuestos estudiados. Esta información es necesaria para desarrollar el estudio de la influencia del pH planteada en el apartado anterior.
- *Investigación del papel del O₂:* Se diseñaron experimentos cuyo objetivo es establecer si el O₂ disuelto en el medio participa en las reacciones químicas estudiadas. Para aquellos casos en los cuales se demostró esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos tendientes a dilucidar la manera específica cómo este gas ataca a los reactivos en los procesos fotoquímicos y se estudió la presencia de especies activas del oxígeno. En particular, se investigó el papel del oxígeno singlete en el mecanismo de las reacciones.
- *Determinación de los rendimientos cuánticos:* Se realizaron experimentos tendientes a

determinar los rendimientos cuánticos de los distintos procesos fotoquímicos detectados. Los resultados obtenidos en distintas condiciones fueron comparados para establecer generalizaciones y tendencias.

- *Estudio de reacciones térmicas en las que participan fotoproductos:* Se planteó como objetivo investigar la estabilidad en la oscuridad de los fotoproductos; es decir, se buscaron reacciones térmicas que pudieran ser detectadas una vez que se interrumpe la irradiación. En estudios preliminares se encontró un proceso de este tipo en soluciones alcalinas de ácido fólico irradiadas. Se realizó un estudio cinético de esta reacción.

1.3. Estructura y diseño del trabajo de tesis.

El presente trabajo de tesis doctoral esta dividido en cuatro partes cada una de las cuales contiene varios capítulos que, a su vez, están divididos en varias secciones. A continuación se presentará un breve resumen sobre el contenido de cada una de las partes.

- *Parte I: Introducción.* En esta parte, además del presente capítulo que sirve a modo de introducción, se encuentra toda la información relevante accesible en literatura. En el capítulo 2 se incluye, además de la nomenclatura necesaria para nombrar a los compuestos estudiados, información química básica sobre los mismos. El capítulo 3 consiste en un resumen de los principales procesos bioquímicos en los cuales se hallan involucrados el ácido fólico y las pterinas. Se exponen con mayor detalle los procesos fotobiológicos. El último capítulo de esta parte describe la información sobre la fotofísica y fotoquímica de las pterinas reportada en la literatura. Se detallan aquí, con mayor profundidad, los resultados más estrechamente relacionados con el presente trabajo de tesis.

- *Parte II: Materiales y métodos experimentales.* En esta parte, como su nombre lo indica, se detallan todas las técnicas experimentales empleadas en este trabajo. En el capítulo 5 se describen las titulaciones espectrofotométricas llevadas a cabo para determinar las constantes de ionización de los compuestos estudiados y, con ellos, determinar las distintas formas ácido-base presentes en solución. En el capítulo 6 se describe la técnica empleada para irradiar las soluciones con luz UV. Asimismo se explican las distintas condiciones experimentales ensayadas y los procedimientos mediante los cuales las mismas fueron logradas. Por último, en este capítulo se expone, además, la metodología empleada para la determinación de los

rendimientos cuánticos. En el capítulo 7 se presentan todas las técnicas analíticas mediante las cuales se analizaron las soluciones irradiadas. El último capítulo de esta parte está dedicado a algunas técnicas especiales que no fueron usadas sistemáticamente a lo largo de todo el trabajo, sino que, por el contrario, fueron aplicadas sólo en ciertos casos puntuales. Entre ellas se encuentra la técnica de flujo detenido para el análisis cinético de reacciones rápidas, la determinación de los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete y la técnica de fotólisis de flash.

- *Parte III: Fotólisis de soluciones ácidas.* Esta parte contiene un primer capítulo donde se exponen los resultados de las titulaciones espectrofotométricas y se reportan los correspondientes valores de las constantes de ionización obtenidos, para los distintos compuestos estudiados. En lo que respecta a los resultados de los estudios fotoquímicos propiamente dichos, se parte de la reacción de fotodescomposición del ácido fólico, la cual da como resultado la formación de un producto que es, a su vez, es fotosensible. Se prosigue, con el estudio de la fotoquímica de este compuesto, luego con el estudio de la fotoquímica de los productos de esta segunda reacción y así sucesivamente. Así, el capítulo 10 muestra los resultados de los experimentos realizados sobre soluciones de ácido fólico, el capítulo 11 se ocupa de la fotólisis de la 6-formilpterina y el 12 de las fotólisis de la 6-carboxipterina. En definitiva, esta parte desarrolla toda la secuencia de reacciones fotoquímicas generadas a partir de la irradiación de soluciones ácidas de ácido fólico.

- *Parte IV: Fotólisis de soluciones alcalinas.* Esta parte tiene una estructura similar a la anterior, comenzando, por ende, por el estudio de la fotólisis del ácido fólico (capítulo 13). En este capítulo se reporta el descubrimiento de una reacción fotoquímica de la cual no existe información en la literatura y cuyos productos no coinciden con los encontrados en las fotólisis realizadas en medio ácido. El capítulo 14 expone los resultados de ciertos estudios tendientes a caracterizar los productos de esta nueva reacción. El capítulo 15, por su parte, muestra los estudios cinéticos realizados sobre una reacción térmica que se detecta luego de interrumpir la irradiación de soluciones alcalinas de ácido fólico y en la cual están involucrados los productos descritos en el capítulo anterior. Finalmente, los capítulos 16 y 17 son análogos a los capítulos 11 y 12; es decir, están dedicados a las degradaciones fotoquímicas de 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

Por último, pueden citarse ciertas características que se repiten a lo largo del trabajo. Al principio de cada capítulo, por ejemplo, existe una breve introducción que presenta los

temas que se van a desarrollar. Finalmente, casi todos los capítulos en los cuales se exponen resultados experimentales (partes III y IV) tienen una última sección en la cual se resumen dichos resultados e incluyen las conclusiones más importantes que pueden deducirse a partir de ellos.