

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**FOTOQUÍMICA DE ÁCIDO FÓLICO,
6-FORMILPTERINA Y
6-CARBOXIPTERINA EN SOLUCIÓN
ACUOSA**

Andrés H. Thomas

2001

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección del Dr. Alberto L. Capparelli. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

A mi abuelo Carlos

A mis padres

A Carolina y a nuestro hijo Matías

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la realización de este trabajo de Tesis, especialmente:

Al Dr. Alberto L. Capparelli, quien dirigió este trabajo de Tesis, brindándome todo su conocimiento y apoyo.

Al CONICET por las becas que me otorgó para realizar el Doctorado y a la UNLP, por el cargo de dedicación semi-exclusiva.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas y, en particular, a las del Instituto de Investigaciones Teóricas y Aplicadas (INIFTA), por haber accedido a que realizara mis actividades en esta institución.

A mi esposa Carolina, por haberme apoyado y alentado en todo momento.

A mi padre, por su constante apoyo y por sus valiosos consejos que contribuyeron a mi formación.

A mis compañeros de trabajo integrantes del primer piso del INIFTA, Sebastian, Carolina, Alberto, Mario, Laura, Chino, Gustavo, Franco, Janina, Daniel, Mónica, Carlos, Adela, Jorge, Ezequiel, Paula y Víctor, por todos los momentos compartidos y por su amistad.

A Sebastián García Einschlag por su asesoramiento en distintos temas de mi tesis, en especial, en la técnica de fotólisis de flash. Además quiero agradecerle haberme permitido usar desinteresadamente el programa desarrollado por él (Kinesim).

Al Dr. Mario Félix, co-director de mis becas, por todo el apoyo que siempre me ha dispensado.

A Franco Cabrerizo y Gustavo Suárez, por haber colaborado con entusiasmo y dedicación en la realización de numerosos experimentos de fotólisis y en las medidas espectrofotométricas y en el análisis por TLC de las soluciones irradiadas.

A las autoridades del CINDECA, particularmente, al Dr. Horacio Thomas, por haberme permitido usar el equipo de HPLC. Quiero agradecer especialmente a Raúl Martino, por su asesoramiento desinteresado, sus valiosos consejos y su colaboración en la realización de numerosos experimentos de HPLC.

A Andrés Braun y a Esther Oliveros, por haberme dado la posibilidad de realizar medidas en el Instituto Engler-Bunte de la Universidad de Karlsruhe (Alemania). Quiero agradecer especialmente a la Dra. Oliveros por haberme enseñado a realizar medidas de determinación de oxígeno singlete y por haberme ayudado en la interpretación de los resultados. Asimismo, quiero agradecer a Carolina Lorente, Claudia Martínez y a Sussanne Neuhror, por haberme ayudado en la realización de los experimentos.

A Edmondo Pramauro, por haber posibilitado el análisis de muestras con la técnica HPLC-masas en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Torino, Italia y a Claudio Baiocchi por haber realizado los experimentos.

A Gustavo Ruiz y a Ezequiel Wolcan, por haber colaborado en los experimentos de actinometría.

A Daniel Mártire, por su asesoramiento en la técnica de flujo detenido para el análisis cinético de reacciones rápidas.

A todos los integrantes del grupo de investigación dirigido por el Dr. Enrique Vassini y la Dra. Marita Mirífico del 2º piso del INIFTA, por haber facilitado desinteresadamente el uso de sus equipos e instalaciones.

ÍNDICE

PARTE I: INTRODUCCIÓN	1
1. Presentación y objetivos	3
1.1. ¿Por qué estudiar la fotoquímica del ácido fólico y pterinas?	3
1.2. Objetivos.	5
1.3. Estructura y diseño del trabajo de tesis.	6
2. Características químicas del ácido fólico y las pterinas	9
2.1. Estructura química y nomenclatura de las pterinas y el ácido fólico	9
2.2. Relación entre estructura y propiedades de las pteridinas	11
2.3. Amino-derivados.	19
2.4. Hidroxi-derivados.	21
3. Bioquímica del ácido fólico y las pterinas	25
3.1. Introducción	25
3.2. Metabolismo y función del ácido fólico	27
3.3. Fotoliasa	30
3.4. Pterinas presentes en insectos como pigmentos	33
3.5. Tetrahidrobiopterina y molibdoenzimas.	34
3.6. Pterinas como fotoreceptores	36
4. Estudios previos sobre la fotoquímica del ácido fólico y las pterinas	39
4.1. Fotoquímica del ácido fólico.	39
4.2. Fotoquímica de otros derivados pteridínicos.	42
4.3. Propiedades fotofísicas de las pterinas	46
4.4. Oxígeno singlete.	47

PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	53
5. Determinación de constantes de disociación ácida.	55
5.1. Preparación de las soluciones.	55
5.2. Procedimiento de la titulación.	56
5.3. Análisis de los resultados.	57
6. Fotólisis estacionaria.	61
6.1. Esquema general de la metodología.	61
6.2. Preparación de las soluciones a irradiar.	62
6.4. Condiciones de irradiación.	64
6.4. Determinación del rendimiento cuántico de una reacción.	66
7. Análisis de las soluciones irradiadas.	70
7.1 Consideraciones generales.	70
7.2. Espectrofotometría.	71
7.3. Cromatografía en capa delgada (TLC).	81
7.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).	85
7.5. Determinación de O ₂ .	89
7.6. Otros métodos analíticos empleados en las fotólisis estacionarias	90
8. Estudios complementarios.	94
8.1. Método de fotólisis de flash.	94
8.2. Estudios cinéticos	98
8.3. Determinación de producción de ¹ O ₂ .	100
8.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas como sistema de detección (HPLC-masas).	103
PARTE III: FOTÓLISIS DE SOLUCIONES ÁCIDAS	105
9. Equilibrios ácido-base	107
9.1. Pterina	108
9.2. 6-Formilpterina	110

9.3. 6-Carboxipterina	111
9.4. Ácido fólico	115
9.5. Ácido <i>p</i> -aminobenzoilglutámico	116
9.6. Conclusiones.	118
10. Fotólisis de ácido fólico	120
10.1 Primera etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O ₂ .	121
10.2. Segunda etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O ₂ .	129
10.3. Papel del O ₂ en la fotólisis del ácido fólico.	138
10.4. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de O ₂ .	146
10.5. Conclusiones.	148
11. Fotólisis de 6-formilpterina	154
11.1. Fotólisis de 6-formilpterina en presencia de O ₂ .	154
11.2. Papel del O ₂ en la fotólisis de la 6-formilpterina.	159
11.3. Fotólisis de 6-formilpterina en ausencia de O ₂ .	163
11.4. Estudio de fotólisis de flash.	168
11.5. Conclusiones	171
12. Fotólisis de 6-carboxipterina	174
12.1. Fotólisis de 6-carboxipterina en presencia de O ₂ .	174
12.2. Fotólisis de 6-carboxipterina en ausencia de O ₂ .	179
12.3. Fotólisis de pterina.	183
12.4. Conclusiones.	185
PARTE IV: FOTÓLISIS DE SOLUCIONES ALCALINAS	187
13. Fotólisis de ácido fólico	189
13.1. Fotólisis de ácido fólico en presencia de O ₂ .	189
13.2. Papel del O ₂ en la fotólisis del ácido fólico.	210
13.3. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de O ₂ .	214

13.4. Conclusiones.	217
14. Caracterización de dos productos de fotólisis	219
14.1 Aislamiento y estudio espectrofotométrico.	219
14.2. Estudios adicionales realizados sobre soluciones de las sustancias A y B.	225
14.3. Estudio empleando la técnica HPLC-masas.	228
14.4. Conclusiones.	231
15. Estudio cinéticos de la reacción térmica presente en soluciones irradiadas de ácido fólico.	233
15.1. Experimentos realizados con soluciones irradiadas de ácido fólico.	234
15.2. Experimentos realizados con soluciones de sustancia C extraídas de las placas de TLC.	239
16. Fotólisis de 6-formilpterina	245
16.1. Fotólisis de 6-formilpterina en presencia de O ₂ .	245
16.2. Papel del O ₂ en la fotólisis de la 6-formilpterina.	250
16.3. Fotólisis de 6-formilpterina en ausencia de O ₂ .	253
16.4. Conclusiones	257
17. Fotólisis de 6-carboxipterina y pterina	259
17.1. Fotólisis de 6-carboxipterina en presencia de O ₂ .	259
17.2. Fotólisis de 6-carboxipterina en ausencia de O ₂ .	265
17.3. Fotólisis de pterina.	266
17.4. Conclusiones.	270
CONCLUSIONES GENERALES	271
BIBLIOGRAFÍA	277

PARTE I
INTRODUCCIÓN

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.

Capítulo 2.

Características químicas del ácido fólico y las pterinas

En las décadas del 50' y del 60' numerosos grupos de investigación se abocaron a la tarea de estudiar la química de los compuestos heterocíclicos. Uno de los científicos más destacados en este campo de la química orgánica fue Adrien Albert en cuyos trabajos está basado este capítulo.

2.1. Estructura química y nomenclatura de las pterinas y el ácido fólico

Las pteridinas son una familia de compuestos heterocíclicos que tienen en común un doble anillo de diez átomos, de los cuales cuatro de ellos son átomos de nitrógeno, por lo cual pueden definirse como tetra-azo-naftalenos. En la figura 2.1 puede observarse la estructura heterocíclica común a todas las pteridinas, denominada habitualmente doble anillo pteridínico, y la numeración que reciben sus átomos. La molécula denominada pteridina propiamente dicha, mostrada también en la figura 2.1, es la forma aromática y sin sustituyentes del doble anillo.

Las pteridinas se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos. Estas “pteridinas naturales” pueden considerarse derivadas de dos moléculas: 2-amino-4-pteridinona, más conocida como pterina y 2,4-pteridindiona, llamada comúnmente lumazina. De esta manera, las pteridinas que poseen un grupo amino en la posición 2 y un oxígeno en la 4 son denominadas genéricamente pterinas y a esta estructura base se la conoce como doble anillo pterínico. Por otro lado, a las pteridinas con un oxígeno en la posición 2 y

otro en la posición 4 se las denomina genéricamente lumazinas. La estructura química de estos compuestos se muestra en la figura 2.2. Además, la mayor parte de las pterinas y lumazinas encontradas en los seres vivos presentan sustituyentes en la posición 6. También es habitual, como se verá en el capítulo siguiente, encontrar derivados en los cuales el doble anillo se encuentra parcialmente hidrogenado. En particular, son muy comunes los dihidro y tetrahidro derivados de las pterinas y las lumazinas.

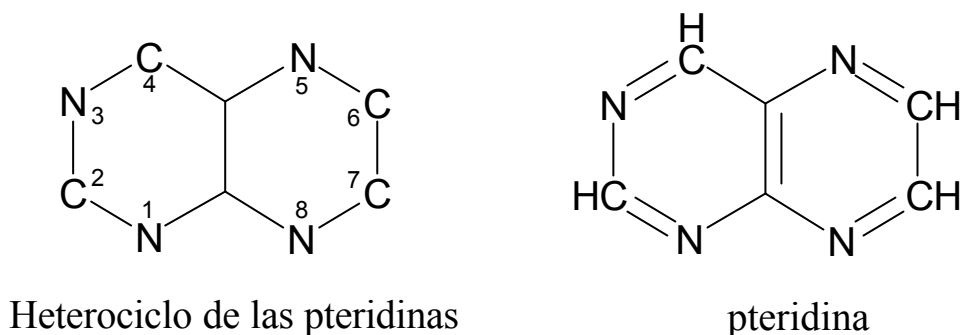


Figura 2.1. Estructura básica de las pteridinas.

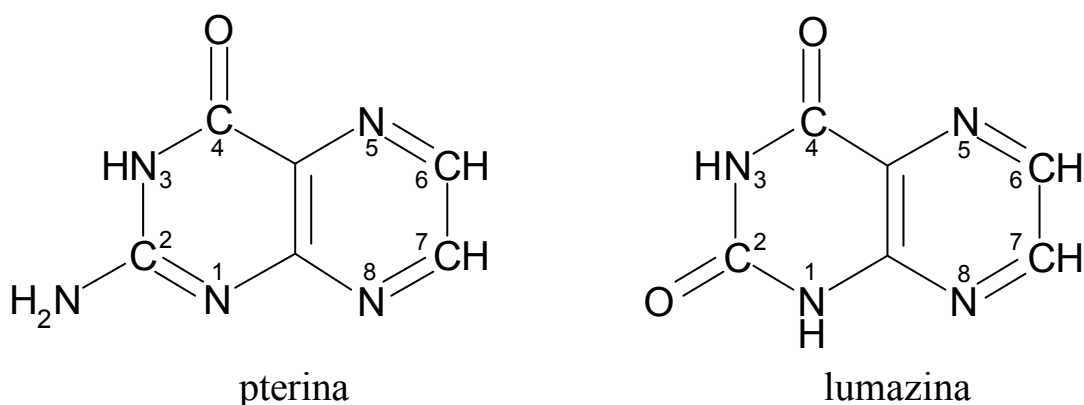


Figura 2.2. Estructura química de la pterina y la lumazina.

Según estas definiciones, el ácido fólico, cuya estructura química se muestra en la figura 2.3, puede considerarse una pterina. En efecto, este compuesto contiene un doble anillo pterínico con un sustituyente en la posición 6, el cual es mucho más grande que los que presentan el resto de las pterinas naturales. Por motivos estructurales y debido a la forma en la cual la molécula de ácido fólico se sintetiza *in vivo*, en este sustituyente pueden reconocerse dos porciones. Una de ellas es una molécula de ácido *p*-aminobenzoico, la otra es una molécula de ácido glutámico, un aminoácido natural. Estas dos porciones están unidas entre sí por una unión peptídica (función amida), en la cual la primera aporta el carboxilo y la segunda

la amina. El ácido *p*-aminobenzoico, por su parte, está ligado al doble anillo pterínico mediante un puente metilénico unido a su grupo amino.

Debido a este sustituyente, el ácido fólico y sus derivados presentan ciertas características fisicoquímicas que lo hacen diferenciarse del resto de las pterinas. Además, *in vivo*, participa en reacciones del metabolismo muy distintas a las de las demás pterinas. Posiblemente, a causa de estas diferencias, es más habitual que se haga referencia a las pterinas sin incluir al ácido fólico. Es decir, normalmente, el término “pterinas” abarca a todos los compuestos que contienen el doble anillo pterínico, menos al ácido fólico. Este será el sentido con el cual se empleará este término en este trabajo de tesis.

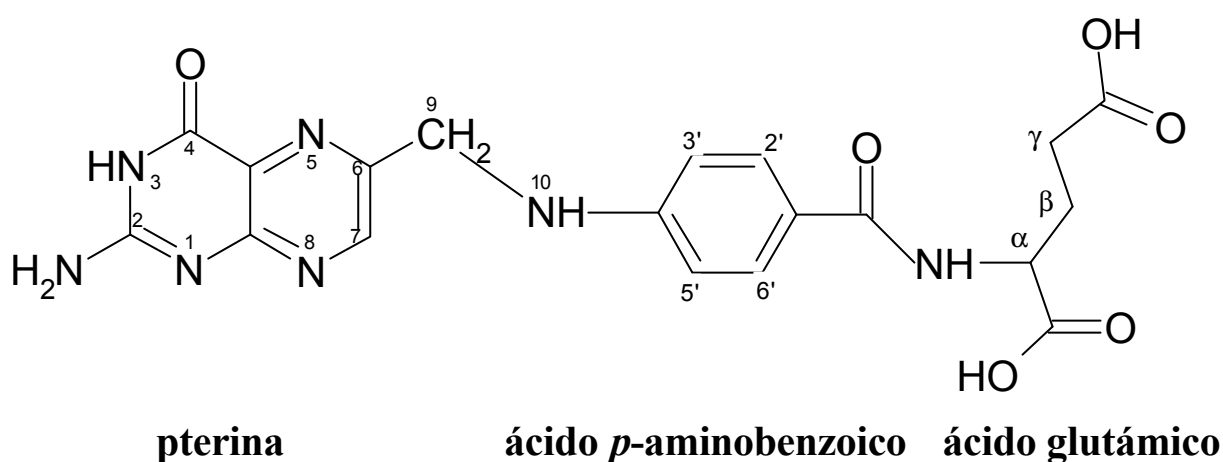


Figura 2.3. Estructura química del ácido fólico.

2.2. Relación entre estructura y propiedades de las pteridinas

Los compuestos heteroaromáticos nitrogenados pueden ser divididos en dos grandes grupos: los que contienen un sistema deficiente en electrones π y los que contienen un sistema con exceso de electrones π . Un ejemplo típico del primer grupo es la piridina, en la cual, el átomo de nitrógeno presente en el anillo atrae hacia sí electrones del sistema de orbitales π . Por otro lado, un ejemplo típico del segundo grupo es el pirrol, en el cual el átomo de nitrógeno cede electrones al sistema π . Las mismas consideraciones pueden hacerse para compuestos heteroaromáticos de dos anillos (o doble anillo). Entre los pertenecientes al primer grupo se encuentran la quinolina y la isoquinolina. La pteridina, como puede desprenderse de un rápido análisis de su estructura química, también pertenece a este grupo.

El indol, por su parte, es un integrante del segundo grupo. En la figura 2.4 se muestran las estructuras de todos estos compuestos y se detallan las densidades electrónicas de los átomos de los diferentes anillos (Albert, 1968), con lo cual puede apreciarse el efecto contrario que produce el nitrógeno en ambos grupos de compuestos.

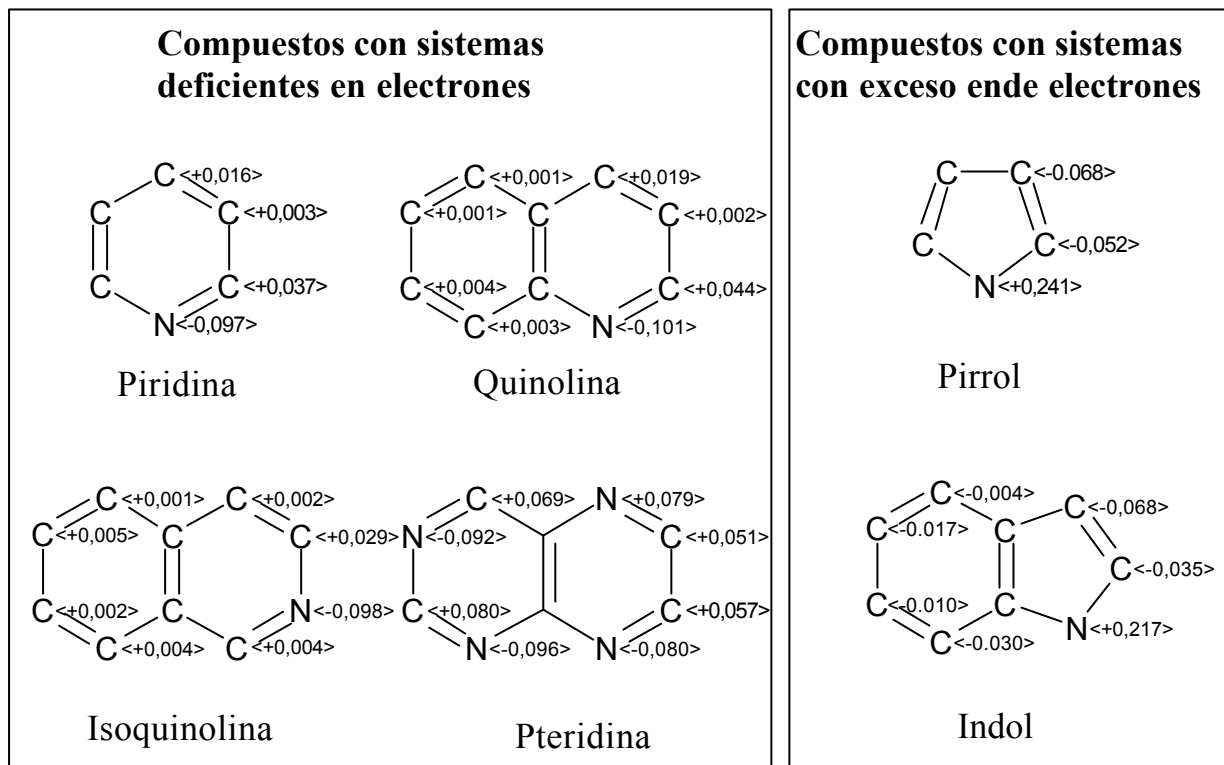


Figura 2.4. Ejemplos de compuestos heteroaromáticos nitrogenados y densidades electrónicas asociadas a cada átomo calculadas con el método VESCF (Brown y Coller, 1967).

La particular distribución electrónica le confiere a los compuestos heteroaromáticos deficientes en electrones π ciertas propiedades químicas especiales. Por ejemplo, a causa de las bajas densidades electrónicas de los átomos de carbono, estos compuestos son más susceptibles a las sustituciones por agentes nucleofílicos y menos susceptibles a las sustituciones por agentes electrofílicos, que sus análogos homoaromáticos. Por otro lado, debido a que la gran estabilidad de los compuestos aromáticos proviene de los electrones π , los compuestos heteroaromáticos deficientes en ellos son menos estables que sus análogos homoaromáticos. Por ejemplo, la piridina es menos estable que el benceno. Este efecto se ve reflejado en los valores de las energías de resonancia (Tjebbes, 1962; Klages, 1949). A continuación se expondrán brevemente otras propiedades químicas particulares de este grupo de compuestos.

2.2.1. Solubilidad.

El par de electrones libres de los átomos de nitrógeno de los compuestos heteroaromáticos deficientes en electrones π forma puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. A causa de esta propiedad, estos compuestos son mucho más solubles en este solvente que los correspondientes compuestos hidrocarbonados. En efecto, mientras el benceno tiene una solubilidad en agua extremadamente baja, la piridina es completamente miscible.

La incorporación al anillo de estos heterociclos de sustituyentes que poseen átomos de hidrógeno capaces de formar puentes de hidrógeno provoca un significativo descenso en la solubilidad. Este efecto es completamente contrario a lo observado para la mayor parte de las sustancias aromáticas o alifáticas. De esta manera, mientras la incorporación de un grupo hidroxilo o amino aumenta la solubilidad de los compuestos hidrocarbonados, disminuye la de los heterociclos deficientes en electrones π . La explicación más aceptada para este fenómeno es que los puentes de hidrógeno intermoleculares desde los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilos o desde los átomos de nitrógeno de los grupos amino hacia los nitrógenos del anillo son muy fuertes. Esto provoca la unión de las moléculas entre sí y evita la formación de puentes de hidrógeno con el agua.

Este efecto es muy marcado para los derivados pteridínicos, para los cuales la presencia de un solo grupo hidroxilo en su estructura provoca un descenso en la solubilidad en agua de más de un orden de magnitud. En la tabla 2.1 puede apreciarse la influencia del número y posición de sustituyentes hidroxilos sobre la solubilidad.

COMPUESTO	20°C (1 parte en)	100°C (1 parte en)	COMPUESTO	20°C (1 parte en)	100°C (1 parte en)
Pteridina	7	1	4,6-dihidroxi-	5000	300
2-hidroxi-	600	50	6,7-dihidroxi-	3000	290
4-hidroxi-	200	29	2,4,7-trihidroxi-	12.000	1.400
7-hidroxi-	900	76	4,6,7-trihidroxi-	27.000	7.000
2,4-dihidroxi-	800	120	2,4,6,7-tetrahidroxi-	58.000	---

Tabla 2.1. Solubilidad de distintos derivados pteridínicos. Los valores están expresados en partes en peso del correspondiente compuesto en partes de H₂O.

2.2.2. Basicidad.

Los átomos de nitrógeno de los compuestos heterocíclicos deficientes en electrones π le confieren a estas moléculas un carácter básico mucho más débil que el de las aminas alifáticas, tanto cíclicas como acíclicas. Por ejemplo, como puede observarse en la tabla 2.2, la piridina es una base mucho más débil que la piperidina, mostrada en la figura 2.5, la metilamina o la etilamina. Esta diferencia se debe a la participación de dos electrones del átomo de nitrógeno en el sistema de orbitales π . Por consiguiente, el par de electrones libres ocupa un orbital híbrido sp^2 . Este mayor carácter s de este orbital conduce a una menor fuerza básica comparada con la de átomos en los cuales el par de electrones libres ocupa un orbital sp^3 .

