

Capítulo 9.

Estudio espectrofotométrico de los equilibrios ácido-base.

Antes de comenzar con el desarrollo de este capítulo es necesario mencionar que el mismo no se ocupa de describir resultados de experimentos de fotólisis realizadas sobre soluciones ácidas, como lo hacen los restantes capítulos de la Parte III de este trabajo de tesis. Sin embargo, ha sido incluido al inicio de esta parte por razones de comodidad. Este capítulo describe estudios requeridos para la interpretación de los resultados de las fotólisis tanto en medio ácido como en medio alcalino.

Como se mencionó en el capítulo 2, el doble anillo pterínico presenta numerosos grupos ionizables en su estructura. Debido a esto, de acuerdo al pH de la solución, el ácido fólico y las pterinas presentan distintas formas ácido-base que difieren entre sí en la carga neta de la molécula. Estas formas ácido-base, como se detallará más adelante, presentan diferentes comportamientos fotoquímicos, siendo, por lo tanto, imprescindible conocer qué forma es la que está presente en las condiciones de pH en las cuales se realizan los experimentos.

El pH de las soluciones irradiadas en los experimentos fotoquímicos, llevados a cabo para el presente trabajo de tesis, se fijó en el rango comprendido entre 5,0 y 13,0. En este intervalo existe, de acuerdo con los antecedentes en literatura, básicamente un solo equilibrio ácido-base presente en las sustancias empleadas. En este equilibrio, representado en la figura 9.1, el grupo amida se transforma en un fenolato al alcalinizar la solución. En el futuro, cuando se mencione "la forma ácida" de determinado derivado pterínico se estará haciendo referencia a la estructura (1) de la figura 9.1. De forma análoga, "la forma alcalina" indicará que el doble anillo del compuesto en cuestión presenta la estructura (2) de dicha figura 9.1.

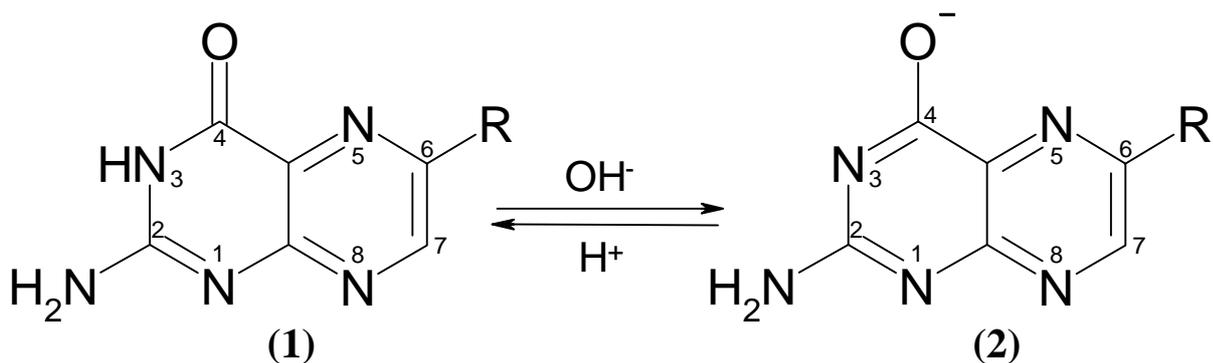


Figura 9.1. Equilibrio ácido-base presente en todos los derivados pterínicos.

Debido a estas consideraciones, se decidió realizar un estudio de este equilibrio para todos los compuestos que serían irradiados. Con esta información se fijaron, posteriormente, las condiciones de pH de los experimentos de fotólisis para dejar bien definido qué forma ácido-base está participando en las distintas reacciones fotoquímicas estudiadas.

En este capítulo se presentan los resultados de las titulaciones realizadas según la técnica detallada en el capítulo 5, reportándose los valores de las constantes de ionización (constantes de disociación ácida, K_a) para cuatro derivados pterínicos: pterina, ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. También se muestran los espectros de absorción de ambas formas ácido-base para todos los compuestos estudiados.

9.1. Pterina

La pterina presenta un único equilibrio ácido-base en el intervalo de pH analizado. En la figura 9.2, puede observarse la variación de absorbancia a 368 nm obtenida para la titulación.

Siguiendo el procedimiento detallado en el capítulo 5, se obtuvieron, a distintas longitudes de onda, los valores de K_a que se listan en la tabla 9.1. Asimismo, en esta tabla se presenta el valor promedio de dicha constante.

En la figura 9.3 se muestran los espectros de absorción correspondientes a las formas ácida y alcalina de la pterina. Puede observarse que esta última presenta la banda de la región 300-400 nm desplazada hacia el visible, a la vez que la banda más intensa, ubicada en la zona 230-290 nm, desplazada hacia el ultravioleta. Además la forma alcalina presenta una mayor

intensidad en ambas bandas de absorción.

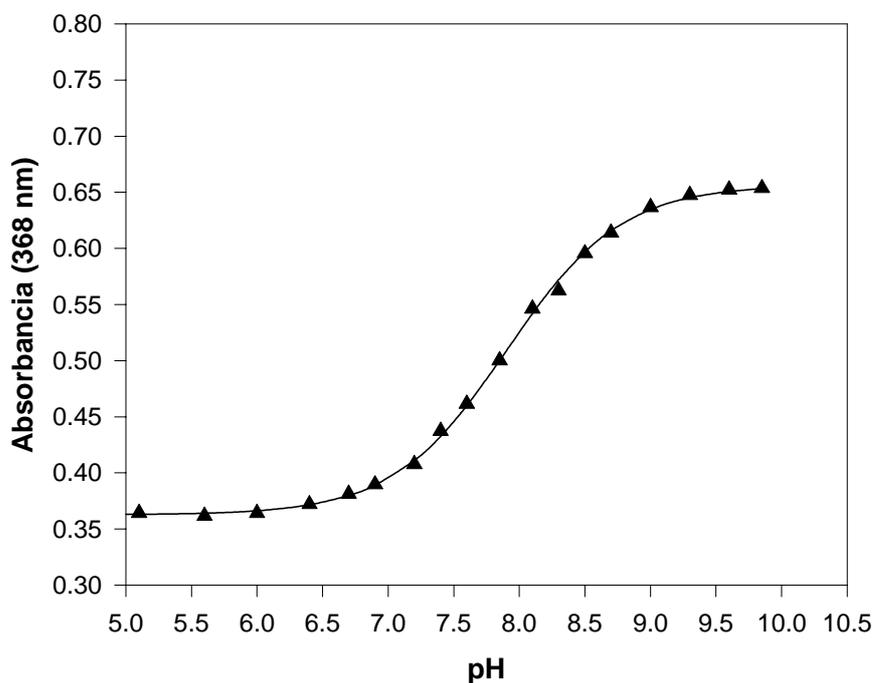


Figura 9.2. Curva de titulación a 368 nm para una solución de pterina (100 μ M). La línea representa el ajuste no lineal realizado con la ecuación teórica sobre los datos experimentales.

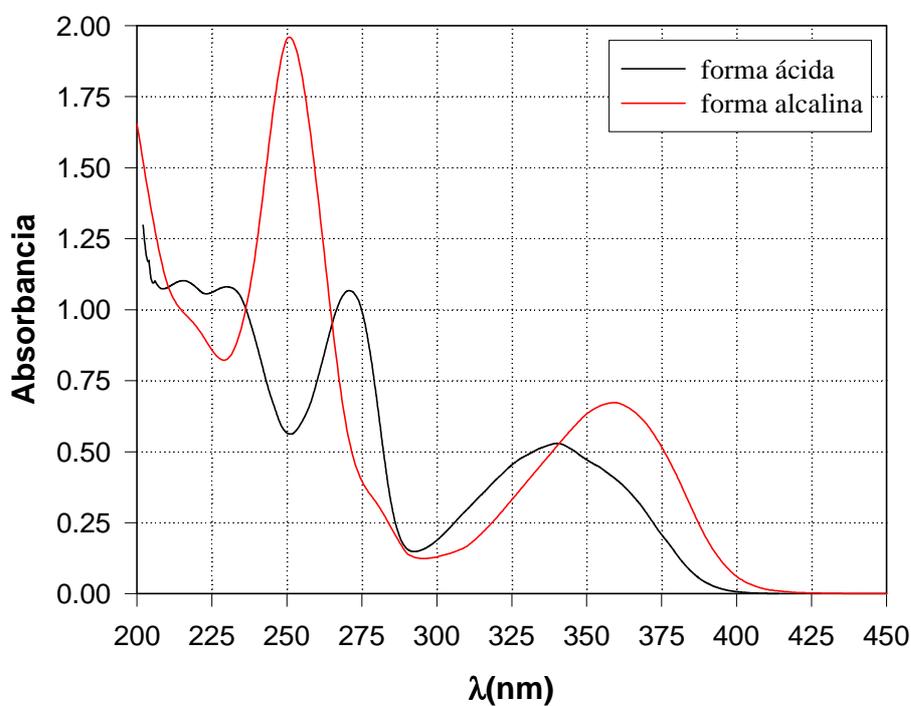


Figura 9.3. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la pterina. Solución acuosa de pterina (100 μ M). Camino óptico: 1 cm.

λ	K_a	λ	K_a	Promedio $K_a= 1,23 \times 10^{-8}$ $\sigma_{n-1}= 5,5 \times 10^{-10}$ CV%= 4,5 pKa= 7,91
250	$1,31 \times 10^{-8}$	364	$1,23 \times 10^{-8}$	
272	$1,18 \times 10^{-8}$	368	$1,24 \times 10^{-8}$	
312	$1,16 \times 10^{-8}$	372	$1,25 \times 10^{-8}$	

Tabla 9.1. Constante de ionización de la pterina obtenida a distintas longitudes de onda.

9.2. 6-Formilpterina

Para la 6-formilpterina, como se esperaba, también se detectó un único equilibrio ácido-base en la zona de pH analizada. Una curva de titulación correspondiente a este compuesto fue mostrada en la figura 5.1. Las constantes obtenidas a distintas longitudes de onda se listan en la tabla 9.2. La figura 9.4 muestra los espectros de absorción de las formas ácida y alcalina.