Como muestra la tabla 2.2, los compuestos con dos átomos de nitrógeno en un mismo anillo son bases aún más débiles. La pirimidina y la pirazina, cuya estructura puede apreciarse en la figura 2.5, son claros ejemplos de esto. La quinoxalina, también mostrada en la figura 2.5, es un compuesto con dos anillos fusionados que contiene dos átomos de nitrógeno en uno de ellos. Esta sustancia es una base extremadamente débil. Reportes de la basicidad de derivados pteridínicos muestran que, como es de esperar teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, estos compuestos son también bases extremadamente débiles (Albert, 1953). Los pKa correspondientes se muestran en la tabla 2.2.

COMPUESTO	pKa	COMPUESTO	pKa
Piperidina	11,1	Pirazina	0,7
Metilamina	10,6	Quinoxalina	0,6
Etilamina	10,7	Quinolina	4,9
Piridina	5,5	Isoquinolina	5,4
Pirimidina	1,3		

Tabla 2.2. Basicidad de compuestos nitrogenados en agua a 20-25 °C. Ka es la constante de disociación del catión (ácido conjugado de la base). Cuanto mayor es pKa más básico es el compuesto.

2.2.3. Espectro de absorción.

En general, el reemplazo de $-CH=$ por $-N=$ en un anillo aromático cambia muy poco el espectro ultravioleta. Sin embargo, normalmente, se pierde algo de la estructura fina de las

bandas de absorción. Otro efecto que se observa habitualmente es un aumento en el coeficiente de extinción molar en el borde del espectro. Por otro lado, la transformación de los compuestos heterocíclicos deficientes en electrones π a sus correspondientes formas catiónicas no conduce a cambios espectrales importantes.

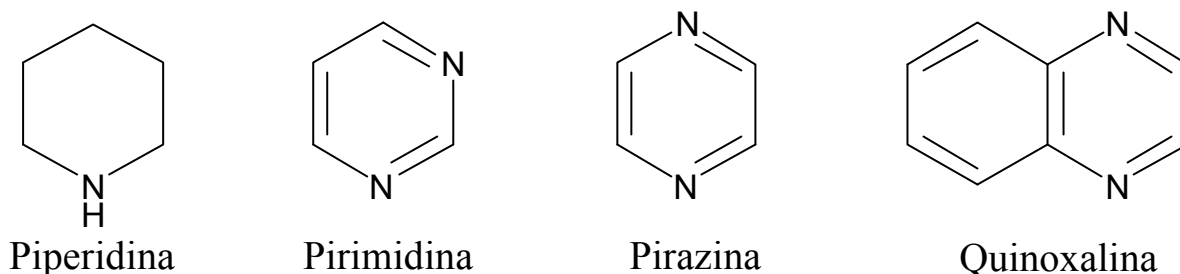


Figura 2.5. Estructura química de compuestos mencionados en la sección 2.2.2.

2.2.4. Hidratación covalente.

Los compuestos heteroaromáticos con una alta proporción de átomos de nitrógeno, es decir, los más deficientes en electrones π , pueden sufrir hidratación covalente. Este fenómeno, que fue observado por primera vez en 1952 (Albert et al., 1952) e interpretado unos años más tarde (Albert, 1955; Brown y Mason, 1956), consiste en la adición de una molécula de agua a un doble enlace. Uno de los dos átomos del mismo debe ser un átomo de carbono y, en él se adiciona un grupo hidroxilo.

La 6-pteridinona es el compuesto pteridínico en el cual, por primera vez, se detectó este tipo de reacción. En la figura 2.6 puede observarse el equilibrio que se establece en agua entre las formas anhidra e hidratada. Cuando se titula este compuesto en agua con una base y rápidamente se vuelve a titular con un ácido se observa histéresis, pudiéndose determinar dos pKa distintos correspondientes a cada una de las dos formas.

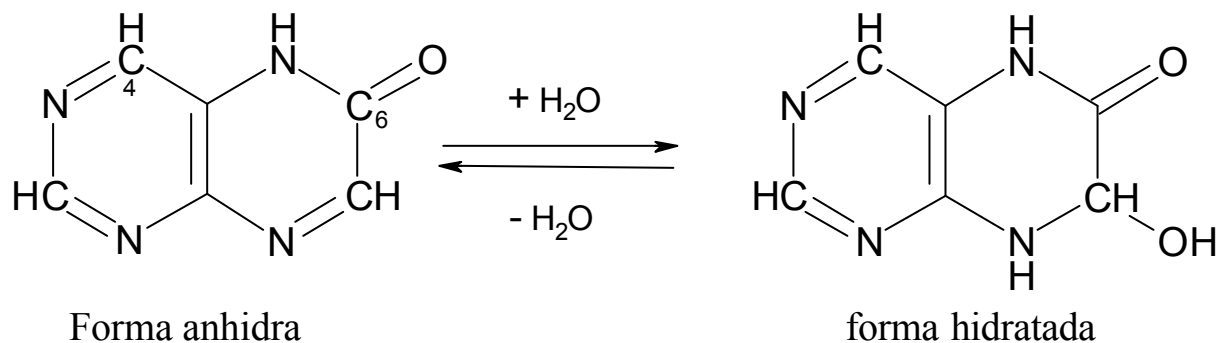


Figura 2.6. Forma neutra de la 6-pteridinona en agua. Equilibrio entre la forma anhidra y la forma hidratada.

La molécula de pteridina no sustituida también sufre hidratación covalente. La forma neutra se hidrata un 22% (Perrin, 1962; Inoue y Perrin, 1963, a). Como puede observarse en la figura 2.7, el grupo hidroxilo se une al carbono 4. El catión, por su parte, se encuentra casi completamente hidratado. Se observó que, en este caso, ocurre primero el ataque de una molécula de agua al enlace entre los carbonos 3 y 4 (figura 2.7). Sin embargo, con el tiempo ocurre una transformación al correspondiente análogo 5,6,7,8-dihidratado (Albert et al., 1966). También fue detectado un anión hidratado (Albert et al, 1956) (figura 2.7).

Además, se detectaron reacciones de hidratación covalente en otros derivados. La 2-pteridinona, por ejemplo, se hidrata en el enlace 3,4 y sólo la especie neutra sufre esta reacción (Albert y Howell, 1962; Inoue y Perrin, 1963, b). La 2-aminopteridina, por su parte, aunque también se hidrata en el mismo enlace, sólo lo hace en su forma catiónica (Albert et al, 1962). Por último, la 2,6-pteridindiona se hidrata en el enlace 3,4 y luego se isomeriza al análogo hidratado en el enlace 7,8, el cual es termodinámicamente más estable (Albert et al., 1963).

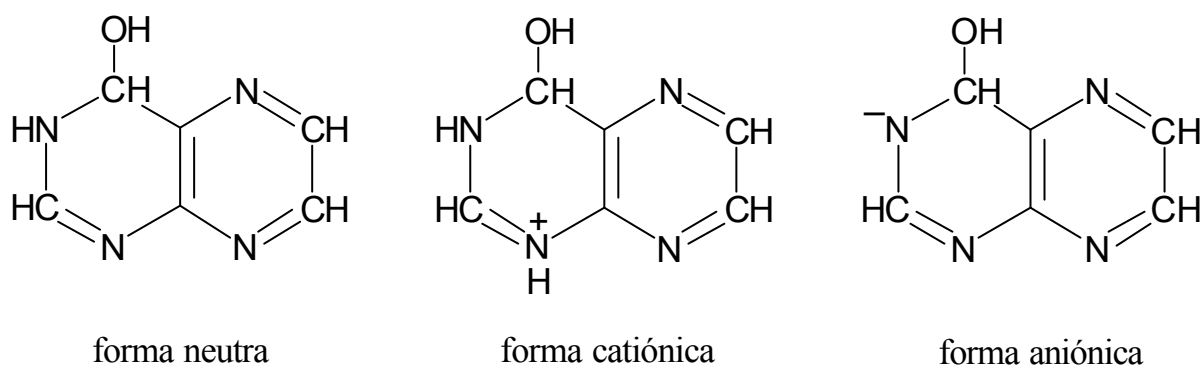


Figura 2.7. Especies hidratadas de la pteridina.

La hidratación covalente está presente sólo en algunos derivados pteridínicos. Más aún, aquellos compuestos que sufren esta reacción lo hacen en distinta proporción dependiendo de la forma ácido-base presente en solución. Los estudios realizados sobre este tema con pteridinas y con otras familias de compuestos heteroaromáticos han permitido explicar esta disparidad de comportamiento.

En primer lugar, puede mencionarse que la presencia de dos átomos de nitrógeno en un mismo anillo, especialmente si ellos están ubicados entre sí en posición 1,3, provoca un empobrecimiento tan importante del sistema de electrones π que la estabilización aromática prácticamente no está presente. Esta situación se agudiza cuando existe, unido al mismo anillo

algún sustituyente electrofílico tal como el grupo nitro o átomos de oxígeno (ceto). El resultado de configuraciones como estas es la existencia de dobles enlaces aislados y fuertemente polarizados que pueden ser atacados fácilmente por agentes nucleofílicos. En efecto, tales sustancias pueden reaccionar en el doble enlace 3,4 de la 2-pteridinona (Albert y Howell, 1962) o en el doble enlace 7,8 de la 6-pteridinona (Albert y Reich, 1961).

Sin embargo, el agua es un agente nucleofílico muy débil; por lo cual, para que exista una hidratación covalente significativa, además de las condiciones mencionadas en el párrafo anterior, el producto debe ser estabilizado por resonancia. Existen varios tipos de resonancia capaces de lograr esto (Albert, 1968), las cuales se detallan brevemente a continuación. Además, en la figura 2.8 se muestran ejemplos típicos.

a) Tipo amidina. Estabiliza formas hidratadas catiónicas y aniónicas en las cuales la carga es compartida por dos átomos de nitrógeno del anillo ubicados en posición 1,3. Este tipo de resonancia aparece, por ejemplo, en el catión de la pteridina.

b) Tipo guanidina. Está presente en compuestos que contienen un grupo amino unido a un átomo de carbono vecino a un nitrógeno del anillo. Es muy parecida a la anterior, estabilizando las formas hidratadas catiónicas y aniónicas. Como ejemplo típico puede mencionarse la 2-aminopteridina.

c) Tipo urea. Estabiliza la forma neutra. Se produce cuando un grupo ceto se ubica entre dos nitrógenos del anillo. La 2-pteridinona presenta este tipo de resonancia.

d) Tipo 4-aminopiridina. Es, en realidad, otra variante de la resonancia tipo amidina. Estabiliza principalmente formas catiónicas, en las cuales la carga es compartida también por dos átomos de nitrógeno del anillo, pero que no están en posición 1,3. La forma catiónica hidratada de la 6-pteridinona es estabilizada de esta manera.

Las pterinas (2-amino-4-pteridinonas) presentan una estructura tal que imposibilita el proceso de hidratación covalente. El anillo donde los átomos de nitrógeno están en posición 1,3 (anillo pirimidínico) no puede ser atacado por las moléculas de agua porque los dos átomos de carbono que podrían ligar el grupo hidroxilo se encuentran ocupados con sustituyentes. Por su parte, el anillo con nitrógenos en posición 1,4 posee sólo un átomo de carbono capaz de participar en el proceso de hidratación, el C-7; ya que el C-6 se encuentra unido a una cadena lateral. Es decir, que la única posibilidad de ataque nucleofílico es a través del enlace 7,8. Sin embargo, la forma neutra de la molécula hidratada no podría ser estabilizada por resonancia tipo urea. Solamente podría estabilizarse la forma catiónica

mediante una resonancia tipo aminopiridina. No existen en literatura trabajos que reporten este tipo de reacciones en derivados pterínicos.

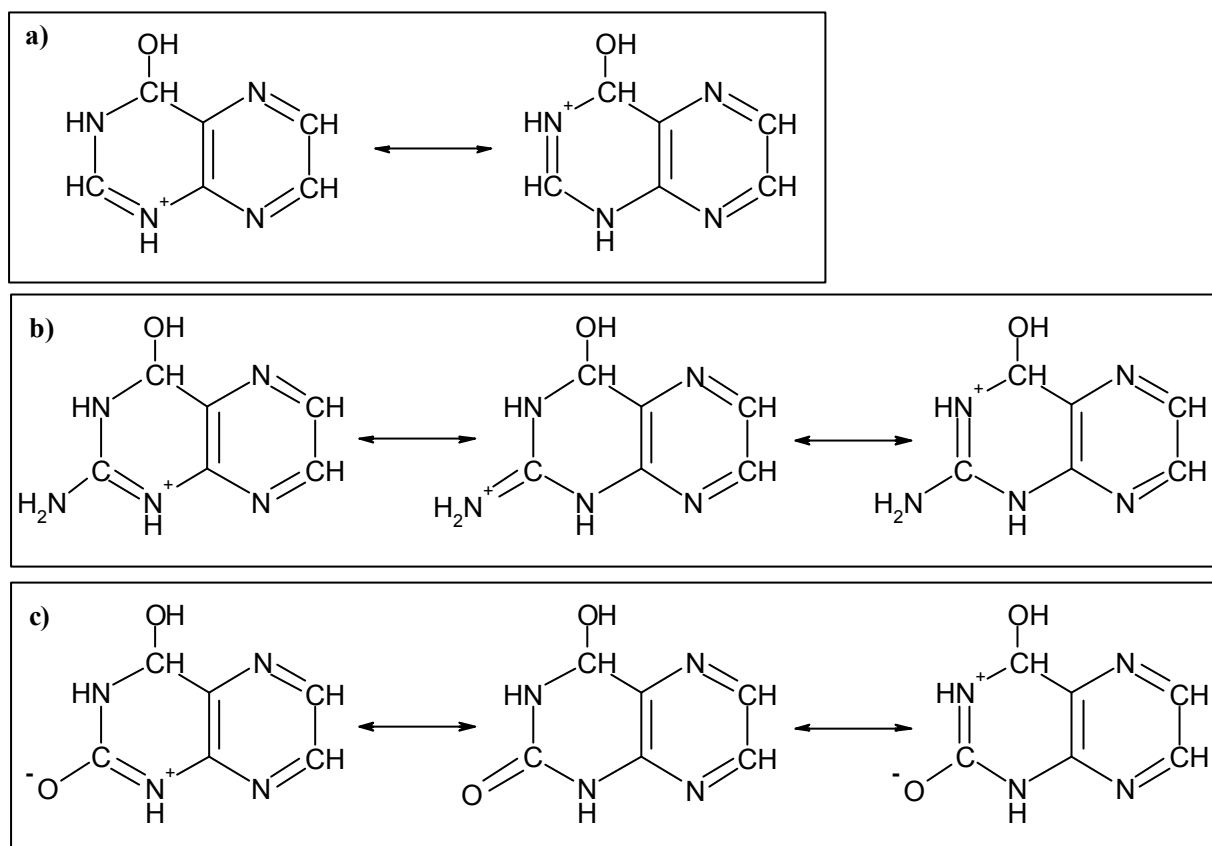


Figura 2.8. Ejemplos de especies hidratadas estabilizadas por resonancia. a) Resonancia tipo amidina en el catión de la pteridina. b) Resonancia tipo guanidina en el catión de la 2-aminopteridina. c) Resonancia tipo urea en la forma neutra de la 2-pteridinona.

A pesar de todas las consideraciones expuestas hasta aquí, se tuvieron en cuenta ciertos criterios antes de decidir descartar la hidratación covalente en los compuestos involucrados en el presente trabajo de tesis. Por ejemplo, la ausencia de histéresis en la titulación sugiere la ausencia de hidratación. Sin embargo, esto sólo no alcanza como evidencia para asegurarlo, debido a que la misma, en algunos casos, puede ser tan rápida que no logra detectarse. Por otro lado, la ausencia de anomalías espectrales y anomalías en los valores de las constantes de ionización dentro de una serie de compuestos relacionados, sugiere fuertemente la ausencia de hidratación significativa. Ninguno de estos factores fue detectado con las sustancias analizadas.

2.3. Amino-derivados.

En esta sección se expondrán brevemente ciertas características de compuestos heteroaromáticos que presentan un grupo amino ($-NH_2$) unido a un átomo de carbono del anillo. Asimismo todos los resultados que se comentarán corresponden a experimentos realizados en solución acuosa.

En los α - y γ -aminoderivados (grupo amino y nitrógeno anular en posición *orto* y *para*, respectivamente), que es la configuración de las pterinas, existen dos posibles tautómeros: el amino-tautómero y el imino-tautómero, ambos mostrados en la figura 2.9, para la 2-aminopiridina. Se realizaron estudios espectrales sobre soluciones de diversos amino-derivados y de los correspondientes N-metil-derivados de ambas formas tautoméricas, los cuales tiene bloqueado el equilibrio tautomérico presentando sólo uno de los dos posibles tautómeros. Los resultados encontrados para 2- y 4-aminopiridina (Andreson y Seeger, 1949), 2- y 4-aminopirimidina (Brown et al., 1955b) y para algunas aminopteridinas (Albert, 1952) muestran que el amino-tautómero es la estructura predominante en este grupo de derivados. Estudios de espectroscopía infrarroja realizados sobre distintos compuestos heteroaromáticos en soluciones no acuosas y sobre muestras sólidas aportaron evidencia adicional a favor de esta hipótesis. Entre otros, fueron estudiados mediante esta técnica, los 2- y 4-amino-derivados de la piridina y la quinolina (Goulden, 1952; Angyal y Werner, 1952), la 9-aminoacridina (Short, 1952) y 2- y 4-aminopirimidina (Brown et al., 1955). Por último, un método que se basa en la comparación de las constantes de ionización de la sustancia problema y del correspondiente derivado que contiene el nitrógeno anular metilado permitió establecer la relación entre ambos tautómeros (amino:imino). Mediante este método se obtuvieron dichas relaciones para: 4-aminopiridina (2.000:1), 4-aminoquinolina (2.000:1) y aminopirimidina (200.000:1) (Angyal y Angyal, 1952); 9-aminoacridina (10:1) (Mason, 1959) y 6-aminofenantridina (600:1) (Reese, 1958). A pesar de no haber sido hallados en literatura trabajos de este tipo realizados con derivados pterínicos, teniendo en cuenta la evidencia presentada puede inferirse que en las pterinas también predominan los correspondientes amino-tautómeros.

La determinación del momento dipolar y el análisis de las constantes de ionización de isómeros de posición demostraron que el amino tautómero presenta dos estructuras resonantes. En la figura 2.10 pueden apreciarse dichas estructuras resonantes, tanto para la

forma neutra como para la catiónica de la 2-aminopiridina.

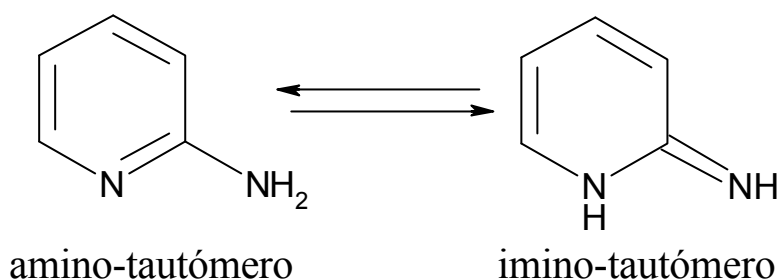


Figura 2.9. Tautómeros de la 2-aminopiridina.

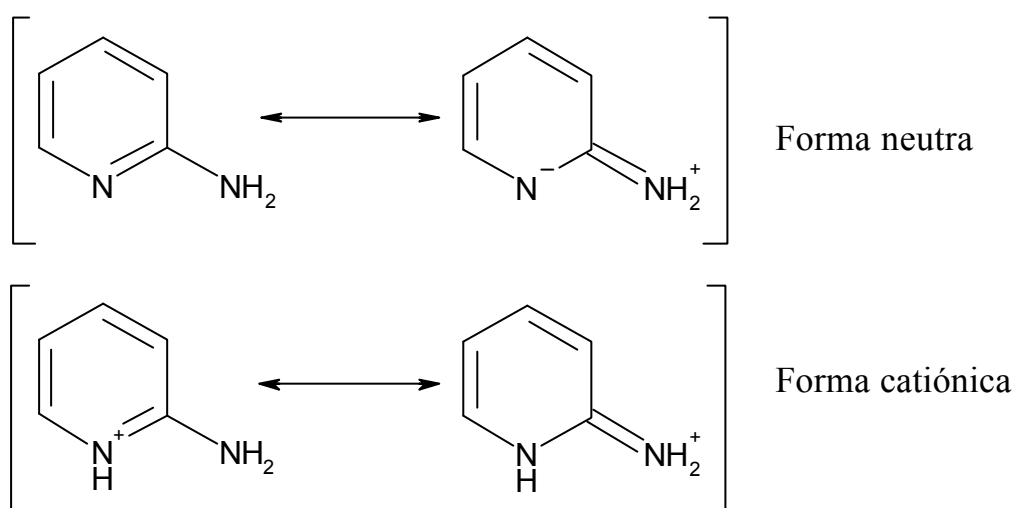


Figura 2.10. Estructuras resonantes de las formas neutra y catiónica de la 2-aminopiridina.

El grupo amino es casi invariablemente menos básico que los átomos de nitrógeno de los anillos. Por ejemplo, la 3-aminopiridina posee un primer pKa de 6,0 que corresponde al nitrógeno anular, y otro de -1,5 perteneciente al grupo amino. La magnitud de la repulsión coulombica generada entre ambos grupos cargados positivamente, naturalmente, decrece con la distancia; por lo cual, la diferencia entre los valores de ambos pKa (el del grupo amino y el del nitrógeno anular) es mucho menor en un compuesto como la 6-aminoquinolina.

El grupo amino aporta electrones al sistema π , lo que genera un aumento en la basicidad de los nitrógenos anulares. Este incremento, que usualmente no supera una unidad de pKa, depende mucho de la posición de ambos átomos de nitrógeno. Ciertas disposiciones, como la presente en los γ -amino-derivados (grupo amino y nitrógeno anular en posición *para*), permiten una mayor estabilización por resonancia en el catión que en la forma neutra.

En estos casos, el aumento de la basicidad es muy importante. Por ejemplo, la 4-aminopiridina posee un pKa que es cuatro unidades superior al de la piridina (pKa = 5,5).

En los -aminoderivados este efecto es menos marcado. Así, la 2-aminopiridina presenta un pKa de sólo 6,9. La menor separación de las cargas en la forma neutra aumenta la estabilización por resonancia respecto a la forma catiónica y, debido a eso, el aumento de la fuerza básica es menor que para los 4-aminoderivados.

2.4. Hidroxi-derivados.

Cuando un grupo hidroxilo (-OH) es insertado en un núcleo heteroaromático deficiente en electrones π , la sustancia resultante puede tener propiedades de fenol, de zwitterión o de amida cíclica. Esto depende principalmente de la posición que ocupe el grupo hidroxilo en el anillo respecto al átomo de nitrógeno anular. En esta sección se hará referencia sólo a los α y γ -hidroxi-derivados, ya que en esta categoría están incluidas las pterinas. Además todos los resultados que se presentarán corresponden a estudios realizados en medio acuoso.

Los productos de hidrólisis de compuestos tales como 2- y 4- metoxi-, cloro-, acetoxi- y amino-piridina, descubiertos en 1883, fueron llamados inicialmente 2- y 4-hidroxipiridina. Sin embargo, actualmente se sabe que la estructura real de estos compuestos corresponde a su amida-tautómero. Debido a esto son llamados, más correctamente, 2- y 4-piridinona. Ambos tautómeros pueden apreciarse en la figura 2.11. Es por ello que para la pterina es más aceptado el nombre de 2-amino-4-pteridinona que el de 2-amino-4-hidroxipteridina; no obstante ambas nomenclaturas pueden encontrarse en literatura.