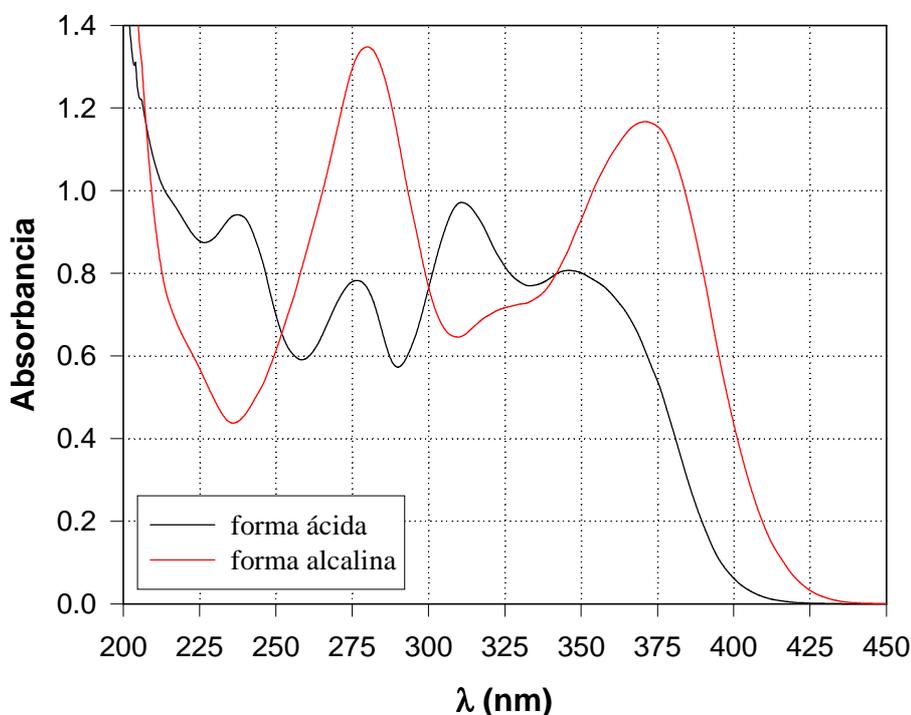


Figura 9.4. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la 6-formilpterina. Solución acuosa de 6-formilpterina (90 μ M). Camino óptico: 1 cm.

λ	Ka	λ	Ka	Promedio Ka= 4,68x10⁻⁸ $\sigma_{n-1}= 1,5x10^{-9}$ CV%= 3,2 pKa= 7,33
274	4,89x10 ⁻⁸	374	4,64x10 ⁻⁸	
278	4,97x10 ⁻⁸	378	4,64x10 ⁻⁸	
310	4,49x10 ⁻⁸	382	4,64x10 ⁻⁸	
314	4,59x10 ⁻⁸	388	4,63x10 ⁻⁸	
370	4,65x10 ⁻⁸			

Tabla 9.2. Constante de ionización de la 6-formilpterina obtenida a distintas longitudes de onda.

9.3. 6-Carboxipterina

La 6-carboxipterina presenta el mismo equilibrio ácido-base que los dos compuestos analizados anteriormente. En la figura 9.5 se muestra una curva de titulación típica donde se observa la presencia de un solo grupo ionizable en el rango de pH comprendido entre 6 y 11. En la figura 9.6 pueden observarse los espectros de absorción de las formas ácida y básica y en la tabla 9.3 se muestran los resultados obtenidos a partir de los datos experimentales para la determinación de Ka.

A diferencia de lo observado para los dos compuestos anteriores, cuando se acidifica una solución de 6-carboxipterina llevando el pH de la misma por debajo de 4, se observan nuevos cambios espectrales. Esto indica la presencia de otra forma ácido-base y, por ende, la presencia de un grupo con un pKa menor a 4. Este grupo podría ser el carboxilo de la posición 6, ya que los ácidos carboxílicos presenta valores de pKa generalmente comprendidos entre 2 y 5, dependiendo de la estructura de la molécula orgánica a la cual pertenecen (Streitwieser y Heathcock, 1989).

Se realizó otra titulación ácido-base para determinar el valor de la constante de ionización asociada a este grupo. Se obtuvo un valor de $8,83x10^{-4}$ (pKa = 3,05). Sin embargo, se observó la presencia de otra forma ácido-base más que comienza a ser significativa a valores de pH inferiores a 2. De acuerdo con esto, la titulación se extendió para evaluar este otro equilibrio. Según datos existentes en bibliografía, detallados en la sección 2.2.2 (tabla 2.3), este equilibrio se trataría de la protonación de uno de los nitrógenos del doble anillo

pterínico. La titulación arrojó un valor de $5,45 \times 10^{-2}$ para la constante de este equilibrio ($pK_a = 1,26$).