Dicha preponderancia del amida-tautómero respecto al hidroxio-tautómero pudo ser demostrada para muchos compuestos mediante el ya mencionado método del análisis de las constantes de ionización (Albert y Phillips, 1956; Brown et al., 1955a; Albert y Brown, 1954; Barlin, 1965). En este tema existe, incluso, un trabajo realizado con derivados pteridínicos en el cual se informa que este grupo de heterociclos existen principalmente en su forma amida (Albert, 1952). Estudios realizados sobre los espectros de absorción ultravioleta de hidroxi-derivados y sus correspondientes N-metil-derivados aportaron evidencia adicional sobre la preponderancia del amida-tautómero (Ley y Specker, 1939; Specker y Gawrosch, 1942; Tucker e Irvin, 1951; Acheson et al., 1954; Brown et al., 1955a; Marshall y Walker, 1951;

Hearn et al., 1951). Por último, diversos estudios de espectroscopía infrarroja arrojaron el mismo tipo de resultados (Witkop et al., 1951; Mason, 1955; Brown et al., 1955a; Mason, 1957; Albert y Spinner, 1960).

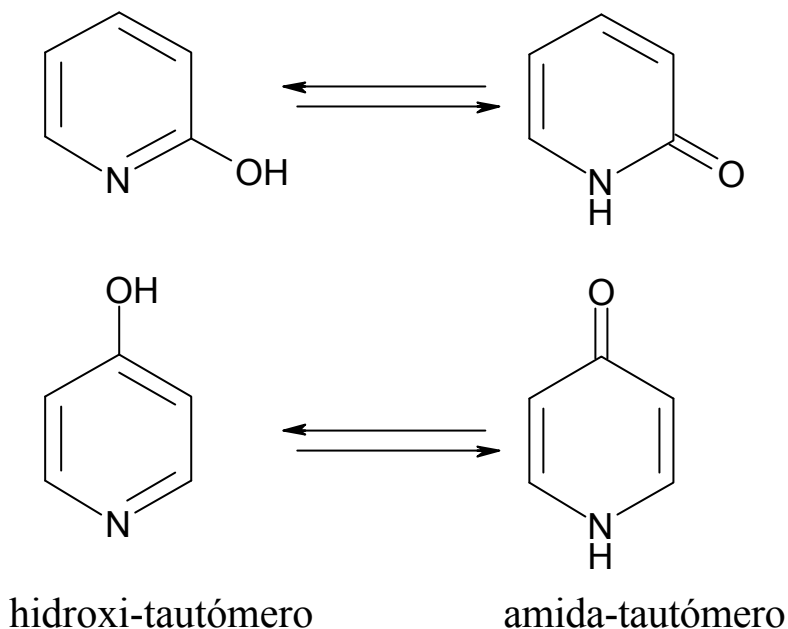


Figura 2.11. Tautómeros de la 2-piridinona y 4-piridinona.

Las pterinas poseen el grupo hidroxilo en un anillo con dos átomos de nitrógeno. Para uno de ellos el sustituyente está en posición α y para el otro en posición γ . Por lo tanto, existen dos posibles amida-tautómeros que se muestran en la figura 2.12. Estudios realizados sobre compuestos con estructuras análogas, tal como 4-hidroxipirimidina (Brown et al., 1955a) y 4-hidroxiquinazolina (Albert y Barlin, 1962), muestran que el tautómero preponderante es el que posee el átomo de hidrógeno en el nitrógeno más cercano al oxígeno.

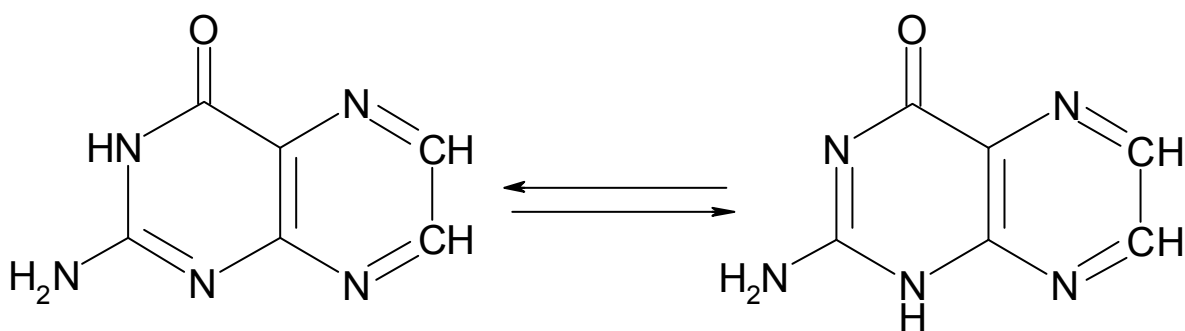


Figura 2.12. Posible amida-tautómeros de la pterina.

Diversos trabajos realizados sobre varios compuestos heterocíclicos mostraron que, en

realidad, el tautómero predominante no presenta una estructura de amida pura. Por el contrario, puede interpretarse como una contribución de dos híbridos de resonancia. Uno de ellos es la amida y el otro es el correspondiente zwitterión (Arndt, 1930; Elvidge y Jackman, 1961; Albert y Spinner, 1960; Penfold, 1953). Estos estudios revelan, además, que la estructura predominante es la de la amida, sin embargo, el otro híbrido (zwitterión) no puede despreciarse. En la figura 2.13 se muestran los híbridos correspondientes a la molécula de pterina.

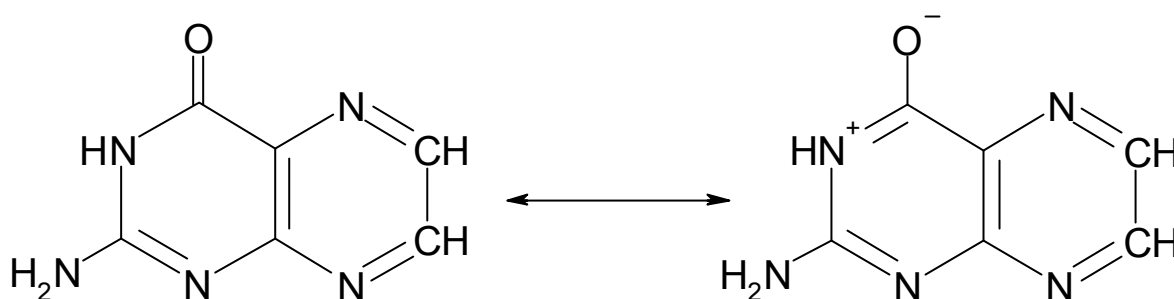


Figura 2.13. Híbridos de resonancia en el amida-tautómeros de la pterina.

Los aniones de los hidroxí-derivados pueden presentar dos híbridos de resonancia que corresponden a sendos híbridos de la forma neutra. Estas estructuras son mostradas en la figura 2.14 para la 2-piridinona. Sin embargo, evidentemente el híbrido que posee su carga negativa sobre el átomo de nitrógeno debe contribuir muy poco ya que la misma tiene preferencia por el oxígeno que es más electronegativo. Diversas publicaciones sobre este punto muestran que, en efecto, la proporción de dicho híbrido es despreciable y que estos aniones presentan, esencialmente, estructura aromática (Spinner, 1960; Spinner y White, 1966).

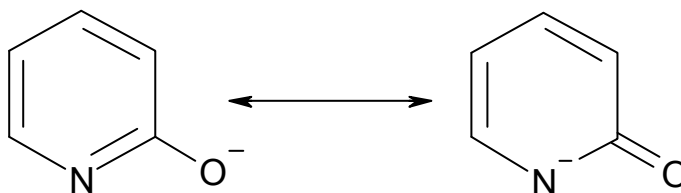


Figura 2.14. Estructuras resonantes de la forma aniónica de la 2-piridinona.

Con respecto a la acidez de estos grupos, existen en literatura algunas publicaciones que reportan constantes de ionización para derivados pteridínicos (Albert, 1953; Albert et al., 1951; Albert y Brown, 1953; Albert y Wood, 1952). Los correspondientes valores de pKa han

sido listados en la tabla 2.3, en la cual también se muestran valores de pKa pertenecientes a la ionización de los nitrógenos anulares.

De la información consignada en esta tabla puede evaluarse el comportamiento ácido-base general de las pterinas. Típicamente en el rango de pH comprendido entre 2 y 6 prevalece la forma neutra de la molécula. Por debajo de estos valores el nitrógeno anular más básico comienzan a ionizarse apareciendo las formas catiónicas. A medida que el pH disminuye y se protonan otros nitrógenos entre los cuales puede incluirse el correspondiente al grupo 2-amino de las pterinas, pueden aparecer formas catiónicas con carga +2 y +3. En el intervalo de pH que va aproximadamente de 6 a 9, el grupo amida se encuentra en equilibrio con su forma aniónica (fenolato) y el doble anillo adquiere carga negativa. Por encima de 9 está presente casi exclusivamente la forma aniónica.

Está claro que este comportamiento general se verá afectado por la presencia de sustituyentes adicionales en el doble anillo pteridínico, los cuales podrán alterar los valores de pKa y la carga neta de la molécula. En el caso del ácido fólico, por ejemplo, los dos grupos carboxílicos presentes en su sustituyente de la posición 6 le confieren a la molécula dos cargas negativas adicionales cuando el pH es mayor a las constantes de ionización de dichos grupos.

COMPUESTO	pKa (amida)	pKa (nitrógeno anular)
4-Pteridinona	7,89	<1,3
2,4-Pteridindiona	7,92 - >12	<1,3
4,6-Pteridindiona	6,08 – 9,73*	<2
4,7-Pteridindiona	6,08 – 9,62*	<2
2-Amino-4,6-Pteridindiona (Xantopterina)	6,3 – 9,23*	1,6
6-Anilinometil-4-pteridinona	7,92	<3
Ácido fólico	8,26	--

Tabla 2.3. pKa correspondientes a constantes de ionización de grupos amida (ácidos) y nitrógenos anulares (básicos) de derivados pteridínicos. * Función 4-ceto.

Capítulo 3.

Bioquímica del ácido fólico y las pterinas

3.1. Introducción

Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se remontan a las investigaciones llevadas a cabo, a fines del siglo XIX, por Frederick Gowland Hopkins quien intentó aislar el pigmento amarillo de una mariposa denominada "brimstone" (azufre) (Hopkins, 1889a, 1889b) y uno blanco de la mariposa de la col (Hopkins, 1895). No pudo, sin embargo, obtenerlos con la suficiente pureza como para realizar ulteriores estudios que le permitieran dilucidar su estructura. Estos pigmentos fueron denominados muchos años más tarde xantopterina y leucopterina, respectivamente, por Clemens Schöpf (Wieland y Schöpf, 1925; Schöpf y Wieland, 1926). Finalmente fue Robert Purman quien dilucidó la estructura de estas sustancias (Purmann, 1940a, 1940b, 1941), proponiendo que eran derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina, al que finalmente se le dio el nombre de pteridina (Schöpf et al., 1941).

Actualmente se conoce una gran cantidad de pteridinas naturales que pueden ser incluidas dentro de dos familias de compuestos: las pterinas y las lumazinas. Las diferencias químicas entre ambos grupos de compuestos fueron mencionadas en el capítulo anterior, y, en el presente, sólo nos referiremos al primero. Las pterinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Están presentes en prácticamente todos los seres vivos, pero, en general, en muy pequeñas cantidades. Estas moléculas desempeñan funciones muy diversas en los organismos vivos, participando en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia (Nichol et al., 1985).

El tetrahidrofolato, un derivado reducido del ácido fólico, y la tetrahidrobipterina son los integrantes de esta familia de compuestos que más han sido estudiados en relación con su

participación en reacciones químicas presentes en los seres vivos. Ambos están involucrados en reacciones metabólicas indispensables para los mamíferos; tal es así que su deficiencia produce serias alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de graves enfermedades (Rapaport, 1988). La mencionada presencia como pigmentos en las alas de ciertos insectos es otra de las funciones conocidas y bien estudiadas. Sin embargo, existen otros compuestos que cumplen otras funciones menos conocidas.

También se sabe, actualmente, que algunos derivados de este grupo participan en ciertos procesos biológicos desencadenados por la luz; es decir, que están involucrados en reacciones fotoquímicas que ocurren *in vivo*. La mayoría de estos procesos aún no se conocen en profundidad y, en muchos casos, el papel del derivado pteridínico no está del todo aclarado. Más aún, existen algunos ejemplos en los cuales la participación de los mismos está propuesta, pero no ha sido probada todavía.

Algunos miembros de este grupo, por ejemplo, han sido encontrados en órganos fotosensibles como los ojos (Christomanos, 1967). Ha sido propuesto, por su parte, que ciertos derivados pteridínicos podrían participar en algunas etapas de la fotosíntesis (Fuller et al., 1971) y que otros pueden actuar como antenas para la luz azul en las plantas superiores (Maier y Ninnemann, 1995) y otros organismos tales como el hongo *Phycomyces blakesleeanus* (Hohl et al., 1992).

También se ha detectado la presencia de estas moléculas en la piel de vertebrados inferiores (Viscontini y Stierlin, 1962) y en el tegumento de artrópodos (Merlini y Nasini, 1966). Más recientemente se ha demostrado la presencia de biopterina en la piel de seres humanos así como también su acumulación en pacientes con trastornos de depigmentación (Schallreuter et al., 1994). Asimismo, se ha demostrado su participación en algunos procesos desencadenados por la irradiación de luz UV sobre este tejido y se sospecha su participación en otros. El ejemplo mejor conocido de este grupo de fenómenos es la DNA fotoliasa, enzima que desencadena una serie de mecanismos de defensa contra los daños producidos por la luz UV. Esta enzima contiene una molécula de N⁵,N¹⁰-meteniltetrahidrofolilpoliglutamato, un derivado del ácido fólico capaz de funcionar como antena detectora de luz UV (Sancar y Sancar, 1988; Johnson et al., 1988). También se ha propuesto que las pterinas podrían jugar algún rol en la generación de distintos cánceres de piel provocados por luz de tipo UV-A (320-400 nm.) (Ito y Kawanishi, 1997).

Cabe destacar, en este punto, que los estudios fisicoquímicos realizados *in vitro* sobre la fotoquímica de estos compuestos revisten importancia porque aportan datos que pueden servir para comprender los mecanismos específicos que ocurren *in vivo*.

Se hace evidente, teniendo en cuenta lo expuesto hasta aquí, la importancia bioquímica de esta familia de compuestos. En este capítulo se hará una descripción resumida de sus principales funciones *in vivo* conocidas hasta el momento, mientras que los procesos fotobioquímicos citados se expondrán con mayor detalle.

3.2. Metabolismo y función del ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahidrofolato, el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida (Stryer L., 1995).

3.2.1. Absorción y transporte del ácido fólico

Los mamíferos no poseen la capacidad de sintetizar el anillo de pterina, por ello deben recurrir a otras fuentes. En efecto, adquieren esta vitamina principalmente a partir de la dieta y, en menor proporción, de los microorganismos existentes en su tubo digestivo. Se encuentra principalmente en vegetales verdes, muchas frutas, hígado, riñón, huevos y leche, pero se destruye fácilmente durante la cocción. Los requerimientos diarios de un ser humano adulto son de 50 a 100 µg, aunque estas necesidades aumentan hasta 400 µg durante el embarazo.

Esta vitamina se encuentra en los alimentos generalmente en forma de poliglutamatos; es decir que el residuo de ácido glutámico presente en la molécula de ácido fólico se encuentra unido a otras moléculas de ácido glutámico mediante uniones peptídicas (función amida). Los poliglutamatos no pueden ser absorbidos por el intestino por lo cual primero se escinde la cadena de residuos de glutamato para obtener el monoglutamato (ácido fólico propiamente dicho). Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas conjugasas presentes en el borde en cepillo de las células de la mucosa yeyunal.

Posteriormente y sin el requerimiento de ningún cofactor, como es necesario para otras vitaminas, es absorbido y convertido, en el interior de la célula de la mucosa intestinal, en N⁵-metiltetrahidrofolato (figura 3.1).

El ácido fólico circula en el plasma en forma de N⁵-metiltetrahidrofolato libre o ligado débilmente a la albúmina y es captado por todos los tejidos, pero principalmente por el tejido hepático donde se almacena y participa en las reacciones metabólicas que se detallan en la próxima sección.

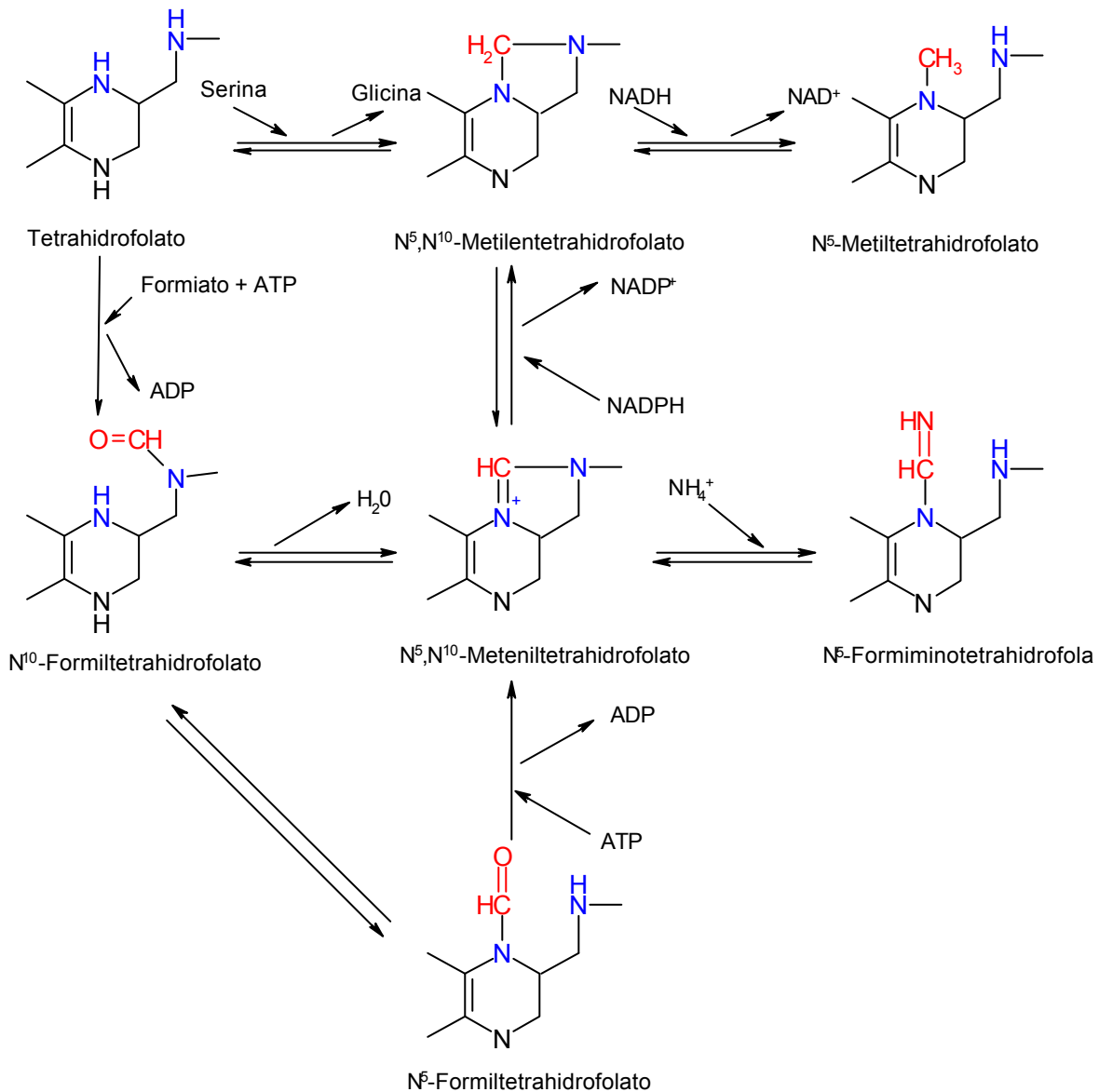


Figura 3.1. Derivados del ácido fólico que participan en reacciones metabólicas transportando unidades monocarbonadas y las reacciones mediante las cuales se interconvierten.

3.2.2. Tetrahidrofolato como transportador de fragmentos de un átomo de carbono.

Como se mencionó anteriormente, el tetrahidrofolato actúa como transportador de unidades de un solo átomo de carbono (Stryer L., 1995). Este fragmento monocarbonado está unido al átomo de N-5 o al N-10 (que se indican como N⁵ y N¹⁰), o a ambos y puede existir en tres estados de oxidación. La forma más reducida corresponde al grupo metilo, la forma intermedia corresponde al grupo metileno. Las formas más oxidadas corresponden a los grupos metenilo, formilo o formimino. Como puede observarse en la figura 3.1 estas unidades de un átomo de carbono son interconvertibles, existiendo para ello un conjunto de reacciones bioquímicas específicas.

Estos derivados del tetrahidrofolato sirven como dadores de unidades monocarbonadas en una amplia gama de reacciones biosintéticas. La metionina, por ejemplo, se sintetiza a partir de homocisteína por transferencia del grupo metilo del N⁵-metiltetrahidrofolato. Ciertos átomos de carbono de las purinas derivan del N¹⁰-formilderivado. El grupo metilo de la timina, una pirimidina, proviene del N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolato. Este último derivado también participa en la síntesis de glicina a partir de CO₂ y NH₄⁺ cediendo un fragmento monocarbonado.

Por otra parte, el tetrahidrofolato sirve como aceptor de fragmentos monocarbonados de ciertas reacciones degradativas. En particular, tiene gran importancia la conversión de serina en glicina, la cual origina N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolato (figura 3.1). Esta reacción permite obtener fragmentos monocarbonados a partir de carbohidratos. Otra reacción relevante es la escisión de la histidina que genera el N⁵-formiminotetrahidrofolato.

3.2.3. Déficit de ácido fólico.

La falta de ácido fólico afecta a todas aquellas rutas metabólicas en las cuales el mismo participa cediendo o aceptando unidades monocarbonadas. Esto produce una serie de trastornos que se manifiestan en forma de patologías (Rapaport, 1988; Ranney y Rapaport, 1993) . El déficit de ácido fólico puede producirse en los mamíferos y, en particular en el hombre, por diversos motivos. Uno de ellos, el más frecuente, es una mala alimentación. La dieta habitual no contiene mucho más de la demanda diaria mínima y los depósitos tisulares en los adultos sólo se mantienen unos tres meses. Otra causa es la absorción deficiente que ocurre, en general, en asociación con los síndromes de malabsorción intestinal. La utilización inadecuada del ácido fólico, en cambio, es mucho menos frecuente y puede estar asociada a

cierto bloqueo de su metabolismo por el alcohol o por el uso de antagonistas del ácido fólico, como el metotrexato, utilizado habitualmente en el tratamiento de neoplasias.

De todas las reacciones bioquímicas en las que participan los derivados del ácido fólico las más importantes son las involucradas en la síntesis de nucleótidos (monómeros de los ácidos nucleicos). Cuando estas reacciones se interrumpen por algún motivo, déficit de ácido fólico, por ejemplo, los ácidos nucleicos no pueden sintetizarse y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Por lo tanto, se ven seriamente afectadas todas aquellas regiones del organismo que requieren de la multiplicación constante de ciertas células. En efecto, los tejidos y órganos más afectados son los relacionados con las células sanguíneas y la mucosa intestinal.

De esta manera, la alteración en la síntesis de DNA que existe en el déficit de ácido fólico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la médula ósea, que se conoce con el nombre de anemia megaloblástica. Por otra parte, se produce una atrofia de la mucosa del tubo digestivo que puede provocar un estado de malabsorción que puede, a su vez, intensificar el déficit primario.

3.3. Fotoliasa

La irradiación con luz UV-C (200 - 280 nm) mata rápidamente a las células y, entre las supervivientes, se encuentra una elevada frecuencia de mutaciones (Stanier et al., 1984). Esto explica los daños que produce la luz UV sobre la piel del ser humano y la tendencia a generar cáncer de piel en las zonas expuestas.