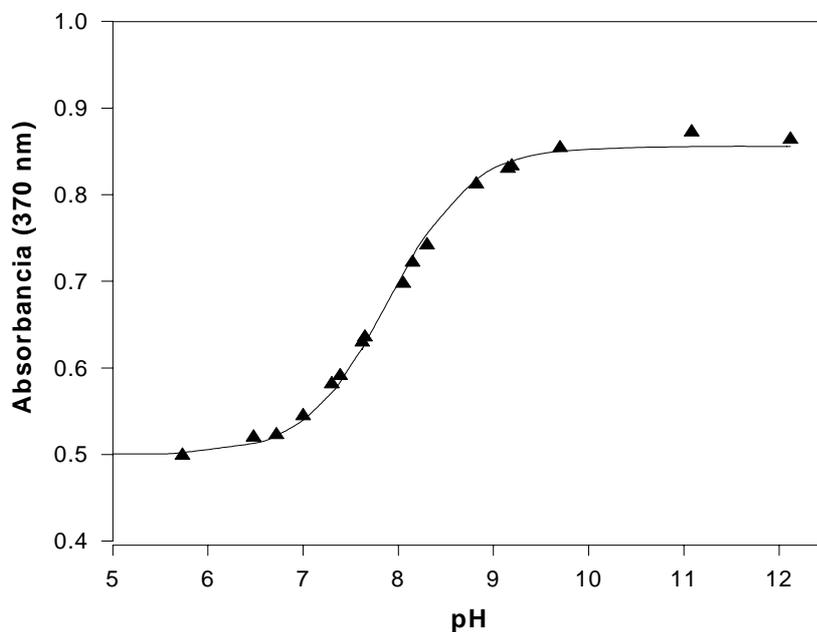


Figura 9.5. Curva de titulación a 370 nm para una solución de 6-carboxipterina (100 μ M). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación teórica.

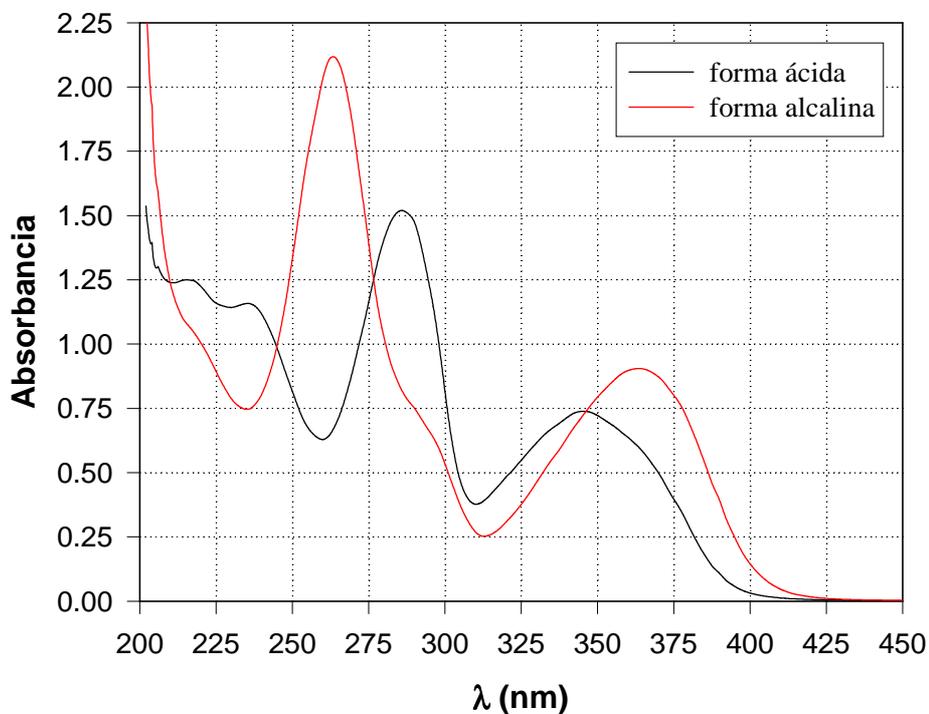


Figura 9.6. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la 6-carboxipterina. Solución acuosa de 6-carboxipterina (100 μ M). Camino óptico: 1 cm.

λ	Ka	λ	Ka	Promedio Ka= 1,30x10⁻⁸ $\sigma_{n-1}= 1,3x10^{-9}$ CV%= 10,3 pKa= 7,89
262	1,21x10 ⁻⁸	292	1,28x10 ⁻⁸	
264	1,27x10 ⁻⁸	294	1,38x10 ⁻⁸	
268	1,48x10 ⁻⁸	370	1,43x10 ⁻⁸	
288	1,06x10 ⁻⁸	374	1,26x10 ⁻⁸	

Tabla 9.3. Constante de ionización de la 6-carboxipterina obtenida a distintas longitudes de onda.