Estos fenómenos se producen debido a los procesos fotoquímicos que ocurren a nivel del ADN celular. La presencia de las bases nitrogenadas en la estructura del DNA, hace que esta macromolécula absorba fuertemente la luz UV; su absorción máxima se sitúa alrededor de los 260 nm.

Al irradiar una solución de ADN con luz UV, tienen lugar varios cambios químicos. El más importante es la formación de enlaces covalentes entre restos de pirimidina adyacentes en una misma cadena, formando dímeros de pirimidinas. Estos dímeros distorsionan la forma de la molécula de ADN e interfieren en el apareamiento normal de las bases. Este efecto produce un bloqueo parcial de la replicación, a cargo de la enzima denominada ADN polimerasa, y de

la transcripción del ADN, lo cual puede producir la muerte celular. Las mutaciones también son generadas principalmente por los dímeros de pirimidina. En efecto, cuando la ADN polimerasa logra pasar la zona del dímero de pirimidina, sintetiza moléculas de ADN con la secuencia equivocada, generándose una mutación que se transmitirá a las células hijas. Todos los procesos que aumentan la frecuencia de mutaciones elevan la probabilidad de la aparición de procesos neoplásicos.

Las células tienen dos mecanismos principales para defenderse de los dímeros de pirimidina. Uno de ellos consiste en la acción de un elaborado conjunto de enzimas que efectúan la denominada "reparación oscura del ADN". Estas enzimas cortan la cadena dañada en la zona donde se encuentran los dímeros de pirimidina, remueven los nucleótidos y vuelven a sintetizar una cadena nueva. El otro mecanismo se denomina fotorreactivación (Kelner, 1949), está a cargo de la enzima ADN-fotoliasa (fotoliasa) y es el que interesa, a los fines de este capítulo, porque en él participa un derivado del ácido fólico. Este mecanismo puede evidenciarse con un experimento muy sencillo diseñado hace más de 60 años (Hollaender y Claus, 1937). Si las células son irradiadas previamente con luz de longitud de onda en el rango 350 - 500 nm, que no daña directamente a la molécula de ADN, pues no absorbe en esta zona, disminuye considerablemente tanto la frecuencia de mutación como la letalidad cuando se las expone a la luz UV-C. Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce este fenómeno fue dilucidado muchos años después (Sancar, 1990; Eker et al., 1990).

La fotoliasa contiene dos cofactores unidos de forma permanente a su estructura proteica (Sancar y Sancar, 1988; Johnson et al., 1988, Hearst, 1995). Uno de ellos es una molécula de flavin-adenín-dinucleótido en una de sus formas reducidas (FADH⁻). El otro es una molécula de N⁵,N¹⁰-meteniltetrahidrofolato (MTHF).

La figura 3.2 muestra un esquema que representa el mecanismo de acción de la fotoliasa (Hearst, 1995). La molécula de MTHF absorbe un cuanto de luz y pasa a un estado electrónicamente excitado. Mediante un proceso de transferencia de energía vuelve a su estado basal, excitando a la molécula de FADH⁻. Esta molécula excitada es capaz de ceder un electrón al dímero de piridina, rompiéndose los enlaces que unen al par. Por último, la piridina que quedó con un electrón de más, lo cede nuevamente al FADH⁻.

Como puede observarse claramente la energía proveniente de luz UV-A o visible es utilizada para reparar el dímero de pirimidina, causado por luz de longitud de onda menor. En la mayor parte de los casos cuando una célula recibe luz UV de longitudes de onda menores

300 nm, también recibe luz de mayores longitudes de onda. Es decir que a la vez que se produce el daño al ADN, se activa la maquinaria para repararlo. Eso ocurre, por ejemplo en las exposiciones prolongadas a la luz solar. La competencia entre los procesos que dañan al ADN y los mecanismos de reparación decide el destino de la célula irradiada.

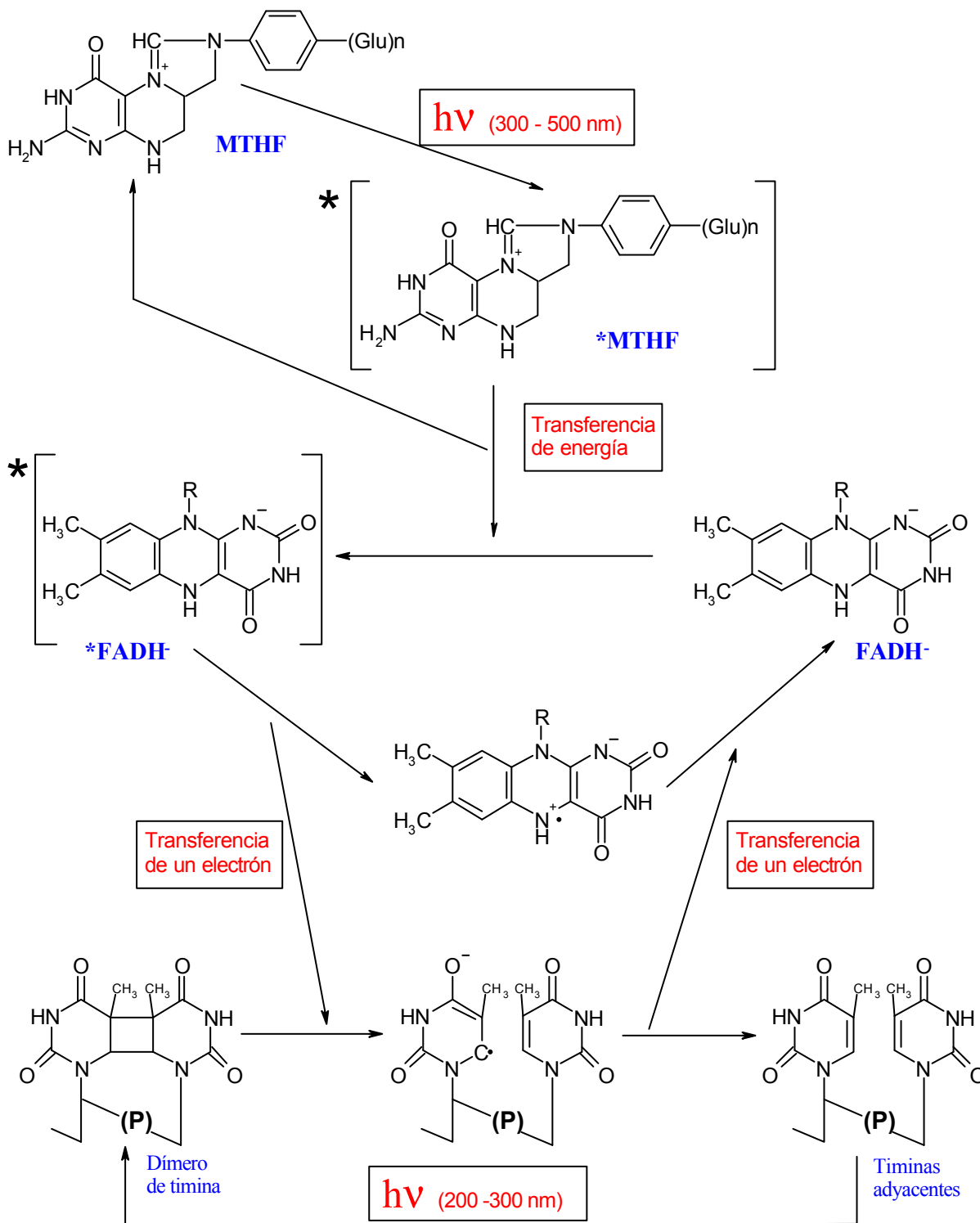


Figura 3.2. Mecanismo de la fotorreparación por la fotoliasa.

3.4. Pterinas presentes en insectos como pigmentos

Como fue mencionado al inicio de este capítulo, los compuestos denominados xantopterina y leucopterina fueron descubiertos en las alas de ciertas mariposas como pigmentos. En 1933 otro compuesto amarillo fue aislado de las mariposas (Wieland et al., 1933) y recibió, tiempo después, el nombre de isoxantopterina. Las estructuras químicas de estos derivados se muestran en la figura 3.3. Investigaciones más recientes han revelado que pigmentos de otros colores presentes en una gran variedad de especies de mariposas son también de naturaleza pterínica (Pfleiderer, 1993). La eritropterina, por ejemplo, fue aislada de mariposas tropicales sudamericanas (Schöpf y Becker, 1936); en particular, se la encuentra en grandes cantidades en la especie *Catopsilia argante*. Este compuesto presenta una forma tautomérica estable que es la responsable de su intenso color naranja (von Philipsborn et al., 1963).

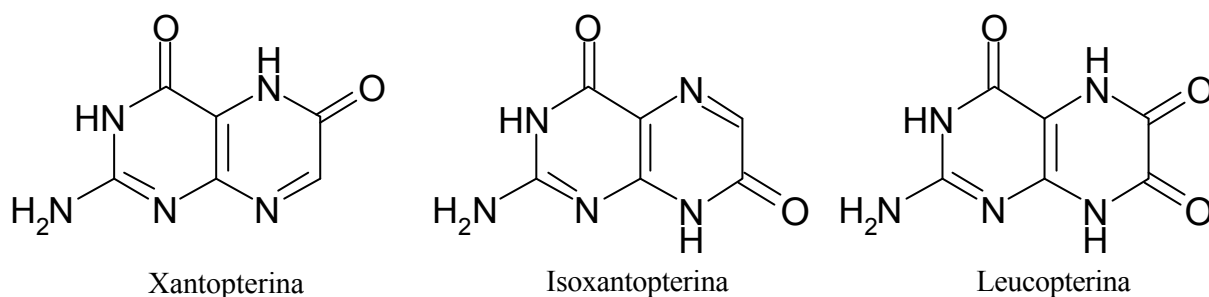


Figura 3.3. Estructura química de algunas pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.

Otros grupos de derivados más complejos fueron más recientemente descubiertos en otros organismos. Por ejemplo, la pterorrodina (Pfleiderer, 1963), fue aislada de varios insectos y anfibios. Esta sustancia de un color rojo muy intenso consta en su estructura, mostrada en la figura 3.4, de dos moléculas de xantopterina unidas por un puente de un átomo de carbono. Vale la pena resaltar que este compuesto, encontrado en cantidades considerables en los ojos de varios animales inferiores (Kühn y Egelhaf, 1959; Viscontini et al., 1970) y en ciertas especies de sapos (Misuraca et al., 1977), parece estar ampliamente distribuido en el reino animal. Otro interesante grupo de pterinas naturales fue descubierto, ya en la década del 40', en los ojos de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) (Lederer, 1940; Viscontini et al., 1957; Scwuink y Mancini, 1973). Se trata de las drosopterinas cuya estructura básica,

que se muestra también en la figura 3.4, sólo pudo ser resuelta hacia fines de los 70's (Theobald y Pfeleiderer, 1978).

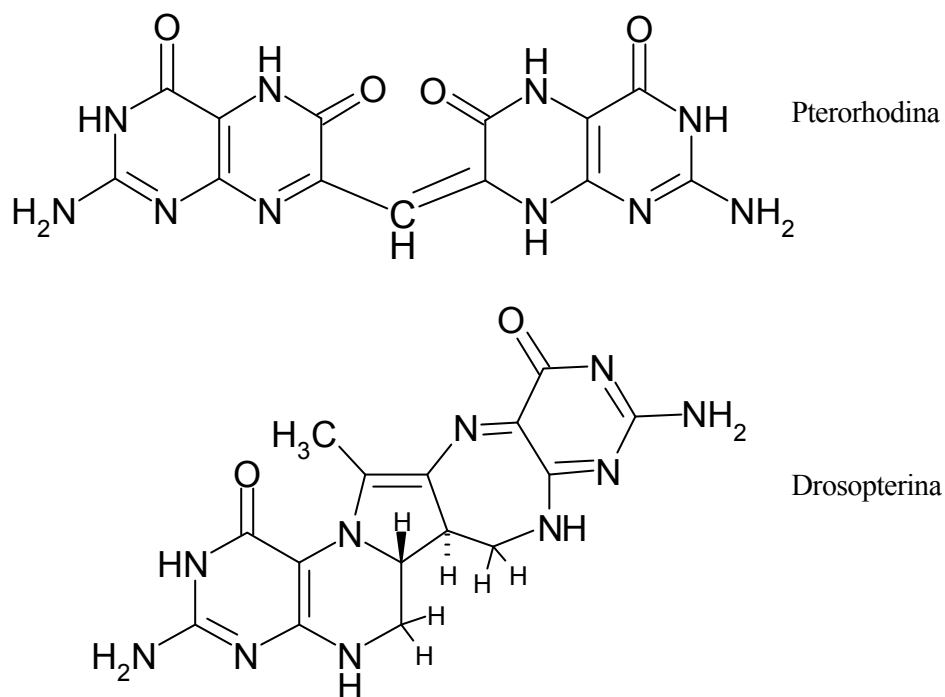


Figura 3.4. Estructura química de algunos derivados pterínicos encontrados en los ojos de ciertos insectos y anfibios.

Debido a sus características espectrales y al hecho de ser hallados en órganos fotosensibles, se ha postulado que estos compuestos podrían participar en la captación de la luz por parte de los mismos. Sin embargo, y aunque se encuentran en marcha diversas investigaciones en este sentido, esto no se ha podido demostrar aún.

3.5. Tetrahidrobiopterina y molibdoenzimas.

Además del ácido fólico, otros compuestos relacionados con la familia de las pterinas participan en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores. La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, un derivado reducido de la biopterina, y ciertos derivados pterínicos azufrados son los ejemplos mejor conocidos.

3.3.1. Tetrahidrobiopterina.

Este compuesto participa en la transformación de la fenilalanina a tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa (Stryer L., 1995). Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasa, las cuales catalizan reacciones en las que participa el O_2 disuelto en el medio. Uno de los átomos del mismo se incorpora al compuesto que se oxida (generalmente se hidroxila), mientras que el restante aparece en forma de H_2O . En la figura 3.5 se muestra un esquema del conjunto de reacciones involucradas en esta transformación.

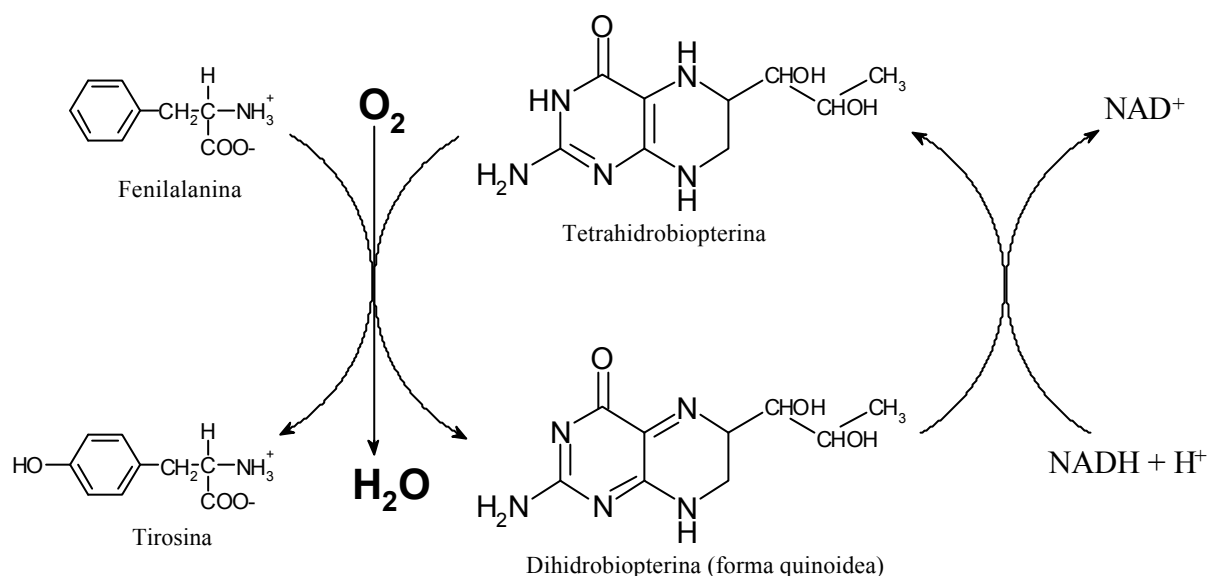


Figura 3.5. Participación de la tetrahidrobiopterina a la conversión de fenilalanina a tirosina.

Se sabe, actualmente, que el óxido nítrico ($\bullet NO$) es un intermediario metabólico de los mamíferos. Participa en diversos procesos tales como la vasodilatación y la regulación del tono vascular normal, la inhibición de la agregación plaquetaria, transmisión neuronal y citostasis. El óxido nítrico se forma en las células a partir de la L-arginina y esta reacción es catalizada por una compleja enzima denominada óxido nítrico sintasa, que contiene a la tetrahidrobiopterina como uno de sus cofactores (Marletta, 1993). La función de este derivado no está aún totalmente dilucidada existiendo actualmente varias hipótesis sobre el tema (Hevel y Marletta, 1992; Giovanelli et al., 1991).

3.3.2. Molibdoenzimas.

Existe un conjunto de enzimas que contienen ligado a su estructura proteica átomos de molibdeno. Entre ellas se encuentran la sulfito oxidasa, la nitrogenasa, la nitrato reductasa y la

xantina deshidrogenasa (Rajagopalan et al., 1993). Estas molibdoenzimas catalizan, excepto la nitrogenasa, reacciones de hidroxilación oxidativa o deshidroxilación reductiva. Si bien el cofactor que contiene al molibdeno aún no ha podido ser aislado, investigaciones llevadas a cabo sobre la sulfito oxidasa lograron caracterizarlo, postulándose la estructura mostrada en la figura 3.6 (Kramer et al., 1987). Se cree que este cofactor, al cual se le ha dado el nombre de molibdopterina, está presente en todas las molibdoenzimas con excepción de la nitrogenasa. Puede observarse que el átomo metálico está coordinado a un grupo ditioleno a través de sus azufres; las otras dos posiciones de coordinación están ocupadas por átomos de oxígeno. Varios grupos de investigación están intentando dilucidar la función específica que cumple este singular cofactor.

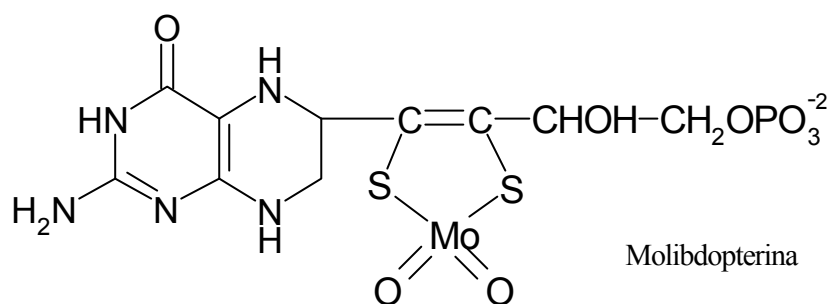


Figura 3.6. Estructura química postulada para el cofactor de la sulfito oxidasa.

3.6. Pterinas como fotorreceptores

Existe un conjunto heterogéneo de procesos bioquímicos que son activados en presencia de luz ultravioleta de tipo UV-A y que son denominados, genéricamente, respuestas fisiológicas controladas por la luz azul (Ninnemann, 1995). Estos fenómenos fotobiológicos, no incluidos en la fotosíntesis, entre los que se encuentra la fototaxis, han sido estudiados principalmente en microorganismos tales como bacterias y hongos unicelulares. Todos tienen en común la existencia de un compuesto, o conjunto de compuestos, que sirve como antena; es decir, que absorbe la radiación ultravioleta e inicia la secuencia de cambios químicos que conducirán finalmente a la respuesta fisiológica de la célula a la luz. La fotoliasa, detallada en la sección 3.2 y toda la respuesta de defensa contra el daño producido por la luz UV sobre el ADN, se encuadran dentro este tipo de procesos.

Numerosos grupos de investigación han dedicado sus esfuerzos a aislar e identificar a los cromóforos que absorben luz cumpliendo el papel de fotorreceptores. Las primeras investigaciones en este sentido fueron realizadas por Warren Butler a principios de la década de 1970, quien buscó sistemáticamente cambios de absorbancia en sistemas biológicos posteriores a la irradiación con luz azul y UV-A. Se admitía que la absorción de luz por parte de los fotorreceptores generaría cambios en los mismos que se traducirían en cambios en la absorbancia del sistema de suficiente magnitud como para poder ser detectados espectrofotométricamente. Esta búsqueda tuvo resultados positivos en experimentos realizados con *Dictiostelium* (Poff et al., 1973), *Phycomyces* (Poff y Butler, 1974) y *Neurospora* (Muñoz et al., 1974). En estos trabajos se estudiaron las características de los cambios espectrales, la variación de la respuesta bioquímica con la longitud de onda de la luz incidente y otros aspectos espectroscópicos. Asimismo se investigó el efecto de la irradiación de luz sobre la concentración *in vivo* de sustancias que eran sospechadas de ser cromóforos. Posteriormente, se estudió la respuesta bioquímica a la luz en mutantes que eran deficientes en posibles cromóforos (Brain et al., 1977; Paietta y Sargent, 1981).

Los resultados de estos estudios permitieron saber que, en general, estos fotorreceptores son sustancias incluídas, como grupos prostéticos, en complejas estructuras proteicas que, a su vez, pueden tener otros grupos prostéticos y cofactores, necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Se ha demostrado que ciertas flavinas, formando parte de las denominadas flavoproteínas, y compuestos carotenoides cumplen este tipo de funciones en una variedad de organismos.

Si bien todavía no existe evidencia concluyente como la hay para las flavinas y compuestos carotenoides, la participación de las pterinas en respuestas fisiológicas controladas por la luz azul ha sido propuesta en varios organismos. El ejemplo mejor conocido, tal vez sea la mencionada anteriormente nitrato reductasa de *Neurospora*, enzima que está involucrada en este tipo de procesos fotobiológicos y que contiene en su estructura tanto molibdopterinas como flavinas (Klemm y Ninneman, 1979; Ninneman, 1984; Siefertmann-Harms et al., 1985). Asimismo, derivados pteridínicos podrían jugar un papel importante en combinación con las flavinas en ciertas especies de *Phycomyces* (Berns y Vaughn, 1970; Hohl et al., 1992), particularmente, se demostró la existencia de biopterina en *Phycomyces blakesleeanus* (Kiewisch y Fukshansky, 1991). Por último, fue postulada la

participación de las pteridinas como fotorreceptores en procesos de fototaxis presentes en *Euglena gracilis* (Galland et al., 1990; Schmidt et al., 1990; Brodhum y Häder, 1990).

Capítulo 4.

Estudios previos sobre la fotoquímica del ácido fólico y las pterinas

4.1. Fotoquímica del ácido fólico.

En 1944 se observó, por primera vez, que la luz UV convertía al ácido fólico, que es un compuesto no fluorescente, en otro fluorescente (Bloom et al., 1944). Poco después, otro grupo de investigación descubrió que la luz solar provoca la liberación de una amina diazotable en soluciones de ácido fólico (Stokstad et al., 1947). En base a estos resultados propusieron el clivaje fotoquímico del ácido fólico en un componente pterínico y ácido *p*-aminobenzoilglutámico.

Teniendo en cuenta estos estudios previos y con el propósito de obtener información para desarrollar un método analítico sensible para la determinación del ácido fólico, Lowry, Bessey y Crawford llevaron a cabo un estudio dirigido a la identificación de los productos de la fotólisis (Lowry et al., 1949). Estos estudios fueron realizados irradiando ácido fólico en soluciones acuosas de ácido acético 0,01 M. A continuación se describirá sucintamente los métodos usados y los resultados obtenidos en ese estudio de carácter analítico.

A distintos tiempos de irradiación se realizaron determinaciones colorimétricas de aminas diazotables y se comparó con los resultados obtenidos en soluciones de ácido *p*-aminobenzoico. A partir del análisis de estos experimentos, los autores infirieron que en la reacción de descomposición fotoquímica del ácido fólico se produce la liberación de una amina aromática; sin embargo, no pudieron identificarla.