Cabe aclarar que, la denominada hasta el momento, forma alcalina tiene para la 6-carboxipterina carga neta -2, mientras que para los otros dos derivados pterínicos analizados, -1. Por su parte, la forma ácida presenta carga neta -1 para la 6-carboxipterina, por tener el grupo carboxílico desprotonado (la pterina y la 6-formilpterina tienen carga neta 0 para esta forma). Las dos nuevas formas ácido-base detectadas para la 6-carboxipterina presentarían carga 0 y +1. La primera posee el grupo carboxilo protonado, la segunda además de esto presenta uno de los nitrógenos del doble anillo protonado. La pterina y la 6-formilpterina, según lo expuesto en el capítulo 2, también presentan formas con carga neta positiva en soluciones suficientemente ácidas, pero estos equilibrios no fueron estudiados.

La figura 9.7 muestra una curva de titulación en la cual pueden apreciarse los dos equilibrios citados, mientras que en la figura 9.8 se observan los espectros de absorción de las formas con carga 0 y -1 de la 6-carboxipterina.

Es necesario advertir que los dos últimos equilibrios estudiados en esta sección, es decir, la ionización del grupo carboxilo y la ionización del nitrógeno anular, no están lo suficientemente separados entre sí; por el contrario, se encuentran ligeramente solapados. Esto conduce a que el espectro de la forma 0 mostrado en la figura 9.8 no sea puro por estar presente en la solución una pequeña cantidad de la forma +1. Asimismo, en rigor, las curvas obtenidas de la titulación no pueden ser analizadas como dos equilibrios independientes y la ecuación empleada, que supone un único equilibrio, no es estrictamente válida. Debido a esto, los resultados obtenidos en la determinación de las correspondientes constantes de ionización pueden presentar un mayor error experimental que los otros resultados ya mostrados. Sin embargo, un análisis más riguroso de estos equilibrios escapa a los objetivos de este capítulo.

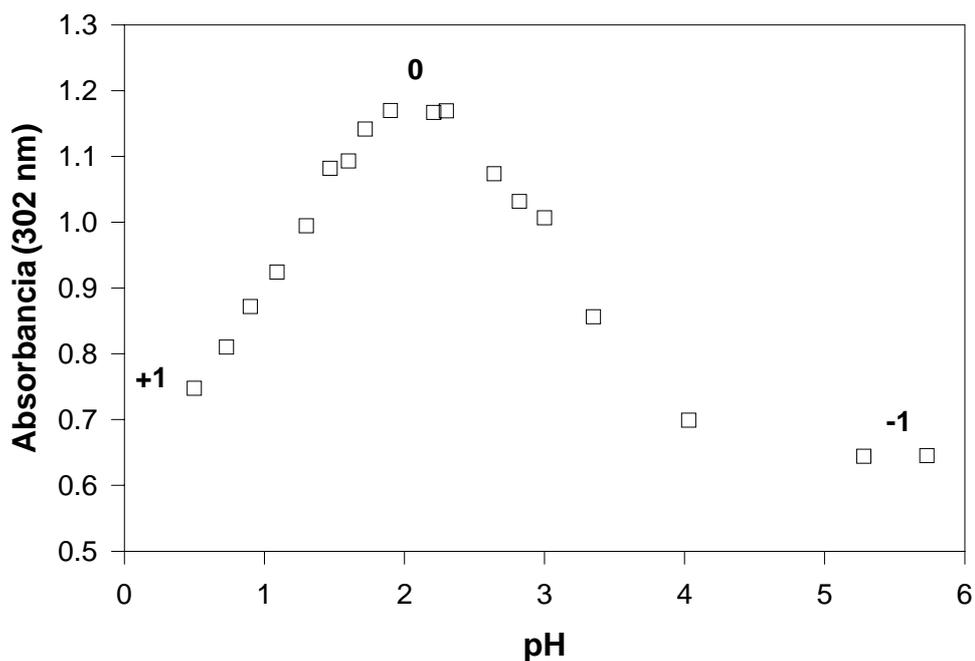


Figura 9.7. Curva de titulación a 302 nm para una solución de 6-carboxipterina (100 μM). Se consigna la carga neta de las formas que predominan en distintas zonas de pH.

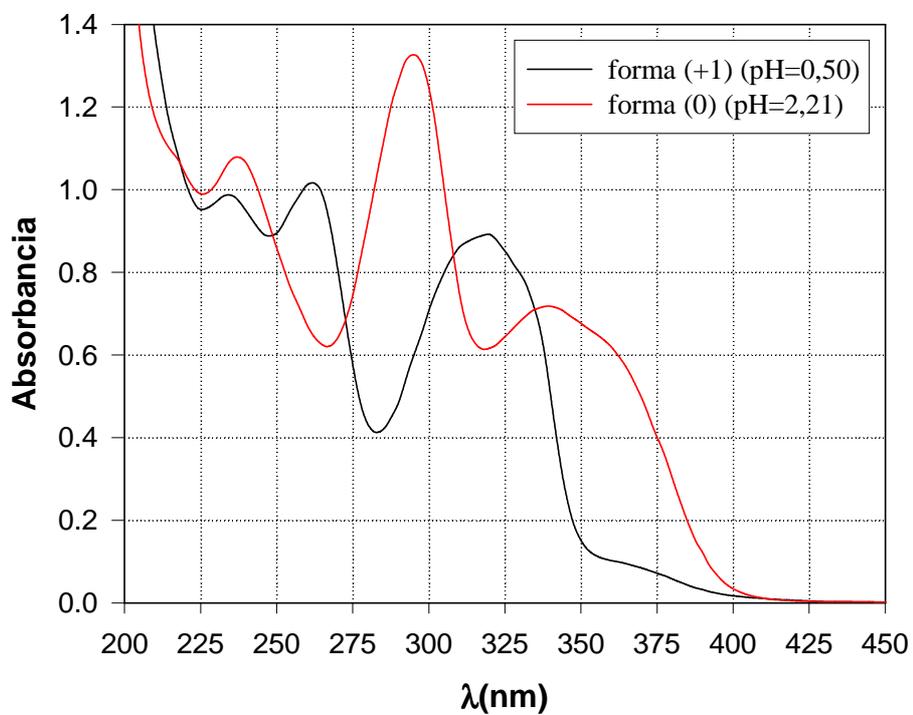


Figura 9.8. Espectros de absorción de las formas con carga neta 0 y +1 de la 6-carboxipterina. Solución acuosa de 6-carboxipterina (100 μM). Camino óptico: 1 cm.

9.4. Ácido fólico

El ácido fólico, en su doble anillo pterínico, presenta el mismo grupo ionizable que las pterinas; además posee dos grupos carboxílicos en su porción de ácido glutámico. De acuerdo a los pKa que presentan en la molécula del aminoácido libre ($pK_{a1}=2,19$; $pK_{a2}=4,25$; Lehninger, 1985), estos grupos se encuentran ionizados en soluciones ligeramente ácidas, neutras o alcalinas. En estas condiciones, estas dos cargas adicionales, le confieren al ácido fólico una solubilidad muy alta en comparación con otras pterinas. Sin embargo, al disminuir el pH de las soluciones la solubilidad disminuye drásticamente. Este efecto se atribuye a la protonación de los grupos carboxilos, lo cual reduce la repulsión electrostática entre las moléculas de ácido fólico.

Para determinar la constante de ionización del equilibrio amida-fenolato, se realizó la titulación espectrofotométrica en un rango de pH donde el ácido fólico es soluble. La curva obtenida a 366 nm se muestra en la figura 9.9, mientras que en la figura 9.10 pueden observarse los espectros de absorción de las correspondientes formas ácida y alcalina. La tabla 9.4, por su parte, presenta los valores de Ka obtenida para distintas longitudes de onda y el valor promedio.

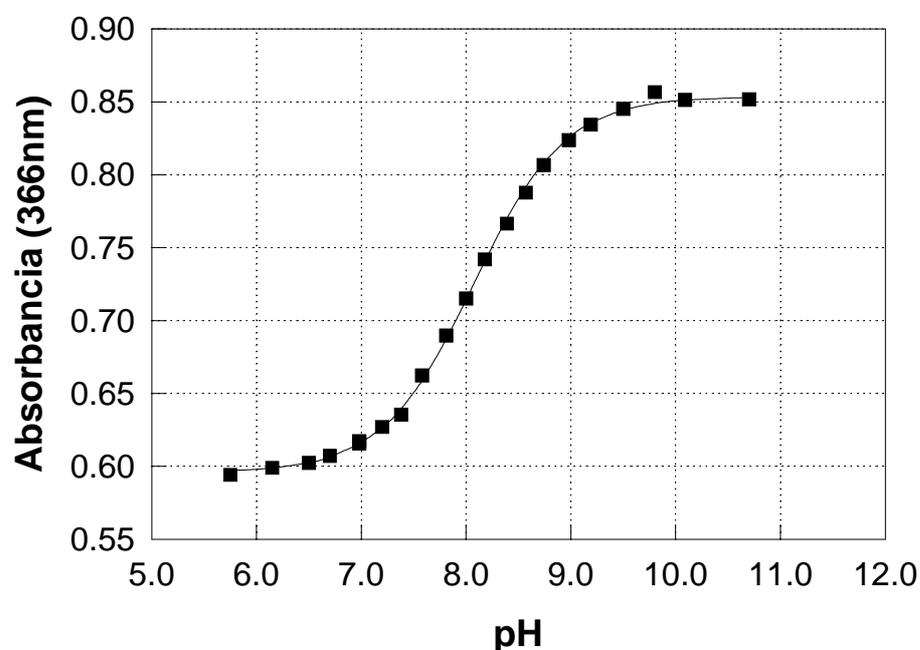


Figura 9.9. Curva de titulación a 366 nm para una solución de ácido fólico (100 μ M). La línea representa la regresión no lineal realizada con la ecuación teórica.