Por el contrario, los autores fueron capaces de identificar derivados pterínicos presentes en las soluciones irradiadas de ácido fólico. En particular, se reportó la presencia de

6-formilpterina, 6-carboxipterina y pterina. Para la identificación de estos fotoproductos se compararon los espectros de absorción (y los espectros diferencia) y los espectros de emisión de las soluciones de ácido fólico irradiadas durante tiempos crecientes con la de los correspondientes patrones.

La xantina oxidasa es una enzima que juega un papel muy importante en las últimas etapas del catabolismo de las purinas en el metabolismo humano, ya que su principal función consiste en catalizar la oxidación de la hipoxantina y la xantina a ácido úrico (Bray, 1963). Lowry y colaboradores encontraron que, a tiempos de irradiación cortos, las soluciones de ácido fólico producían inhibición de la actividad de la enzima; en una etapa intermedia la enzima no se veía afectada y que el producto final de la fotólisis, no solamente no tenía acción inhibitoria sino que era oxidado por acción de esta enzima a un compuesto que, por sus características espectrales, podría ser la isoxantopterina. Este comportamiento coincide respectivamente con el hallado para las soluciones patrones de 6-formilpterina, 6-carboxipterina y pterina. A partir del análisis de estos resultados experimentales, los autores propusieron la secuencia de reacciones mostrada en la figura 4.1.

Si bien en esta publicación no se presenta un estudio de la fotólisis en función del pH, se advierte que, en medio alcalino, el aumento de la fluorescencia con el tiempo de irradiación se torna más lento. Asimismo se reporta que en ausencia de O_2 las reacciones son mucho más lentas.

De este estudio no surgen conclusiones sobre la dependencia con el pH, el efecto del O_2 , ni se postula la participación de especies activadas del mismo. Tampoco se reportan rendimientos cuánticos, ni se analiza el mecanismo de la reacción. Más aún, la secuencia de reacciones propuesta (figura 4.1) se desprende del análisis de métodos indirectos y no se realizaron experimentos de fotólisis con soluciones preparadas directamente con los patrones de los distintos fotoproductos. Sin embargo, el esquema de reacciones propuesto sirvió como base de partida para encarar un estudio más amplio empleando métodos de análisis más directos y modernos.

No fueron encontradas publicaciones posteriores que se ocupen específicamente de la fotoquímica del ácido fólico. No obstante, existen algunas contribuciones relacionadas con la inhibición de la xantina oxidasa por diversos compuestos que resultan de interés para el presente trabajo de tesis. Entre ellas aparecen algunas que dan cuenta que las soluciones acuosas de ácido fólico y de 6-formilpterina presentan esta actividad. En la década del 80'

hubo investigadores que propusieron que las soluciones de ácido fólico no inhibían a la citada enzima por una acción directa de las moléculas de este compuesto, sino por acción de pequeñas cantidades de 6-formilpterina presentes como contaminación (Spector y Ferone, 1984). Como evidencia a favor de esta hipótesis mostraron que las soluciones de ácido fólico perdían en gran proporción su actividad inhibitoria si eran preparadas con ácido fólico purificado por recristalización. Por el contrario, hubo otros investigadores que contemporáneamente afirmaron que el ácido fólico tenía acción inhibitoria propia (Lewis et al., 1984).

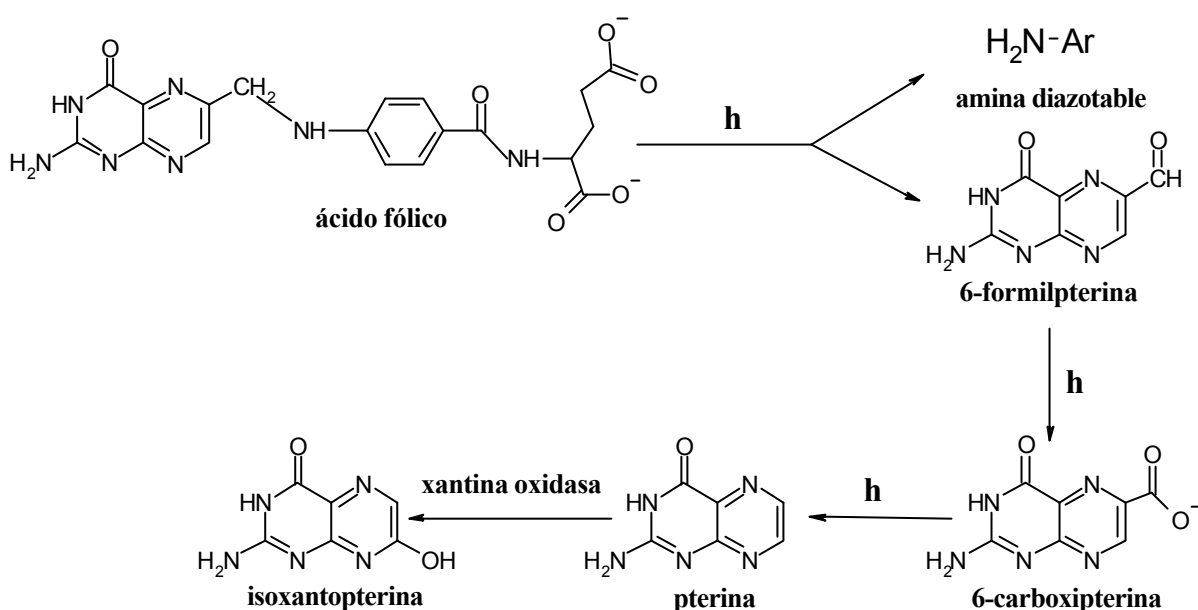


Figura 4.1. Esquema de reacciones propuesto por Lowry y colaboradores en 1949.

Con el objeto principal de decidir sobre esta cuestión, Robinson y colaboradores (1990) publicaron un estudio sobre inhibición de la xantina oxidasa por soluciones de ácido fólico, aminopterina y metotraxato. Realizaron ensayos de inhibición con soluciones preparadas con ácido fólico recristalizado, sin purificar y con soluciones irradiadas con luz UV. Mostraron que, en coincidencia con lo reportado por Spector y Ferone, las primeras presentaban menor actividad inhibitoria que las segundas y que las soluciones irradiadas eran las más inhibitorias de todas.

Además realizaron experimentos en los cuales analizaron, a distintos tiempos de irradiación, la actividad inhibitoria y la concentración de aldehídos, determinada mediante la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. Los resultados obtenidos mostraron una excelente correlación en la evolución temporal de ambos parámetros, a la vez que

corroboraron la presencia de un compuesto aldehídico cuya concentración aumentaba con el tiempo de irradiación hasta alcanzar un máximo y luego descendía. Por otro lado, observaron que irradiando soluciones acuosas de 6-formilpterina, ésta se convertía en otro compuesto de naturaleza no aldehídica y sin actividad inhibitoria de la xantina oxidasa. Estos resultados están de acuerdo con los observados por Lowry y colaboradores (1949); no obstante no identificaron al mencionado fotoproducto.

Sin embargo, el resultado más importante desde el punto de vista fotoquímico, tal vez haya sido que detectaron un comportamiento cinético de tipo sigmoidal en el aumento de la concentración del fotoproducto aldehídico. Los autores no analizaron en detalle la cinética ni el mecanismo de este proceso, pero advirtieron sobre la posible existencia de otro intermediario, anterior a la 6-formilpterina, en la cadena de reacciones involucradas en la fotólisis del ácido fólico.

4.2. Fotoquímica de otros derivados pteridínicos.

El investigador alemán Wolfgang Pfeleiderer ha publicado durante más de treinta años numerosos trabajos sobre diversos aspectos químicos de las pterinas y las lumazinas. Entre ellos se encuentra un grupo dedicado a la fotoquímica de estos compuestos. Si bien este autor y sus colaboradores no estudiaron la fotoquímica de los mismos derivados que se exponen en este trabajo de tesis, ha realizado estudios con compuestos estructuralmente muy relacionados, particularmente con polihidroxiálquilpterinas. En particular puede citarse una publicación muy interesante sobre neopterina y biopterina, dos pterinas con sustituyentes en la posición 6 (Mengel et al. 1977). En este trabajo, los autores muestran que la fotooxidación de la biopterina a 6-carboxipterina, reportada por primera vez muchos años antes (Forrest y Mitchell, 1955), ocurre en un proceso que involucra varias etapas. Esta secuencia de reacciones puede apreciarse en la figura 4.2.

En una primera etapa, observada realizando la irradiación en condiciones anaeróbicas, la biopterina se escinde en su cadena lateral rindiendo dos fotoproductos. Uno de ellos, fue identificado mediante experimentos de TLC, realizados sobre su correspondiente dinitrofenilhidrazona, como acetaldehído. El otro, de naturaleza pterínica, presenta una banda de absorción ancha y de intensidad relativamente baja, con máximo en una zona del espectro

en la cual las pterinas normalmente no presentan absorción de luz (475 nm). Diversas evidencias indirectas que se detallarán a continuación permitieron a los autores postular que este segundo fotoproducto es 6-formil-5,8-dihidropterina.

- Un compuesto pteridínico 5,8 dihidrogenado (6-acetil-1,3,7-trimetil-5,8-dihidrolumazina), preparado electroquímicamente, mostraba una banda de absorción de baja intensidad con máximo en 488 nm. Características espectroscópicas similares fueron observadas en 1,4-dihidropirazinas (Lown et al, 1974).

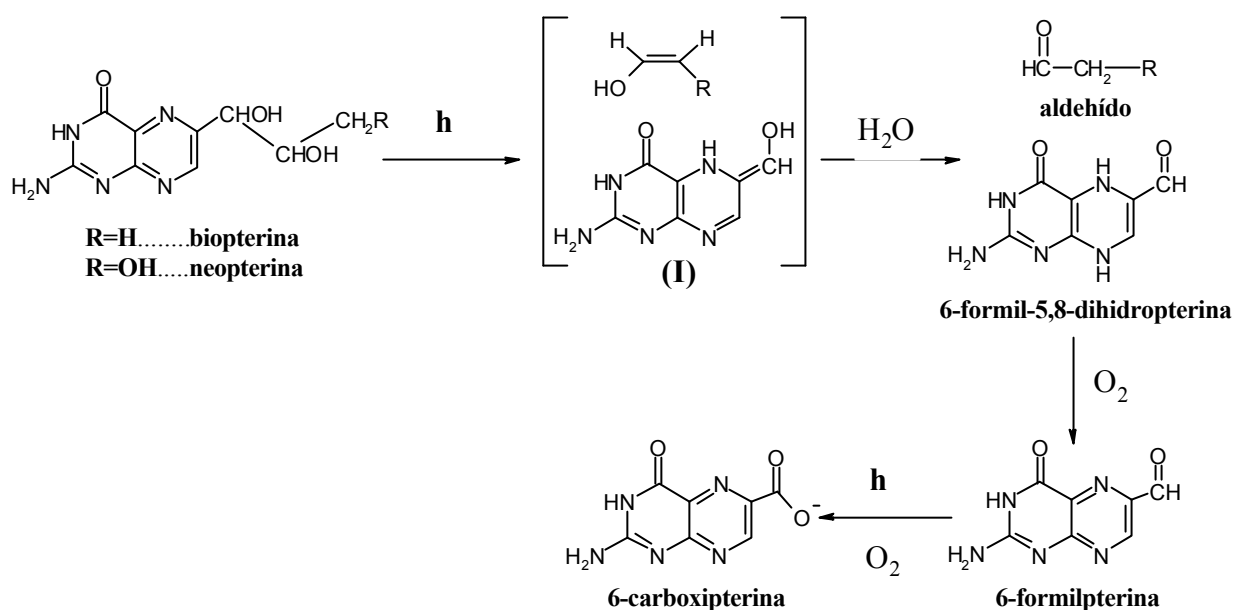


Figura 4.2. Fotólisis de biopterina y neopterin según esquema de reacciones propuesto por Pfeleiderer y colaboradores en 1977.

- Este fotoproducto pudo ser preparado a partir de la 6-formilpterina mediante un proceso de fotorreducción en presencia de ácido 1,4-ciclohexadieno-1-carboxílico (Knappe y Hemmerich, 1976; Knappe, 1977).
- Si bien los isómeros 7,8-dihidro son los isómeros más estables para las dihidropterinas, consideraciones teóricas sugieren que los isómeros 5,8-dihidro podrían ser estabilizados por la presencia del grupo formilo en la posición 6.

Pfeleiderer y colaboradores propusieron que la reacción tiene lugar siguiendo un mecanismo de clivaje Norrish tipo II. Según esta hipótesis, inmediatamente después de la ruptura de la molécula de biopterina, se formaría un intermediario (I, en el esquema de la figura 4.2) que rápidamente se transformaría en 6-formil-5,8-dihidropterina, el primer compuesto químicamente estable.

Cuando se suministra aire a la solución, el intermediario 6-formil-5,8-dihidropterina se oxida rápidamente a 6-formilpterina. Si la irradiación prosigue en presencia de O₂ este compuesto se oxida, a su vez, a 6-carboxipterina. Sin embargo, los autores no estudiaron el mecanismo de esta última fotólisis, ni realizaron experimentos de la misma en ausencia de O₂.

En esta publicación se reporta el rendimiento cuántico de consumo de biopterina solamente a pH 10 (0,11). En estas condiciones la molécula está presente mayoritariamente en su forma aniónica. Sin embargo, se menciona que la reacción tiene una fuerte dependencia con el pH, fotolizándose la forma neutra más lentamente. La forma catiónica, por su parte, es fotoestable.

La neopterina, por su parte, es degradada fotoquímicamente en una manera similar, rindiendo 6-formil-5,8-dihidropterina y, posiblemente, glicaldehído. Sin embargo, en este caso, no se reportan rendimientos cuánticos ni el efecto del pH sobre las reacciones involucradas.

En una publicación posterior, Pfleiderer, junto a otros autores describieron la degradación fotoquímica de otras dos polihidroxiálquilpterinas: 7-isobiopterina y 2-N,N-dimetilbiopterina (Figura 4.3) (Baur et al., 1979). En ambos casos observaron procesos similares al observado en la degradación fotoquímica de biopterina. Es decir, en las fotólisis se producían fotoclivajes que obedecían un mecanismo de Norrish tipo II. Asimismo encontraron (6 ó 7)-formil-5,8-dihidropterina como producto de la irradiación anaeróbica y (6 ó 7)-formilpterina como producto luego del suministro de oxígeno.

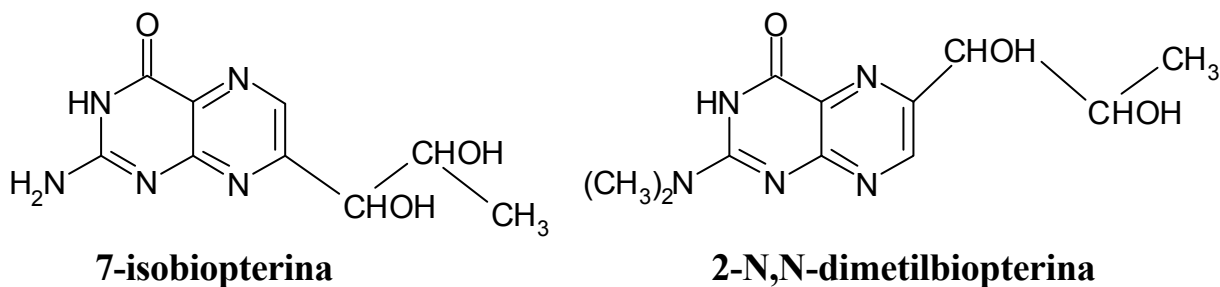


Figura 4.3. Estructura química de 2 polihidroxiálquilpterinas estudiadas por Pfleiderer.

Pfleiderer y colaboradores estudiaron también la fotólisis de ciertas 7,8 dihidropterinas que, a diferencia de la mayor parte de las pterinas hidrogenadas, son estables en soluciones aireadas. En la figura 4.4 se muestra el mecanismo propuesto para la fotólisis de sepiapterina y deoxisepiapterina.

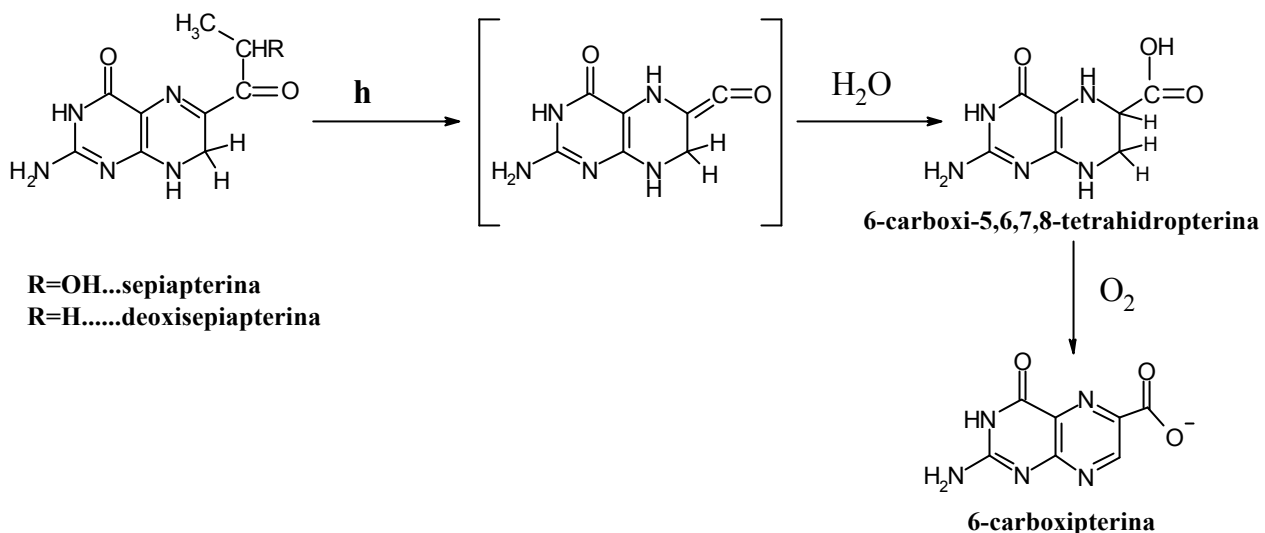


Figura 4.4. Mecanismo propuesto para la fotólisis de sepiapterina y deoxisepiapterina.

En esta misma publicación se reporta el fotoclivaje de ciertas lumazinas sustituidas en la posición 8, siguiendo también un mecanismo de Norrish tipo II. Sin embargo, en este caso no se detectaron intermediarios dihidrogenados. Un resumen de este conjunto de reacciones se muestra en la figura 4.5.

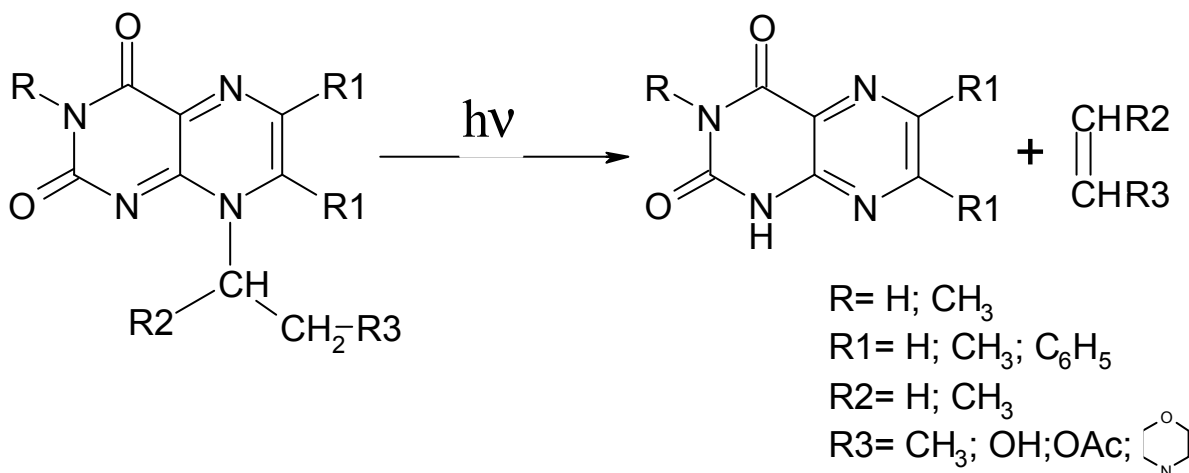


Figura 4.5. Fotoclivaje de lumazinas sustituidas en la posición 8.

Finalmente, Pfeleiderer y sus colaboradores han reportado los resultados de estudios fotoquímicos realizados sobre lumazinas azufradas (mercaptolumazinas) (Pfeleiderer et al., 1984). Estos experimentos, llevados a cabo en presencia de O₂, fueron realizados con soluciones de 6-tioxo-1,3,5-trimetil-5,6-dihidrolumazina, 6-mercapto-1,3-dimetilumazina, 7-mercapto-1,3-dimetilumazina y 4-tioxo-6,7-difenillumazina.

4.3. Propiedades fotofísicas de las pterinas

Muy poca información sobre la fotofísica del ácido fólico y las pterinas puede encontrarse en literatura y la mayor parte de los estudios están estrechamente relacionados con aspectos analíticos antes que fisicoquímicos. El espectro de emisión fluorescente del ácido fólico ha sido reportado, sin embargo, la intensidad del mismo en soluciones acuosas y a temperatura ambiente es muy débil. El espectro de emisión fosforescente no puede ser medido a temperatura ambiente, pero fue reportado a 77 K (Aaron y Winefordner, 1972).

Las pterinas, por el contrario, presentan espectros de emisión fluorescente más intensos. Uno de los primeros y, tal vez, el más importante de los trabajos sistemáticos realizados sobre el tema data de la década del 80' (Chahidi et al., 1981). En esta publicación, que describe un estudio llevado a cabo solamente con pterina, se muestran los espectros de fluorescencia de soluciones acuosas a temperatura ambiente y de soluciones en agua y etilenglicol a 77 K. Se estudia la variación de los espectros de fluorescencia con el pH y se reporta el rendimiento cuántico de fluorescencia a pH 10.

Asimismo, en dicho trabajo se muestra el comportamiento de los espectros de fosforescencia a 77 K con el pH. La emisión fosforescente a temperatura ambiente está por debajo de los límites de detección de los métodos empleados. También se muestran los resultados de estudios de fotólisis de flash realizados con un láser de Neodimio-YAG, reportando los tiempos de vida para los decaimientos de los estados tripletes. En este trabajo, no se midieron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), no obstante, se detectó quenching de los estados tripletes por O_2 , indicando la posible generación de la mencionada especie excitada.

Sin embargo, en otro trabajo de la misma época se demostró, por primera vez, que las pterinas eran capaces de generar $^1\text{O}_2$ (Momzikoff y Santus, 1981). Se estudiaron reacciones de fotosensibilización en las cuales los sustratos eran diversos aminoácido y bases púricas, y los fotosensibilizadores eran pterina e isoxantopterina. Sin embargo, en ese trabajo no se reportaron rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$.

Más recientemente, la fotofísica de otros dos derivados, la 6,7-dimetilpterina y 6-tetrahidroxibutilpterina (figura 4.6), fue estudiada (Neverov et al. 1996). En esta última publicación se muestran los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente y a 77 K y los espectros de fosforescencia a 77 K, junto con los correspondientes rendimientos cuánticos. En

este estudio se detectó la generación de $^1\text{O}_2$ por parte de ambos compuestos mediante un método más directo que el empleado por Momzikoff y Santus. En este caso se midió la fosforescencia a 1270 nm del $^1\text{O}_2$ presente en soluciones de los compuestos estudiados en agua pesada (D_2O) y se reportaron los correspondientes rendimientos cuánticos.

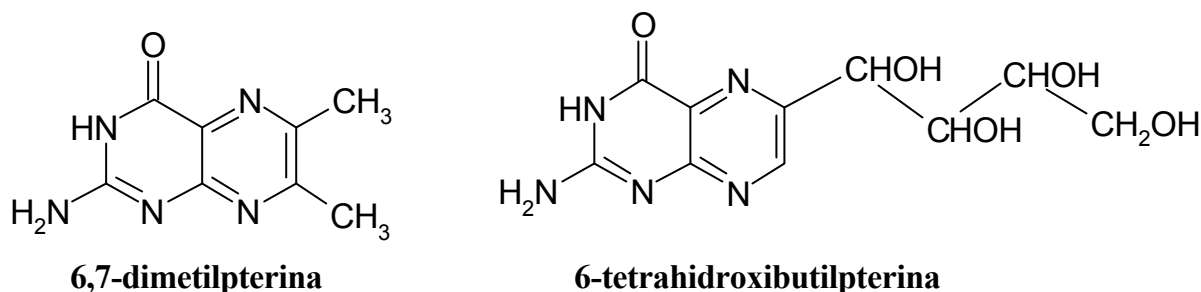


Figura 4.6. Estructura química de los compuestos estudiados por Neverov et al.

4.4. Oxígeno singlete.

El oxígeno singlete es una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular (O_2) y participa en innumerables reacciones de oxidación como intermediario activado. Se encuentra involucrado en ciertas reacciones fotoquímicas estudiadas en el presente trabajo de tesis. Debido a esto, en esta sección se hará un breve resumen sobre algunas de sus propiedades más importantes. Existen en literatura numerosas revisiones sobre los diversos aspectos de la química del oxígeno singlete que pueden ser consultados (Foote y Clennan, 1995; Gorman y Rodgers, 1989; entre otros).

El estado basal del O_2 es un triplete y, los dos estados electrónicamente excitados más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son $^1\Sigma_g^+$ y $^1\Delta_g$. En la figura 4.7 puede apreciarse el diagrama de energía para el O_2 . De los dos mencionados estados excitados sólo el de menor energía ($^1\Delta_g$) parece jugar un papel significativo en reacciones en solución y es éste estado al cual se denomina comúnmente oxígeno singlete o simplemente $^1\text{O}_2$. Se encuentra a 22,5 Kcal/mol sobre el estado basal; esta energía corresponde al infrarrojo (1270 nm), longitud de onda a la cual esta especie emite luz (fosforescencia). El estado de mayor energía ($^1\Sigma_g^+$), por su parte, se desactiva tan rápidamente al $^1\Delta_g$ que no tiene chances de participar en reacciones.

El $^1\text{O}_2$ se desactiva emitiendo luz y transfiriendo su energía al solvente. El tiempo de

vida es fuertemente dependiente de las características vibracionales del mismo. Los solventes con frecuencias vibracionales altas provocan una más eficiente relajación. El agua posee una intensa vibración O-H próxima a 3600 cm^{-1} , por esta razón, el $^1\text{O}_2$ presenta un tiempo de vida mucho menor en medio acuoso que en otros solventes. El reemplazo del agua común por D_2O disminuye la velocidad de desactivación del estado singlete debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. Se volverá sobre este último punto en la parte experimental cuando se describa el método empleado para la detección del $^1\text{O}_2$ (sección 8.3).

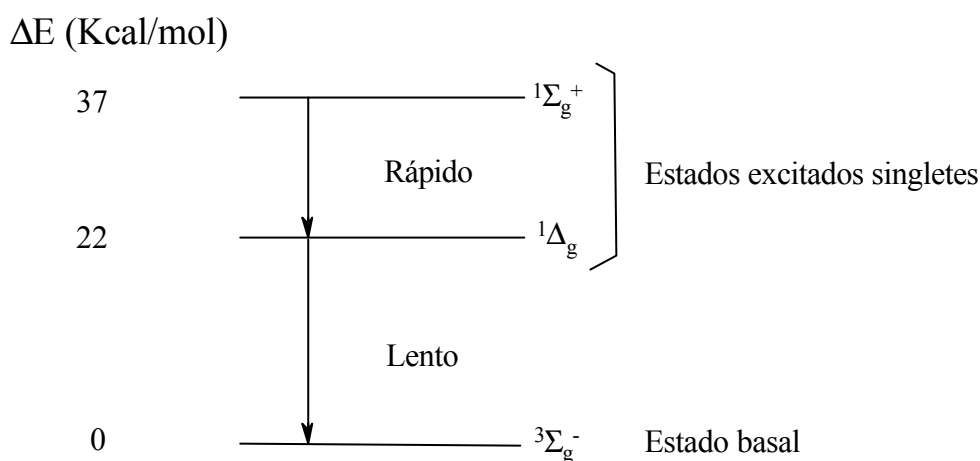


Figura 4.7. Diagrama de energía para el O_2 .

Existen dos tipos principales de fuentes para generar $^1\text{O}_2$: fotoquímica y química. Esta última implica una reacción química en la cual uno de los productos es el O_2 electrónicamente excitado, siendo uno de los ejemplos mejor conocidos la reacción del NaClO con H_2O_2 . La generación fotoquímica consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente sensibilizador, al O_2 . Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el O_2 queda en su estado excitado singlete.

En general, cuando el sensibilizador es una molécula orgánica, la absorción de luz genera un estado excitado singlete, el cual, mediante el proceso conocido como entrecruzamiento de sistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete. Es este estado triplete del sensibilizador el que tiene la capacidad de transferir su energía hacia el O_2 presente en el medio. El $^1\text{O}_2$, así formado, puede desactivarse físicamente por transferencia de energía al solvente, por choque térmico con alguna otra especie química presente en el medio (quenching) o emitiendo luz. Por el contrario, puede reaccionar con un sustrato. Cabe

aclarar que el rendimiento cuántico de fosforescencia es casi siempre despreciable respecto al rendimiento cuántico de desactivación por el solvente. Estos procesos se encuentran esquematizados en la figura 4.8.

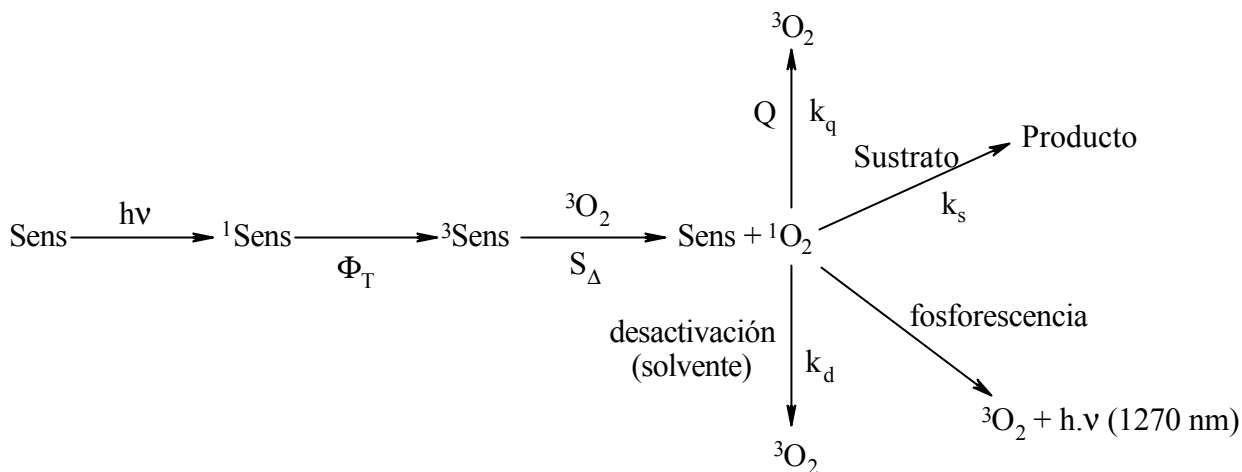


Figura 4.8. Generación fotoquímica del $^1\text{O}_2$ y posibles destinos del mismo. $^3\text{O}_2$ es el oxígeno molecular en su estado basal. Sens, $^1\text{Sens}$ y $^3\text{Sens}$ representan al sensibilizador en su estado basal, en un estado singlete excitado y en un estado triplete excitado, respectivamente. Q representa a un desactivador (quencher).

Este conjunto de procesos es de particular importancia en los sistemas biológicos por varias razones. En primer lugar, en los mismos existen diversas sustancias capaces de generar $^1\text{O}_2$ fotoquímicamente, entre las que se encuentran las porfirinas y las flavinas. Además estas moléculas pueden ser excitadas mediante luz visible y luz UV del tipo UV-A o UV-B; es decir, que pueden excitarse por exposición a la luz solar. Por último, se ha demostrado que esta especie reactiva del oxígeno, generado mediante este mecanismo, causa daño en distintos tipos de tejidos y muerte celular debido a que afecta diversas estructuras subcelulares (Henderson y Dougherty, 1992; Straight y Spikes, 1985). Las pterinas, por su parte, pueden estar involucradas en este tipo de procesos fotobiológicos debido a que existen algunas publicaciones, mencionadas en la sección anterior, en las cuales se reporta la generación fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por ciertos miembros de esta familia de compuestos.

El $^1\text{O}_2$ es una especie electrofílica sumamente reactiva y tiene la capacidad de atacar rápidamente a los compuestos orgánicos. Existe una gran variedad de reacciones entre las cuales pueden destacarse las siguientes: cicloadiciones [4 + 2] con 1,3-dienos para formar endoperóxidos, cicloadiciones [2 + 2] con compuestos que presentan dobles enlaces aislados

para formar los correspondientes dioxoetanos y otro tipo de ataque a dobles enlaces aislados en los cuales se generan hidroperóxidos. En todas estas reacciones los productos primarios formados pueden sufrir reordenamientos para dar una amplia gama de productos oxidados estables. Dichos reordenamientos son particularmente frecuentes en reacciones en las cuales el sustrato atacado es una biomolécula.

A continuación se realizarán algunas consideraciones cinéticas; sin embargo, primero, es necesario definir ciertos parámetros que figuran en el esquema de la figura 4.8. El rendimiento cuántico de formación del estado triplete (Φ_t) es la fracción de moléculas excitadas que sufren entrecruzamiento de sistemas, mientras que el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Φ_Δ) puede definirse como la fracción de moléculas de 1O_2 producidas por cada cuanto de luz absorbido por el sensibilizador. S_Δ , es la fracción de moléculas de sensibilizador en estado triplete que transfiere su energía al O_2 , k_d es la constante cinética de desactivación del 1O_2 por el solvente y k_s es la constante cinética bimolecular de la reacción del 1O_2 con un sustrato. De estas definiciones surge la siguiente expresión.

$$\Phi_\Delta = \Phi_t \cdot S_\Delta \quad (1)$$

La fracción de moléculas de 1O_2 que reaccionan con un sustrato S para dar un producto P viene dada por la siguiente expresión.

$$f_p = \frac{k_s \cdot [S]}{k_s \cdot [S] + k_q \cdot [Q] + k_d} \quad (2)$$

donde [S] es la concentración del sustrato y k_q es la constante de desactivación (quenching) por choque con un compuesto Q (quencher) con el cual no reacciona químicamente. El término $k_q \cdot [Q]$ no debe ser incluido cuando en el medio no hay sustancias que puedan actuar como desactivadores.

Por otro lado, el rendimiento cuántico de formación de producto (Φ_p) es la fracción de moléculas de producto que se forman por cuanto de luz absorbido. De esta definición y de las relaciones anteriores se deducen las siguientes expresiones (no se tuvo en cuenta la presencia de desactivadores).

$$\Phi_p = \Phi_\Delta \cdot f_p \quad (3)$$

$$\Phi_p = \Phi_\Delta \cdot \frac{k_s \cdot [S]}{k_s \cdot [S] + k_d} \quad (4)$$

Esta última ecuación permite el cálculo de k_s a partir de los valores de Φ_p y Φ_Δ

obtenidos en experimentos realizados bajo condiciones estacionarias. Los valores de k_d , por su parte, pueden encontrarse en literatura para una amplia gama de solventes (Gorman y Rodgers, 1989). Alternativamente, esta expresión permite la determinación de Φ_Δ y k_s si se obtienen los valores de Φ_P para distintas concentraciones de sustrato. Generalmente, para este fin, se realiza la gráfica de $(1/\Phi_P)$ en función de $1/[S]$ (forma lineal de la ecuación (4)), de la ordenada al origen puede obtenerse Φ_Δ y de la pendiente k_d .

$$1/\Phi_P = 1/\Phi_\Delta + (k_d/k_s) \cdot (1/[S]) \quad (5)$$

El sensibilizador puede reaccionar con el 1O_2 para dar un producto. En estos casos el sensibilizador es también el sustrato. Por consiguiente, si la única vía de descomposición fotoquímica de un compuesto es su reacción con el 1O_2 que él mismo produce, el rendimiento cuántico de la fotólisis viene dado por la expresión (4) y es, a diferencia de los rendimientos cuánticos de otros tipos de fotólisis fuertemente dependiente de la concentración.

PARTE II
MATERIALES Y MÉTODOS
EXPERIMENTALES

Capítulo 5.

Determinación de constantes de ionización

Se determinaron las constantes de ionización de diversos compuestos mediante curvas de titulación ácido-base empleando métodos espectrofotométricos (titulación espectrofotométrica). En la mayor parte de los casos estudiados, las constantes de ionización son constantes de disociación de grupos ácidos. La técnica empleada se basa, fundamentalmente, en el análisis de la variación del espectro de absorción de una solución de la sustancia estudiada cuando se cambia el pH de la misma sin cambiar su concentración. En este capítulo se expondrán los detalles técnicos de este procedimiento experimental.

5.1. Preparación de las soluciones

Las soluciones se prepararon pesando cantidades calculadas de las sustancias cuyas constantes de ionización se quieren determinar y luego disolviéndolas en soluciones acuosas de Na(OH) diluida. Esto favorece la disolución, ya que en medio alcalino, el ácido fólico y las pterinas presentan grupos ionizados. Posteriormente, se ajusta el pH de la solución en aproximadamente 11, mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución de Na(OH) 0,5 M y, por último, se lleva al volumen final mediante el empleo de matraces.

La concentración se ajustó de manera tal que la absorbancia de las soluciones fuera adecuada para realizar las medidas en el espectrofotómetro. Típicamente, se prepararon soluciones de concentración 100 μM , que permiten obtener absorbancias, para las zonas del espectro donde se producen los cambios espectrales (200-500 nm), comprendidas en el rango 0,1-1,5.

5.2. Procedimiento de la titulación.

5.2.1. Preparación de la solución correspondiente a cada pH.

Se preparó una solución de la sustancia a estudiar por pesada, como se explicó en el apartado anterior (5.1) (solución madre). Mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones acuosas de Na(OH) y/o HCl se fue ajustando el pH a los valores deseados. Para realizar esta operación se prepararon, por pesada, soluciones de Na(OH) de distintas concentraciones (5M; 0,5M y 0,05M). Se empleó Na(OH) en granallas, provisto por Merck y, las soluciones resultantes no fueron tituladas, pues esta operación no es necesaria a los fines de este trabajo. Por su parte, se prepararon soluciones de HCl a partir de solución concentrada comercial provista por Merck. Las concentraciones de estas soluciones, fueron similares a las de Na(OH) y tampoco se titularon para conocer con mayor exactitud su concentración.

Se tomaron alícuotas de entre 20 y 50 ml de la solución madre. El ajuste final de pH se realizó agregando pequeños volúmenes de las soluciones de HCl o Na(OH). En todos los casos este agregado se realizó empleando micropipetas, siendo los volúmenes adicionados menores al 0,5% del volumen de la alícuota. Teniendo en cuenta esta condición, puede considerarse que el aumento del volumen, al fijar el pH de la solución, es despreciable y, por ende, la concentración no varía respecto a la solución madre. Una vez alcanzado el pH deseado se tomó el espectro de absorción de la solución.

Repitiendo este procedimiento se modificó nuevamente el pH de la alícuota hasta alcanzar otro pH y se tomó el espectro de la solución. Se trabajó sobre la misma alícuota en tanto y en cuanto el volumen total agregado nunca sobrepase la condición fijada del 0,5 % del volumen inicial. De lo contrario, se descartó la alícuota con la cual se estaba trabajando y se tomó una nueva y se repitió la operación. De esta manera, mediante el agregado de las soluciones de distinta concentración de ácido y base, se logra modificar el pH de la solución en un amplio rango sin modificar la concentración de la sustancia cuya constante de ionización se quiere determinar.

5.2.2. Equipamiento.

Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Metrom, provisto de un electrodo de vidrio combinado. La calibración del equipo se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00; 10,00 y 12,00.

Los espectros de absorción, correspondientes a las soluciones preparadas como se detalló en el inciso anterior, fueron tomados en un espectrofotómetro Cary 3 de Varian. Este equipo, que permite tomar espectros de absorción en el rango comprendido entre 190 y 900 nm, es un espectrofotómetro de barrido de doble haz, que cuenta con un programa de computación que admite guardar las señales obtenidas y promediarlas, en aquellos casos en los cuales la relación señal-ruido no es aceptable, para lograr espectros suaves.

En todos los casos, se empleó como blanco una solución de agua (mili Q) y se grabaron los espectros entre 200 y 500 nm. Para casi todas las medidas, se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Cuando fue necesario, por emplearse concentraciones mayores a la habitual (100 μ M), se recurrió al uso de celdas de 2 mm de camino óptico.

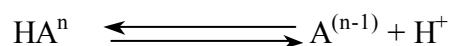
5.2.3. Titulación espectrofotométrica.

Se registraron los espectros de absorción de las soluciones preparadas. Luego, para cada caso, se determinaron las zonas del espectro donde se producían los mayores cambios en la absorbancia de las soluciones al variar el pH. También se analizaron los puntos isobésticos con el fin de evaluar la cantidad de formas ácido-base presentes en el rango de pH estudiado.

Se realizaron las correspondientes gráficas de absorbancia en función del pH a distintas longitudes de onda, las cuales se escogieron dentro de las zonas de mayor cambio de absorbancia. En la figura 5.1 se muestra una gráfica típica.

5.3. Análisis de los resultados

Es conveniente, antes de desarrollar esta sección, realizar una aclaración sobre la terminología que será empleada en este trabajo de tesis respecto a los equilibrios ácido-base. Las “formas ácido-base” de una sustancia son especies químicas que difieren entre sí en la carga neta de la molécula en una unidad. A la de mayor carga se la llamará, en adelante, “forma ácida” (AH^n) y a la de menor carga se la denominará “forma alcalina” ($A^{(n-1)}$). Obviamente, la primera posee un hidrógeno más que la segunda en el grupo ionizable y el equilibrio entre ambas puede representarse mediante la siguiente reacción.



La constante de equilibrio de esta reacción (constante de ionización o constante de disociación ácida) viene dada por la siguiente expresión

$$K_a = [H^+] \cdot [A^{(n-1)}] / [HA^n]$$

5.3.1. Determinación de la constante de ionización mediante un ajuste no lineal.

Sobre consideraciones sencillas basadas en el equilibrio entre dos formas ácido-base de una sustancia puede deducirse una ecuación que vincula la absorbancia de la solución, a determinada longitud de onda, con el pH. A continuación se muestra la ecuación empleada y en la sección siguiente se muestra su deducción.

$$A_T = 10^{-4} \cdot \{ b + (a - b) \cdot [K_a / (K_a + 10^{(-X)})] \} \quad (1)$$

donde A_T es la absorbancia de la solución a una dada longitud de onda; a y b son los coeficientes de extinción molar, a dicha longitud de onda, de las formas alcalina y ácida respectivamente; K_a es la constante de ionización del compuesto y x el pH.

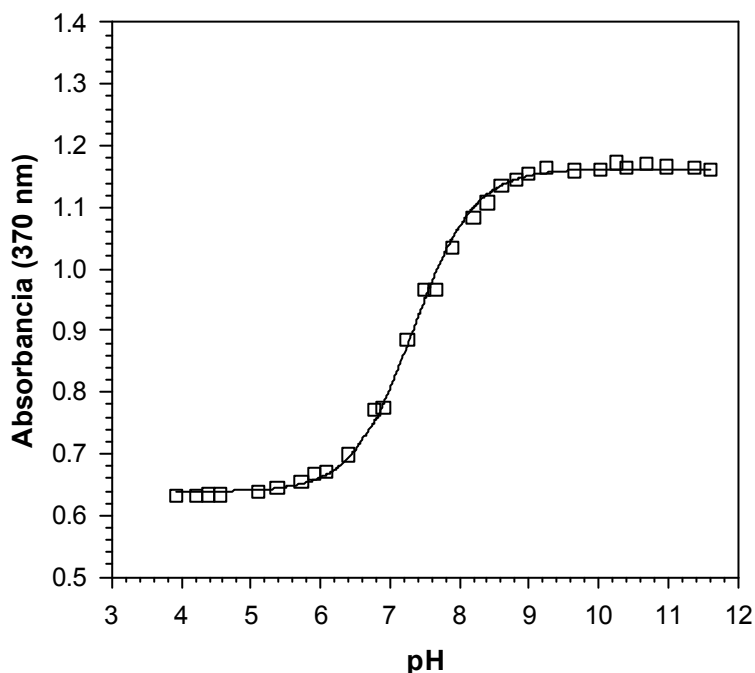


Figura 5.1. Curva de titulación obtenida para 6-formilpterina. Las medidas de la absorbancia fueron realizadas a 370 nm. La línea continua muestra la absorbancia calculada a partir del ajuste no lineal realizado empleando la ecuación 1.

El ajuste no lineal se realizó empleando el programa SigmaPlot, obteniéndose los valores calculados para los parámetros a , b y K_a . En todos los casos se compararon estos

valores con los obtenidos mediante el método gráfico. En este último método, los valores de a y b se calculan a partir de las asíntotas de la gráfica y K_a es igual al valor de pH que corresponde a la absorbancia obtenida promediando los valores de absorbancia de las asíntotas.

5.3.2. Deducción de la ecuación (1).

Esta ecuación permite plantear la absorbancia total de la solución (A_T), a una determinada longitud de onda, como una función del pH. Considerando que las únicas especies que absorben luz en la región del espectro analizada son las formas ácida y básica de la molécula cuya constante de ionización se quiere averiguar, se pueden plantear las siguientes ecuaciones.

$$A_{HA} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] \quad (2)$$

$$A_{A^-} = \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (3)$$

$$A_T = A_{HA} + A_{A^-} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (4)$$

Por razones de comodidad se usará HA para representar a la forma ácida y A^- para representar a la forma alcalina. Por consiguiente A_{HA} y A_{A^-} son las absorbancias de las formas ácida y alcalina respectivamente, ϵ_{HA} y ϵ_{A^-} son los coeficientes de extinción molar de las formas ácida y alcalina, respectivamente y, por último, $[HA]$ y $[A^-]$ son las correspondientes concentraciones molares. Como se mencionó anteriormente la expresión para la constante de ionización (K_a) es:

$$K_a = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad (5)$$

Además se define la concentración total o analítica (C) como la suma de las concentraciones de las dos formas ácido-base.

$$C = [HA] + [A^-] \quad (6)$$

despejando $[HA]$ de (6) y reemplazándolo en (4) se obtiene

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (7)$$

despejando $[HA]$ de (6), reemplazándolo en (5) y luego despejando $[A^-]$ se obtiene una expresión que relaciona $[A^-]$ y C .

$$[A^-] = C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (8)$$

reemplazando esta expresión (8) en (7) se obtiene

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - C \cdot K_a / (K_a + [H^+])) + \epsilon_{A^-} \cdot C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (9)$$

reordenando,

$$A_T = C [\epsilon_{HA} \cdot (1 - K_a / (K_a + [H^+])) + \epsilon_{A^-} \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} - \epsilon_{HA} \cdot K_a / (K_a + [H^+]) + \epsilon_{A^-} \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + [H^+])] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + 10^{-pH})] \quad (10)$$

reemplazando en la ecuación (10) C por 10^{-4} , que es la concentración que se usó en las titulaciones, ϵ_{HA} por a, ϵ_{A^-} por b y pH por X, se llega a la ecuación (1).

Capítulo 6.

Fotólisis estacionaria.