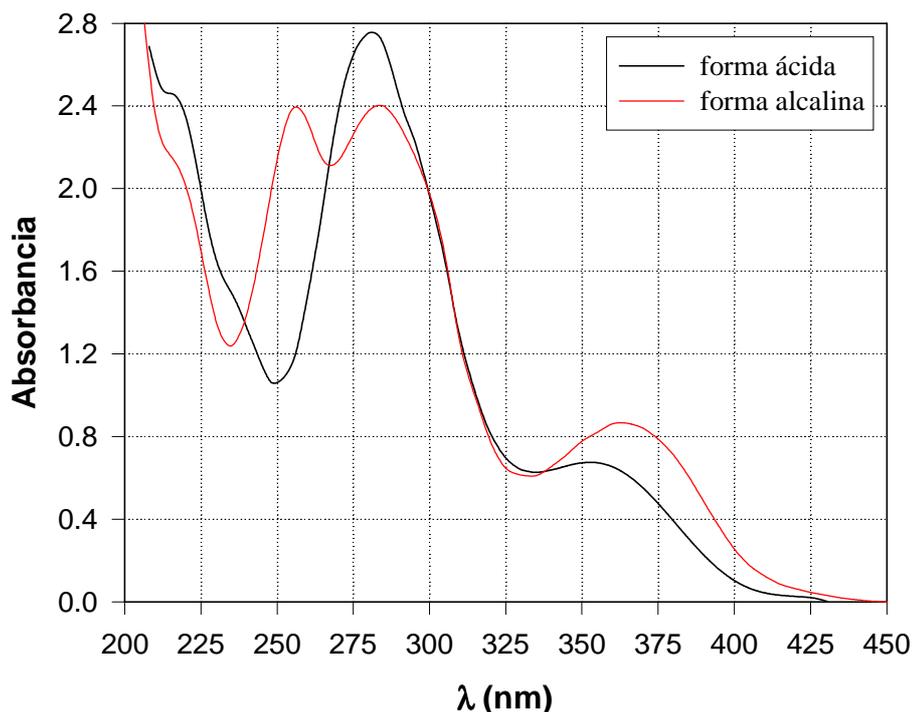


Figura 9.10. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina del ácido fólico. Solución acuosa de ácido fólico (100 μM). Camino óptico: 1 cm.

λ	Ka	λ	Ka	Promedio Ka= 8,55x10⁻⁹ σ_{n-1} = 1,05x10 ⁻¹⁰ CV%= 1,2 pKa= 8,07
358	8,42x10 ⁻⁹	382	8,62x10 ⁻⁹	
366	8,48x10 ⁻⁹	390	8,69x10 ⁻⁹	
374	8,47x10 ⁻⁹	398	8,59x10 ⁻⁹	

Tabla 9.4. Constante de ionización del ácido fólico obtenida a distintas longitudes de onda.

9.5. Ácido *p*-aminobenzoilglutámico

Este compuesto, si bien no es una pterina, fue incluido en este estudio por ser uno de los productos detectados durante la fotólisis del ácido fólico. Su espectro será utilizado más adelante para su identificación en las soluciones irradiadas de ácido fólico y, por eso, es

importante un mayor conocimiento de esta sustancia.

En la figura 9.11 puede apreciarse su espectro de absorción, el cual presenta una banda relativamente intensa con un máximo de absorción en aproximadamente 270 nm. Al variar el pH de la solución en el rango comprendido entre 5 y 12 no se observan variaciones significativas, indicando que no existen equilibrios ácido base en esa región. Sin embargo, al descender el pH el espectro de absorción de las soluciones de ácido *p*-aminobenzoilglutámico comienza a modificarse. En la figura 9.11 se muestran los espectros correspondientes a soluciones con pH 3 y 4. Esto indica que en esa región de pH coexisten al menos dos formas ácido-base. No se determinó la constante de ionización, ni se investigó este equilibrio pues los experimentos fotoquímicos fueron realizados en soluciones no tan ácidas.

La banda del espectro del ácido *p*-aminobenzoilglutámico contribuye a la absorción de luz por parte de la molécula de ácido fólico en esa región del espectro; estando, en la forma ácida, solapada completamente a la banda más intensa del anillo pterínico y, en la forma alcalina, sólo parcialmente solapada. De esta manera puede explicarse la existencia de las tres bandas de absorción que presenta el espectro del ácido fólico en soluciones alcalinas.