Con el objeto de estudiar las reacciones fotoquímicas que sufren el ácido fólico y las pterinas, se iluminaron soluciones acuosas que contenían a las mencionadas sustancias como solutos con luz UV-A. Para ello, se emplearon dos tipos de irradiación: continua y pulsada. Este capítulo se ocupa del primero, que fue el más extensamente empleado en los experimentos de este trabajo de tesis y se posterga la descripción del segundo tipo de irradiación para el capítulo 8.

La irradiación continua implica la iluminación de la muestra con luz proveniente de una lámpara de intensidad constante y durante períodos largos de tiempo. Esta última condición es en referencia a la duración de la iluminación en las técnicas de fotólisis de flash, en las cuales el flash de luz puede durar desde el orden de los pocos milisegundos hasta menos de un nanosegundo, de acuerdo a la técnica específica empleada.

Los experimentos en los cuales se estudia una reacción fotoquímica inducida por irradiación continua se denominan genéricamente fotólisis continuas. Esta convención será respetada en este trabajo; de esta manera, cuando se mencione, por ejemplo, “la fotólisis continua del ácido fólico” se estará haciendo referencia a los experimentos en los cuales el ácido fólico es convertido en fotoproductos mediante la irradiación continua de luz.

6.1. Esquema general de la metodología.

La metodología general empleada en cada uno de los experimentos de fotólisis continua puede resumirse en cuatro etapas básicas que están representadas en la figura 6.1 y son las siguientes.

1. Preparación y control de la solución a irradiar.
2. Irradiación de la muestra durante distintos períodos de tiempo.
3. Estudio de las soluciones irradiadas mediante técnicas analíticas.
4. Análisis de los resultados.

Las dos primeras etapas serán analizadas en las siguientes secciones, mientras que las dos últimas serán expuestas en el capítulo siguiente.

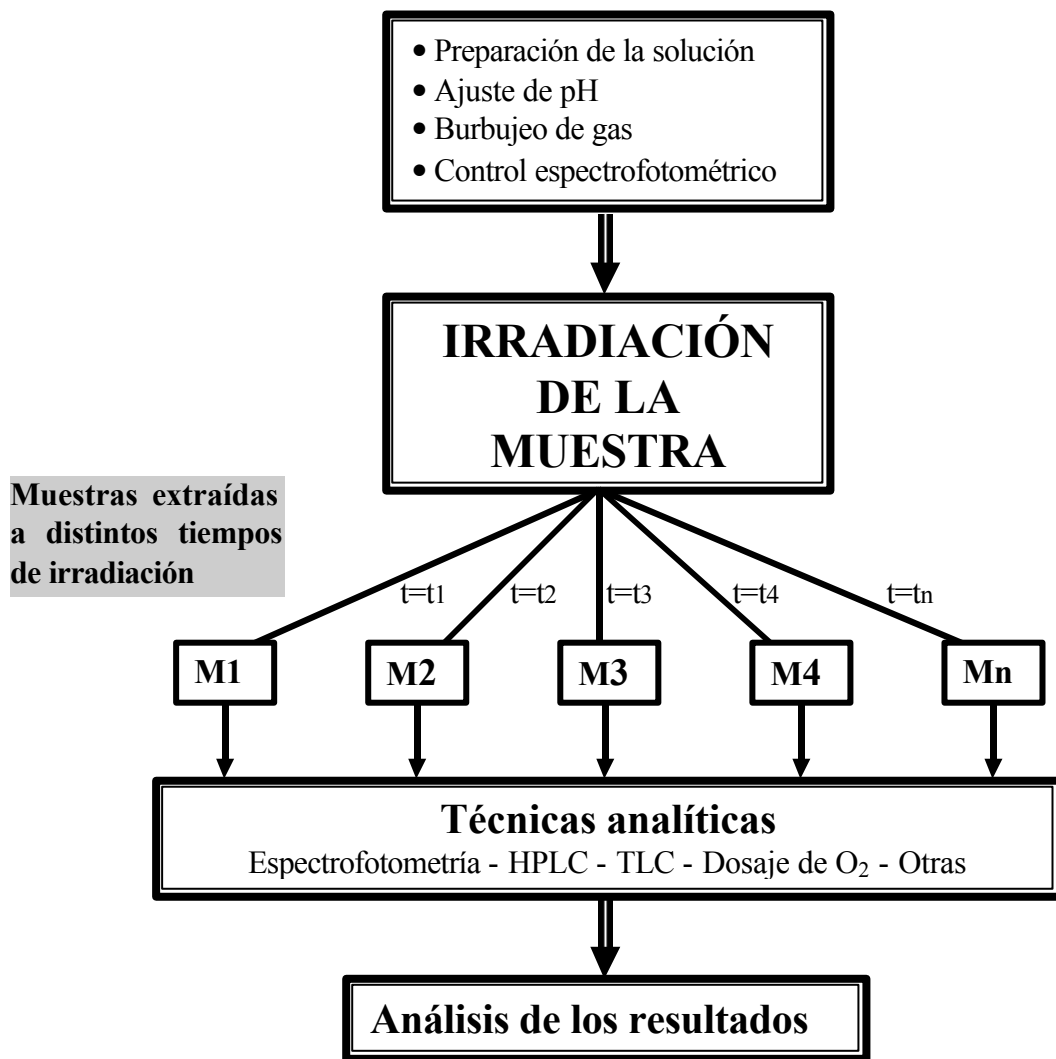


Figura 6.1. Esquema general de la metodología empleada en las fotólisis continuas.

6.2. Preparación de las soluciones a irradiar.

La preparación propiamente dicha de las soluciones, se realiza tal como se explicó en

la sección 5.1. Sin embargo, de acuerdo a las necesidades del experimento a realizar, la solución puede someterse a ulteriores modificaciones, tal como se explicará más adelante en esta misma sección. En particular, es de gran importancia el ajuste del pH debido a que las pterinas y el ácido fólico, como ya fue mencionado, presentan distintas formas ácido-base que, como se expondrá más adelante, difieren entre sí en su comportamiento fotoquímico. Esta operación se lleva a cabo mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones de Na(OH) y HCl y sin el empleo de soluciones reguladoras. Esta última condición debió respetarse debido a los resultados de algunos experimentos en los cuales se observaron procesos de desactivación (quenching) de fluorescencia de varias pterinas por aniones (Lorente et al, 2000). Entre las pterinas sobre las cuales se hicieron estos estudios están la pterina, la 6-carboxipterina y la 6-formilpterina. Los fosfatos y el acetato están entre los aniones detectados como desactivadores (quenchers). El cloruro, por su parte, no presenta este efecto, aún en concentraciones mucho más altas que las empleadas para los ajustes de pH.

La concentración es otro de los parámetros que se tuvo en cuenta en la preparación de las soluciones. En muchos casos se detectaron reacciones fotoquímicas secundarias, por lo cual, cuando fue posible, se trabajó a concentraciones del soluto que se quiere estudiar lo suficientemente altas como para que absorba más del 99,9% de la luz incidente. En estas condiciones la luz que reciben los productos de la reacción es despreciable durante un cierto período de tiempo, lográndose, de esta manera evitar la formación de productos secundarios. En definitiva, el resultado de trabajar en estas condiciones es tener durante este lapso una sola reacción fotoquímica y, si los fotoproductos no participan en reacciones térmicas, una sola reacción química. De esta manera, se obtienen soluciones irradiadas con menos cantidad de sustancias lo cual facilita el análisis de los resultados y la obtención de parámetros de la reacción estudiada.

Muchos experimentos fueron realizados con soluciones libres de O₂ para determinar si este gas participaba en la correspondiente reacción fotoquímica. Para eliminar el O₂ se colocaron las soluciones en celdas de cuarzo con llaves que permiten un cierre hermético. Las muestras fueron burbujeadas con N₂, de la máxima pureza accesible en el mercado, a través de una delgada manguera de teflón que pasaba por el robinete de la citada llave.

Una vez preparada la solución a irradiar y antes de iniciar cada experimento se procedió al control espectrofotométrico de la misma. Se tomó un espectro de absorción UV-visible de la solución y se lo comparó con espectros patrones, controlando la posición de los

máximos y mínimos de absorción; además se controló que la intensidad de las bandas fuera la correcta considerando la concentración. Como espectros de referencia se tomaron los de las titulaciones espectrofotométricas explicadas en el capítulo 5.

La mayor parte de los experimentos fue realizada empleando soluciones de partida que contenían un solo compuesto fotosensible, cuya reacción de fotólisis se quería estudiar. Sin embargo, en algunos experimentos se partió de mezclas pues se quería analizar, por ejemplo, si la presencia de uno de ellos influía en la reacción de fotodescomposición del otro. Como norma general para estos casos, las soluciones correspondientes a cada soluto fueron preparadas y controladas previamente, luego se procedió a mezclarlas y finalmente se controló que el espectro de la solución resultante fuera, la suma de los espectros de los solutos por separado.

Se encontró que la estabilidad de las soluciones en la oscuridad difiere mucho de un compuesto a otro. Sin embargo, en todos los casos se observó que las soluciones alcalinas son más estables que las ácidas. Respecto a la temperatura se comprobó que todas son estables indefinidamente mantenidas congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ menos la 6-formilpterina, la cual se descompone cuando la solución se congela. Se utilizó el espectro de absorción como criterio para decidir sobre la calidad de una solución que no fue preparada en el día de trabajo.

6.3. Condiciones de irradiación.

La irradiación de las soluciones se realizó con una lámpara Rayonet Photochemical Reactor Lamp, RPR 3500 A de la Southern N. E. Ultraviolet Co. Esta lámpara emite luz de 350 nm con un ancho de banda de unos 20 nm. En la figura 6.2 se muestra un esquema del dispositivo empleado para la irradiación de las soluciones.

Las soluciones contenidas en las celdas se agitaron mediante un agitador magnético para evitar la acumulación de los fotoproductos en la zona cercana a la cara irradiada. El tiempo de irradiación fue medido con un cronómetro de disparo manual a partir del instante en que se enciende la lámpara.

La geometría del dispositivo se mantuvo sin modificaciones dentro de cada experimento. Además se mantuvo la distancia entre la celda y la lámpara constante entre experimentos para una mejor comparación de los resultados.

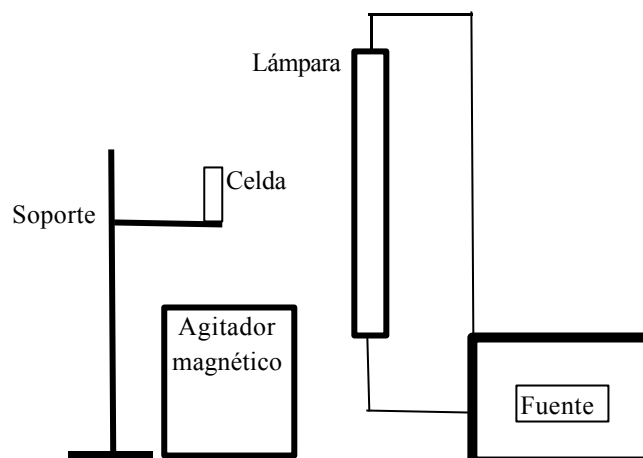


Figura 6.2. Esquema del dispositivo empleado para realizar las fotólisis continuas.

Como se esquematizó en la figura 6.1, a distintos tiempos de irradiación se extrajeron muestras para ser analizadas. Con este fin se adoptaron tres procedimientos generales que se detallan a continuación.

- Medidas realizadas sobre la misma alícuota de solución original: La solución se introduce en la celda, se la irradia durante un cierto tiempo, se apaga la lámpara y se realiza la medida. Posteriormente se vuelve a encender la lámpara, se irradia la muestra durante otro período, etc. Se procede así, sucesivamente irradiando y analizando la solución irradiada sin sacarla de la celda. Se procedió de esta manera en los estudios espectrofotométricos de las reacciones y en las determinaciones electroquímicas de O_2 . En este último caso no es necesario interrumpir la iluminación de la muestra.
- Medidas realizadas sobre distintas alícuotas de la solución original: Se introduce una alícuota de la solución en la celda, se irradia durante un tiempo y, por último, se retira la totalidad de la muestra para ser procesada. Se vuelve a cargar la celda y se repite la operación irradiando un tiempo distinto esta vez, o el mismo tiempo si lo que se quiere es repetir el análisis con el mismo tiempo. Típicamente el volumen de cada muestra estuvo entre 3 y 4 ml que es la capacidad de las celdas usadas. Este procedimiento se empleó para análisis cromatográfico de las soluciones (TLC y HPLC).
- En algunos experimentos particulares la irradiación se llevó a cabo sobre un mayor volumen de muestra; por ejemplo, 15 ml colocados en un tubo de ensayo. En estos casos se fueron tomando porciones de la solución a distintos tiempos de irradiación. Es decir, se usa una única alícuota de la cual se van extrayendo alícuotas menores para ser analizadas. El

volumen de muestra va disminuyendo al avanzar la fotólisis. Se recurrió a este procedimiento para la determinación colorimétrica de aldehídos y en algunos casos experimentos puntuales de HPLC.

6.4. Determinación del rendimiento cuántico de una reacción.

Si se tiene una solución en la cual la única especie química que absorbe luz, a determinada longitud de onda, es un soluto, la ley de Lambert y Beer puede expresarse, con la siguiente ecuación:

$$I_A = I_0 (1 - 10^{-\epsilon \cdot l \cdot C}) \quad (1)$$

donde I_A es la intensidad de la luz absorbida por el soluto que se encuentra a concentración molar C , I_0 es la intensidad de la luz incidente. I_A y I_0 se expresan en fotones por unidad de tiempo. ϵ es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de irradiación y l es el camino óptico.

En fotoquímica es útil un parámetro que puede definirse como el número de fotones por unidad de tiempo y por unidad de volumen que son absorbidos por una muestra y que se representará como I_a . Si V es el volumen de la solución, la relación entre I_A e I_a viene dada por la siguiente ecuación.

$$I_a = I_A / V \quad (2)$$

El rendimiento cuántico de una reacción fotoquímica puede ser definido como el cociente entre el número de moléculas que reaccionan y el número de fotones absorbidos. Este parámetro será representado por la letra Φ .

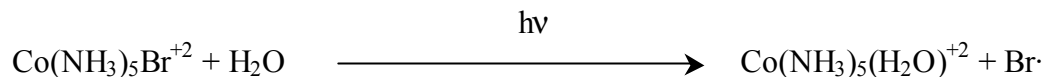
Si se mide la velocidad de desaparición de un reactivo o la velocidad de aparición de un producto puede calcularse el rendimiento cuántico de una reacción mediante las siguientes ecuaciones.

$$\Phi_R = \frac{-d[R]/dt}{I_a} \quad (3) \qquad \Phi_P = \frac{d[P]/dt}{I_a} \quad (4)$$

Las velocidades de $d[R]/dt$ y $d[P]/dt$ (puede haber más de un reactivo o producto de reacción) se calculan en base a las medidas analíticas realizadas sobre las soluciones irradiadas a distintos tiempos. Estos procedimientos se discutirán más adelante. El otro parámetro que es necesario determinar es I_a , para lo cual es imprescindible conocer I_0 ó I_0^V , la

intensidad de luz incidente por unidad de volumen (I_0 / V).

Este último parámetro puede calcularse empleando un actinómetro químico. En este caso se usó, para tal fin, una solución de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Br}]\text{Br}_2$, preparada en NaBr 0,01 M y HClO_4 0,01 M para evitar la hidrólisis. El complejo de Co(III) presente en este compuesto sufre la siguiente reacción al ser irradiado (Ferraudi, 1988):



El $\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})^{+2}$ termina descomponiéndose al correspondiente hexa-aquacomplejo de Co(II) cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente formando un complejo con el anión SCN^- . El rendimiento cuántico para la fotoreducción del complejo de Co(III) (Φ_{Co}) está reportado en literatura con un valor de 0,243 a 350 nm (Endicott, 1975).

Se cargó la celda donde luego se realizarían las fotólisis con el actinómetro y se irradió esta solución durante un cierto tiempo t . Posteriormente se determinó la concentración de Co(II) y se calculó I_a con la siguiente relación que puede derivarse de la ecuación (3):

$$I_a = \frac{[\text{Co(II)}]}{\Phi_{\text{Co}} \cdot t}$$

Si más del 99,9% de la luz es absorbida por el actinómetro durante el período de tiempo de la irradiación, puede suponerse que I_a es aproximadamente igual a I_0^v . De lo contrario, se realiza el cálculo correspondiente empleando la ecuación (1).

Resulta obvio que I_0^v depende de factores geométricos, tales como la distancia de la lámpara a la celda, las dimensiones de la celda misma, etc. Por esta razón en todos los experimentos en los cuales se empleó el valor de I_0^v para calcular rendimientos cuánticos la geometría del sistema se mantuvo igual a la del experimento de actinometría.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos de una determinada reacción se emplearon, cuando fue posible, soluciones que absorbieran prácticamente la totalidad de la luz incidente. De esta manera, conociendo el ϵ a 350 nm de la sustancia que se va a irradiar, se eligen condiciones experimentales tales que $\epsilon \cdot l \cdot C \gg 1$ lo que conduce a que, según la ecuación (1), $I_a \cong I_0$. Bajo estas condiciones I_a puede reemplazarse por I_0^v en las ecuaciones (3) y (4).

Las velocidades de consumo de reactivos y generación de productos fueron obtenidas a partir de las pendientes de las curvas de concentración en función del tiempo de irradiación.

A continuación se explicará qué criterios fueron considerados para calcular dichas velocidades. Sin embargo, recién en el capítulo siguiente se detallará cómo se determinaron las concentraciones en las soluciones irradiadas.

Para obtener las velocidades se tomaron intervalos de tiempo en los cuales se cumplieran dos condiciones. Por un lado, que la cinética de la reacción sea de orden 0 (velocidad constante). Con esto se pretende que la cantidad de luz absorbida por unidad de tiempo sea aproximadamente constante. Por otro lado, que la absorbancia de los productos a 350 nm sea despreciable respecto a la del reactivo. Esta segunda condición asegura que pueda considerarse que la luz absorbida por la solución es la luz absorbida solo por el reactivo y, por ende la ecuación (1) tiene validez. Puede concluirse rápidamente que estas dos condiciones no son independientes sino que, por el contrario están fuertemente relacionadas.

Cuando un determinado experimento de fotólisis avanza el reactivo se consume a la vez que los fotoproductos se acumulan. Esto conduce a que las condiciones previamente establecidas dejen de cumplirse. Cuando esto ocurre, en general, se observa una disminución en la velocidad de consumo de reactivo y, una situación análoga se observa para los productos que son fotoestables, o por lo menos, menos fotosensibles que el reactivo.

A modo de ejemplo obsérvese la figura 6.3; en ella se muestra la evolución de la concentración del fotoproducto (6-carboxipterina) durante un experimento de fotólisis de 6-formilpterina. Se puede distinguir un primer período en el cual se observa una cinética de orden 0 y, posteriormente, un segundo período en el cual se observa una disminución de la pendiente. Para el cálculo del rendimiento cuántico, se emplearon sólo los datos de la primera fase, prácticamente correspondientes a condiciones de velocidad inicial. La línea continua es la regresión lineal realizada con los resultados obtenidos en la primera fase.

Para concluir, los experimentos en los cuales se determinaron los rendimientos cuánticos de las distintas reacciones estudiadas fueron diseñados de tal manera, que el período en el cual se cumplen las condiciones previamente mencionadas fuera lo suficientemente largo como para poder realizar un número adecuado de medidas de concentración. Por otro lado, se trabajó en condiciones experimentales tales que permitieran satisfacer la condición $I_a \cong I_0^V$, dentro del error experimental. Es evidente que trabajando con soluciones de partida lo más concentradas posible se cumplen las condiciones citadas.

Sin embargo, el límite superior de concentración está determinado por la solubilidad del soluto y varía mucho entre los distintos compuestos empleados. El ácido fólico y la

6-carboxipterina que tienen sustituyentes ionizados son más solubles que otras pterinas que no los poseen. Además la solubilidad depende del pH. En general, en soluciones alcalinas donde el doble anillo pterínico posee el grupo ceto de la posición 4 ionizado como fenolato las pterinas son más solubles.

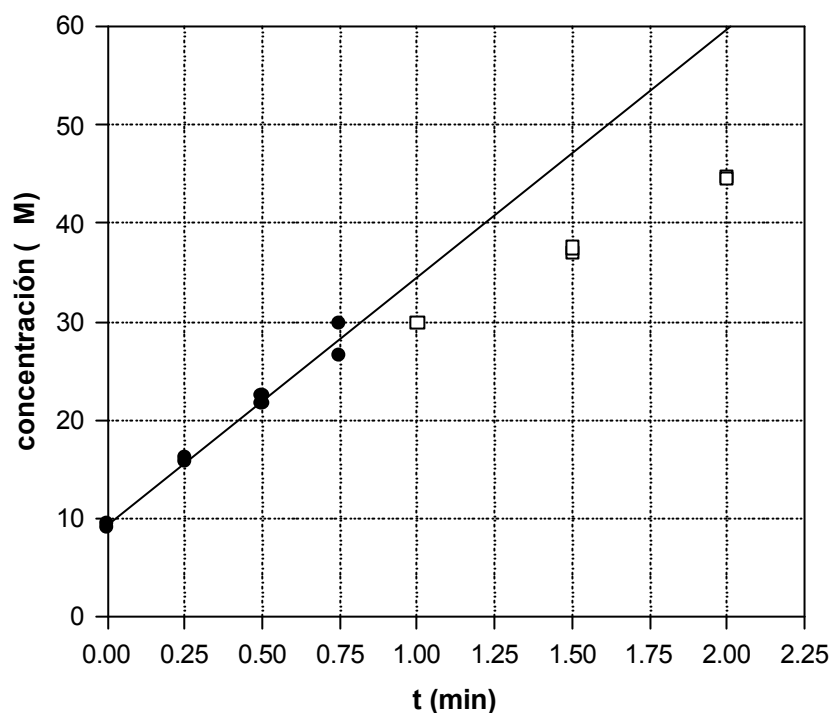


Figura 6.3. Evolución de la concentración de producto (6-carboxipterina) durante la fotólisis de 6-formilpterina. Se puede distinguir un primer período () en el cual se observa una cinética de orden 0 y, posteriormente, una disminución de la pendiente (). La línea representa la regresión lineal realizada con los datos de la primera fase.

Capítulo 7.

Análisis de las soluciones irradiadas

Como se adelantó en el capítulo anterior, en éste se describirán las técnicas utilizadas para analizar las soluciones irradiadas. Entre ellas por la utilidad y calidad de la información obtenida se destacan cuatro: espectrofotometría, cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y medida electroquímica del O₂ disuelto. La forma específica en que fue aplicada cada una de estas técnicas se explica en cuatro secciones separadas. Al final del capítulo se mencionan otras técnicas empleadas de importancia menor.

7.1 Consideraciones generales.

Básicamente la metodología que se expondrá en este capítulo persiguió tres objetivos principales, los cuales se analizan a continuación por separado.

- *Identificación de productos de reacción:* Los patrones comerciales de las sustancias cuya fotólisis fue estudiada, así como muchos de los potenciales productos de reacción son accesibles comercialmente. El ácido fólico fue provisto por Merck, pterina, ácido *p*-aminobenzoico y 6-carboxipterina por Sigma-Aldrich. Schircks Laboratories es una empresa Suiza dedicada especialmente a la síntesis de pterinas y sustancias relacionadas. De este laboratorio fueron obtenidos patrones de pterina, 6-formilpterina, 6-carboxipterina, 6-metilpterina, 6-hidroximetilpterina, biopterina, leucopterina, xantopterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Todos estos reactivos presentan una pureza de más del 98% y fueron utilizados sin ulteriores tratamientos de purificación.

Las soluciones preparadas con los distintos patrones, las cuales serán llamadas

soluciones patrón, fueron analizadas con las técnicas disponibles. La comparación de estos resultados con los obtenidos sobre las soluciones irradiadas permitió, en muchos casos, la identificación de fotoproductos.