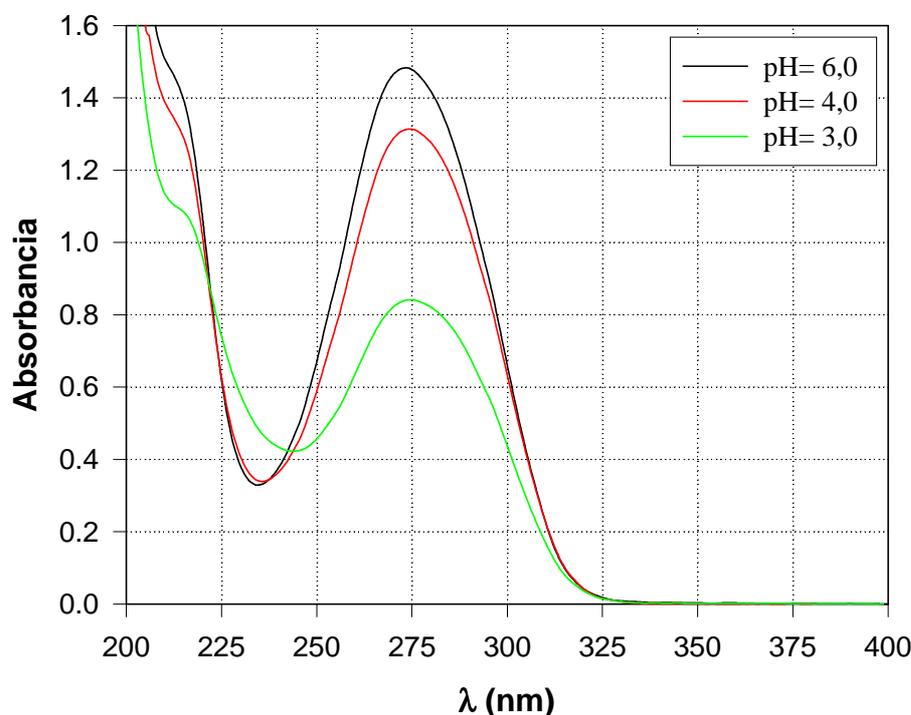


Figura 9.11. Espectros de absorción de una solución 100 μM de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Camino óptico: 1 cm.

El grupo responsable de los cambios espectrales observados es, posiblemente, el grupo amino de la molécula. En la anilina, por ejemplo, el pKa de este grupo es 4,60 y la presencia de sustituyentes electrofílicos disminuyen la basicidad por efecto inductivo (Streitwieser y Heathcock, 1989). Los grupos carboxílicos presentes en la porción correspondiente al ácido glutámico también presentan valores de pKa en esta zona de pH. Sin embargo, los efectos de los equilibrios ácido-base de estos grupos sobre el espectro de absorción no deberían ser tan drásticos como los observados, debido a que están lejos del sistema aromático responsable de la banda de absorción.

9.6. Conclusiones.

El equilibrio amida-fenolato fue detectado en todos los compuestos estudiados y sus correspondientes Ka fueron determinadas. El resultado obtenido para el ácido fólico (8,07) se correlacionan muy bien con el valor reportado en literatura (8,26) (sección 2.4). Para pterina, 6-formilpterina y 6-carboxipterina no se encontraron antecedentes en literatura, sin embargo, los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango esperado para este tipo de compuestos (tabla 2.3).

El valor más bajo del pKa de la 6-formilpterina (7,33), respecto al de los otros compuestos estudiados, puede explicarse por el efecto inductivo que ejerce el grupo formilo, que tiende a sacar electrones del doble anillo. En la 6-carboxipterina este efecto se ve compensado por la carga negativa del grupo carboxilo ionizado y, por ende, las diferencias en el pKa, respecto a, por ejemplo la pterina, son pequeñas.

Como era de esperar teniendo en cuenta lo expuesto en el capítulo 2, en la pterina (pKa=7,91) y 6-formilpterina se detectó un solo grupo ionizable en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 13. En la 6-carboxipterina, para la cual se analizó un rango de pH mayor, se detectó, además del equilibrio amida-fenolato (pKa=7,89), la ionización de su grupo carboxilo (pKa=3,05) y la ionización de un nitrógeno anular (pKa=1,26). El ácido fólico, por su parte, sólo presenta el equilibrio amida-fenolato en el intervalo de pH que abarca de 5 a 13 (pKa=8,07), volviéndose sensiblemente menos soluble por debajo de este rango como consecuencia de la protonación de los grupos carboxilos presentes en su cadena lateral.

Para simplificar el análisis de la información experimental obtenida en los experimentos de fotólisis es conveniente realizar los mismos en condiciones tales que exista una única forma ácido-base de la sustancia que se desea estudiar en la solución a irradiar. Del análisis de los valores de pKa obtenidos se desprenden los rangos de pH en los cuales se cumple esta condición. De esta manera, puede concluirse que, fijando el pH de la solución de trabajo en valores superiores a 10,5 más del 99% de las moléculas estarán en su forma alcalina. Por el contrario si la solución es menor que 6 más del 95% estarán en su forma ácida, a excepción de la 6-formilpterina con la cual conviene trabajar a un pH algo inferior. Respecto al límite inferior de pH al cual se puede trabajar sin la presencia significativa de otras formas ácido-base, puede decirse que por encima de 4 se tiene esta situación, excepto para la 6-carboxipterina. En este caso conviene trabajar por encima de pH 5, para evitar la presencia de moléculas con el grupo carboxilo protonado.

Por último, el análisis de los espectros de absorción de los compuestos estudiados muestra que las pterinas presentan, generalmente, dos bandas de absorción principales. Una muy intensa, con coeficientes de extinción molar entre 1×10^4 y $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ubicada entre 220 y 290 nm, y otra de intensidad menor, con coeficientes de extinción molar entre 5×10^3 y $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ que se sitúa entre 300 y 400 nm. La comparación de los espectros de cada derivado pertenecientes a ambas formas ácido-base permite realizar algunas generalizaciones. En primer lugar, cuando la forma ácida de una pterina se transforma en la alcalina se observa un corrimiento de la primera banda hacia el ultravioleta, mientras que la segunda se corre hacia el visible. Por último, las formas alcalinas presentan bandas algo más intensas que las ácidas.