- *Caracterización de productos de reacción.* Se encontró, en ciertos experimentos, que los resultados de los análisis realizados sobre las soluciones irradiadas no podían adjudicarse a ninguno de los patrones disponibles. Esto permitió descartar ciertas vías de descomposición. Asimismo estos resultados fueron usados para caracterizar fotoproductos que no pudieron ser identificados. De esta manera, se pudo especular sobre ciertas características químicas de los mismos.
- *Cuantificación de productos de reacción.* Se determinó la concentración de las distintas sustancias involucradas en las reacciones estudiadas empleando, fundamentalmente, medidas realizadas por HPLC. Se prepararon soluciones patrón de concentración conocida a partir de las cuales se realizaron las correspondientes curvas de calibración. En algunos casos especiales se logró medir la concentración mediante técnicas espectrofotométricas. La concentración de O₂ fue determinada empleando un electrodo sensible al mismo.

A partir de todas estas determinaciones se obtuvo, para las fotólisis estudiadas, la evolución de la concentración de diversas sustancias involucradas en las mismas. El análisis de estos perfiles de concentración permitió el cálculo de los rendimientos cuánticos, a la vez que, en algunos casos, permitió realizar consideraciones cinéticas y dilucidar aspectos de los mecanismos de reacción.

7.2. Espectrofotometría.

7.2.1. Introducción.

Los espectros de absorción fueron tomados con el equipo y técnica descritos en la sección 5.2. La metodología básica que se aplicó empleando esta técnica consiste en tomar a distintos tiempos de la fotólisis espectros de absorción de la solución irradiada.

El análisis directo de estos datos permite decidir, en primer lugar, si existen cambios espectrales o no. En caso afirmativo, esto implica que hay cambio químico en la solución y, por ende, se ha producido una reacción fotoquímica. En caso negativo, es muy probable que el o los solutos presentes en la solución de partida sean fotoestables. Esto es así porque las

pterinas poseen espectros muy sensibles a los cambios químicos en sus moléculas. Por ejemplo, en los estudios realizados con las soluciones de los patrones comerciales no se han detectado dos derivados pterínicos que posean espectros indistinguibles. Tampoco se encontró ningún caso en el cual durante la fotólisis no se detectaron cambios espectrales y luego se hayan detectado cambios químicos a través del análisis por otras técnicas.

Como se mencionó en la sección 6.2 muchos experimentos se realizaron en condiciones tales que, durante una primera etapa de la fotólisis, el reactivo absorbía casi toda la luz incidente. Es decir, que la absorbancia de la solución en ciertas zonas del espectro fue muy elevada. Esto implica que, en tales condiciones experimentales, no se puede tomar un espectros de absorción directamente de la celda irradiada. En efecto, las medidas de absorbancias mayores que 2,5, realizadas con el espectrofotómetro empleado, contienen cierto error producto de desviaciones a la ley de Lambert-Beer. Por encima de 3, las medidas son inaceptables.

Para solucionar este problema se recurrió a una celda doble, compuesta por dos celdas simples de cuarzo de distinto camino óptico. Un esquema de este dispositivo óptico puede apreciarse en la figura 7.1. El mismo consta de una celda de 1 cm de espesor donde se coloca la solución mientras es irradiada y, otra, de 0,2 cm de espesor a la cual se trasvasa parte de la solución para poder obtener los espectros, luego de lo cual se pasa la solución nuevamente a la celda de mayor camino óptico para ser irradiada nuevamente. En el texto y, en particular en las leyendas de las figuras que muestren resultados de experimentos realizados empleando este dispositivo óptico, se distinguirá entre camino óptico de irradiación y camino óptico de observación. Esta celda doble contiene, además, una llave que permite evitar el intercambio gaseoso durante la fotólisis.

Con estos datos se realizaron gráficas de absorbancia versus tiempo para distintas longitudes de onda. El análisis de estas gráficas permite evaluar algunos aspectos cinéticos del proceso estudiado. Por ejemplo, observar si existe una primera etapa en la cual la velocidad de la reacción es constante, detectar en qué momento se producen cambios en las pendientes, comparar si el comportamiento cinético es similar a distintas longitudes de onda de observación, etc. Estos análisis fueron realizados para todas las reacciones estudiadas. A modo de ejemplo, obsérvese la figura 7.2 donde se representa, a distintas longitudes de onda, los cambios registrados como una función del tiempo en un experimento particular cuyas condiciones se indican al pie de esa figura. No obstante, estas representaciones gráficas no

serán incluidas en la discusión de cada fotólisis, a menos que se considere estrictamente, necesario para no extender demasiado dichas secciones.

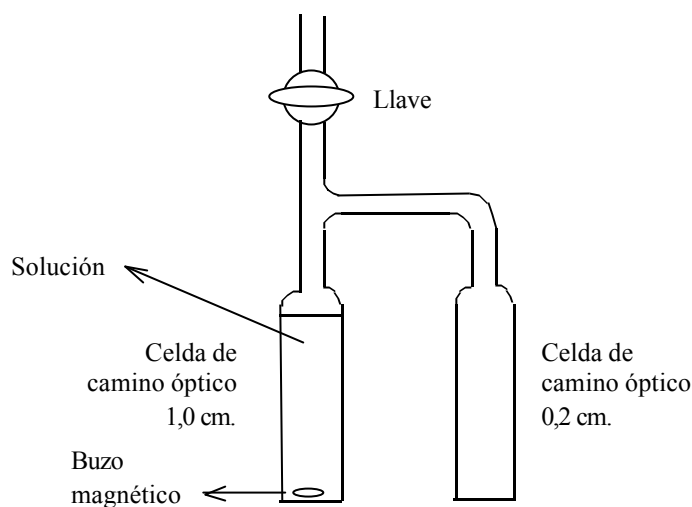


Figura 7.1. Celda empleada para observar la evolución de los espectros durante las fotólisis continuas.

Por otro lado, con los espectros de absorción tomados a distintos tiempos de fotólisis se obtuvieron los espectros diferencia experimentales (que serán llamados espectros DE o, simplemente, EDE). Se procedió de la siguiente manera: a cada espectro absoluto obtenido durante una fotólisis ($E(t=t_n)$) se le resta el espectro absoluto obtenido antes de irradiar ($E(t=0)$). Por ejemplo:

$$EDE(t=t_1) = E(t=t_1) - E(t=0)$$

Cabe aclarar que esta operación, realizada con espectros, implica restar para cada longitud de onda la absorbancia de $E(t=0)$ a la absorbancia de $E(t=t_1)$. En definitiva, para cada fotólisis se obtiene una serie de espectros diferencia, un espectro por cada tiempo distinto de 0 en el que fue analizada la solución ($EDE(t=t_n)$, con $n= 1,2,3,\dots$).

Los espectros absolutos y los espectros DE obtenidos en una determinada fotólisis se graficaron y analizaron. Fundamentalmente en este análisis se tuvo en cuenta la presencia y constancia en el tiempo de puntos isobésticos. Está claro que, mientras ocurra un único proceso, se mantendrán constantes los puntos isobésticos. “Único proceso” no implica, en este caso, una reacción que ocurra en una sola etapa, ni siquiera una única reacción. Por el contrario, implica la generación de productos en proporciones constantes. Por ejemplo,

supongamos que un determinado reactivo se descompone fotoquímicamente por dos vías de la siguiente manera:

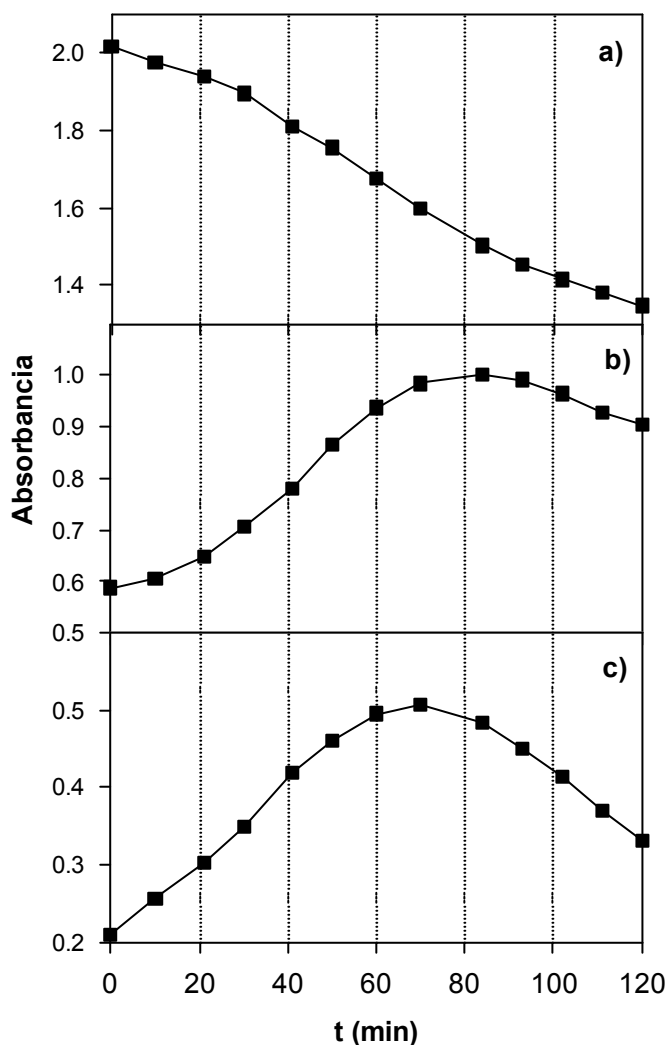
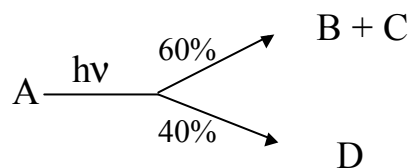


Figura 7.2. Fotólisis de una solución de ácido fólico (450 M, pH=11). Absorbancia en función del tiempo de irradiación. Camino óptico 2 mm. a) 295 nm. b) 325 nm. c) 400 nm.

Mientras se mantenga este esquema de reacción se considera que existe un único proceso (fotólisis primaria). Es decir, mientras sólo existan estas dos reacciones de descomposición fotoquímica, cada una con una estequiometría fija, mientras la proporción de reactivo descompuesto a través de cada vía se mantenga constante. Por otra parte, esta

definición no podrá aplicarse si aparecen otras vías de descomposición del reactivo (por ejemplo, por reacción con alguno de los productos) o si aparecen reacciones fotoquímicas secundarias (fotólisis secundaria) en las cuales se degraden los productos. Esta definición de “único proceso”, si bien arbitraria, resulta útil y será empleada con este sentido en el resto del trabajo de tesis.

En las figuras 7.3 y 7.4 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en una fotólisis del ácido fólico en medio ácido. En la figura 7.3.a se observan los espectros de absorción absolutos tomados cada 2 minutos durante los primeros 8 minutos. Puede observarse, aunque con cierta dificultad, que existen puntos isobésticos que se mantienen aproximadamente sin variaciones durante este período. En la figura 7.3.b, donde se muestran los correspondientes espectros DE, la constancia de los puntos isobésticos se aprecia mejor. En definitiva, en este ejemplo se observa un único proceso fotoquímico hasta los 8 minutos. En la figura 7.4 puede observarse que luego de este primer período los puntos isobésticos comienzan a cambiar de posición a medida que avanza la fotólisis; además, también cambia la posición de los máximos y mínimos de los espectros DE. Esto indica la aparición de otros procesos.

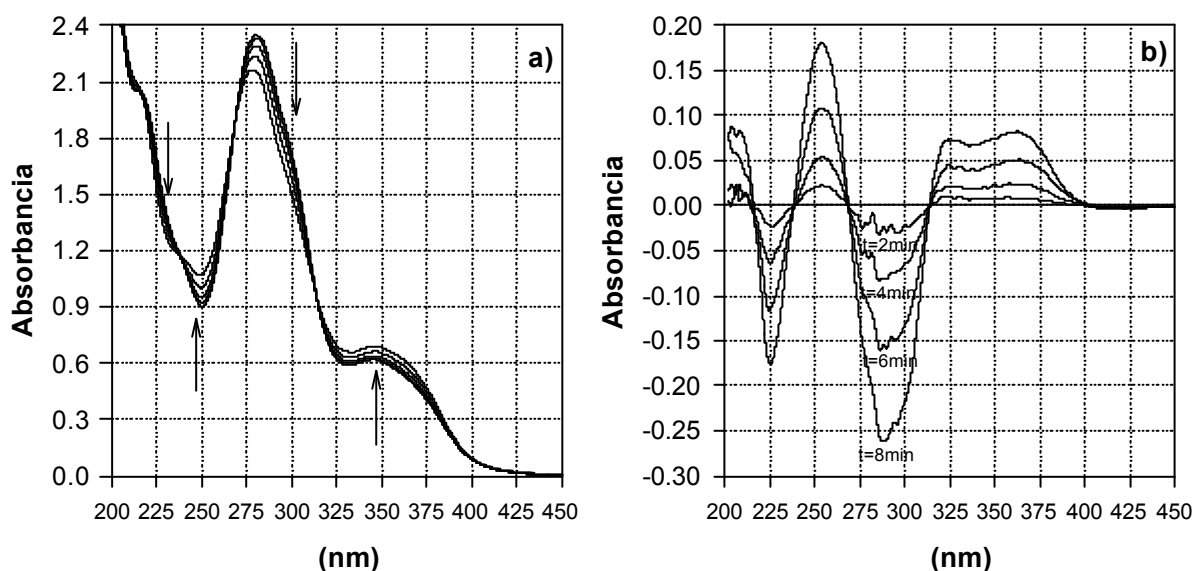


Figura 7.3. Resultados de una fotólisis realizada sobre una solución de ácido fólico (450 M , $\text{pH}=6$). a) Espectros de absorción tomados cada 2 min, camino óptico 0,2 cm. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE obtenidos a los mismos tiempos de irradiación.

Este tipo de análisis es muy útil para evaluar, por ejemplo, en qué momento se

vuelven importantes las reacciones de fotólisis secundaria. De esta manera, se puede poner límite al tiempo de irradiación dentro del cual se harán otros tipos de análisis espectrofotométricos o se aplicarán otras técnicas en los cuales se desea aislar el primer proceso fotoquímico. Más aún, los experimentos cromatográficos, tanto de TLC como de HPLC fueron diagramados teniendo en cuenta, entre otros aspectos, los resultados de estos análisis previos.

Normalizando los espectros DE a distintos tiempos se obtuvieron los correspondientes espectros diferencia experimental normalizados (espectros DEN o, simplemente EDEN). Cabe recordar que normalizar un espectro significa dividir la absorbancia a cada longitud de onda por un número elegido arbitrariamente de acuerdo a la conveniencia de cada caso. En este trabajo, los espectros ED fueron normalizados dividiendo por la absorbancia de uno de sus máximos o mínimos de absorbancia.

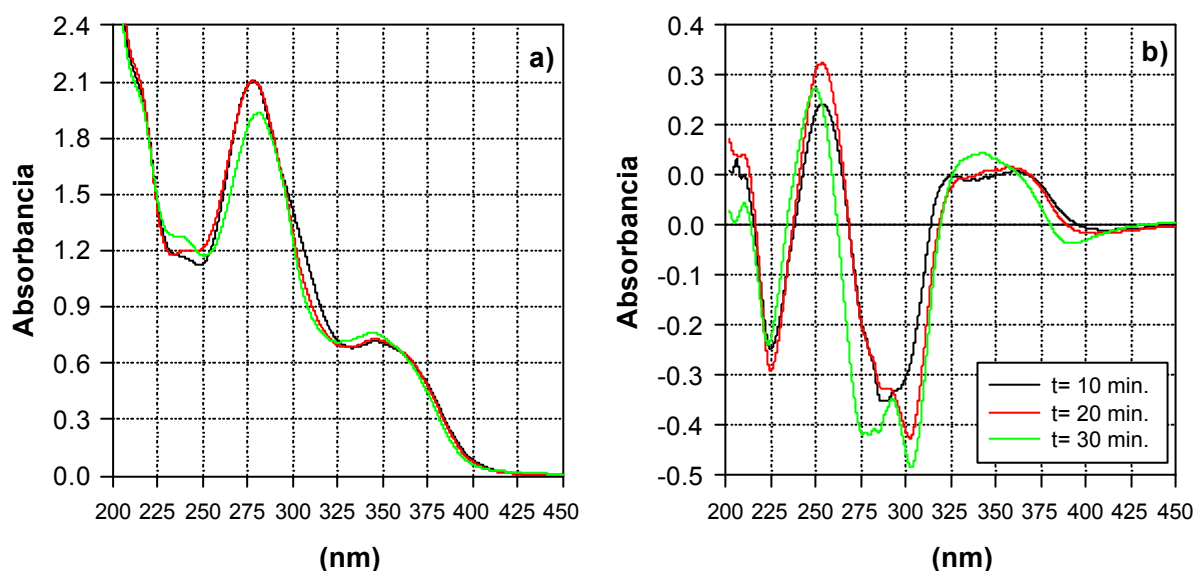


Figura 7.4. Resultados obtenidos en el mismo experimento de la figura 7.3, pero a tiempos de irradiación mayores. a) Espectros de absorción. b) Espectros DE correspondientes.

Si en un período de tiempo, durante una fotólisis, se tiene un único proceso, dentro del error experimental, los espectros DEN a distintos tiempos serán iguales. Por el contrario, serán diferentes si existe más de un proceso. Este es un criterio adicional que se aplicó también para determinar durante cuánto tiempo, dentro de un experimento, podía considerarse la existencia de un único proceso fotoquímico (fotólisis primaria).

A modo de ejemplo, en la figura 7.5 se muestran los espectros DEN correspondientes

a los espectros DE graficados en las figuras 7.3.b y 7.4.b. En la figura 7.5.a se observa que, como era de esperar, los espectros DEN dentro de los primeros 8 minutos son similares entre sí. No obstante, cuando los cambios espectrales son pequeños, la propagación de errores puede afectar los espectros DE y, consecuentemente, los espectros DEN. Esto es particularmente significativo en los primeros estadios de la fotólisis. De esta manera, puede observarse en la figura 7.5.a que uno de estos espectros, el correspondiente a 2 minutos, presenta diferencias considerables con respecto a los demás.

En la figura 7.5.b pueden observarse los espectros DEN correspondiente a tiempos mayores de irradiación. Se aprecia que, a medida que avanza la fotólisis, las diferencias en estos espectros se hace mayor indicando la presencia de otras reacciones que se suman al proceso fotoquímico primario.

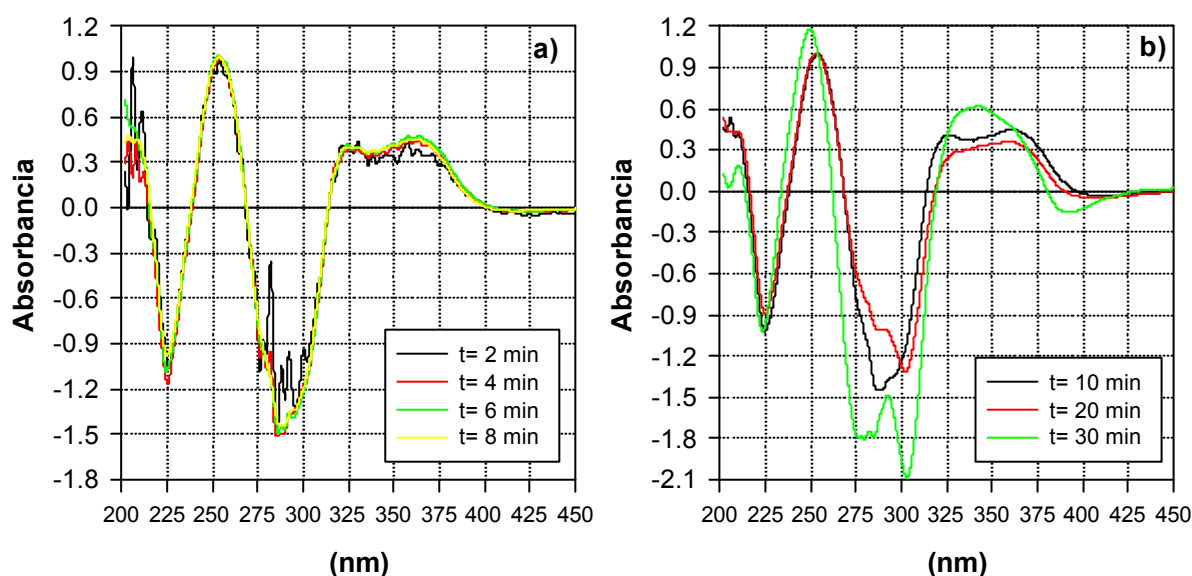


Figura 7.5. a) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 7.3.b. b) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 7.4.b.

7.2.2. Identificación de productos.

En esta sección se expondrá el método aplicado para identificar productos de reacción a partir del análisis espectral. El primer paso de este procedimiento consiste en proponer a una o más sustancias como posibles productos de determinada reacción fotoquímica. Esta hipótesis puede basarse en antecedentes de literatura, en el análisis cualitativo de los cambios espectrales registrados durante la fotólisis o en ambos. Luego de plantear una hipótesis, se registran los espectros de soluciones del reactivo y de la o las sustancias propuestas como

productos. Es importante, si la estequiometría propuesta es 1:1 (caso más común), que las soluciones preparadas para este fin tengan la misma concentración. De no ser así, es imprescindible corregir los espectros para obtener todos los espectros correspondientes a la misma concentración. Finalmente, se resta el espectro de los productos al espectro del reactivo, obteniéndose un espectro diferencia teórico (espectro DT o, simplemente EDT). Este espectro es normalizado para generar el correspondiente espectro diferencia teórico normalizado (espectro DTN o, simplemente EDTN).

Imagínese el siguiente experimento hipotético: por fotólisis, la 6-carboxipterina, presente en una solución 100 μM , se transforma completamente en pterina y CO_2 . Obviamente, el resultado sería una solución 100 μM de pterina (el CO_2 no se considera, pues no absorbe luz en la zona del espectro analizada). Los espectros DE y DEN de este experimento son respectivamente iguales a los espectros DT y DTN, obtenidos de la manera antes indicada. Siguiendo esta línea de razonamiento, puede comprenderse rápidamente que si la transformación del experimento hipotético no fuera completa, es decir, si sólo una proporción de la 6-carboxipterina se transformara en pterina, el espectro DE sería distinto al DT, pero el DEN sería igual al DTN. Teniendo en cuenta ahora los experimentos de fotólisis, puede concluirse que si la reacción estudiada coincide con la reacción propuesta, el espectro DTN debe ser igual, dentro del error experimental, a los espectros DEN obtenidos durante la fotólisis.

Con el fin de proveer un ejemplo experimental, se analizará la descomposición fotoquímica de la 6-carboxipterina en medio alcalino y en ausencia de O_2 . Se propone como producto de la reacción a la pterina. Se obtienen los espectros de absorción de sendas soluciones acuosas de concentración 100 μM (figura 7.6.a). Se resta el espectro de la pterina al de la 6-carboxipterina, obteniéndose el correspondiente espectro DT (figura 7.6.b); el cual, por último, se normaliza (tomando arbitrariamente el valor de la diferencia de absorbancia a 268 nm) lográndose el espectro DTN (figura 7.6.c). Una vez realizado todo este proceso se procede, como se muestra en la figura 7.7, a la comparación de este espectro DTN con los espectros DEN obtenidos a partir de los espectros registrados durante la irradiación de la 6-carboxipterina bajo las condiciones experimentales antes precisadas. Puede apreciarse que estos dos espectros son muy similares. Este resultado es una evidencia a favor de la hipótesis planteada. Esto no descarta la existencia de otras vías de degradación cuantitativamente menores, pero sugiere fuertemente que la principal reacción de fotodescomposición de la

6-carboxipterina, en las presentes condiciones experimentales, es su descarboxilación a pterina. La probabilidad de que la reacción no sea la propuesta, pero que tenga espectros DEN tan parecidos al espectro DTN analizado es muy baja pues, como se dijo, los espectros de absorción de esta familia de compuestos son muy sensibles a pequeñas diferencias químicas en su estructura.

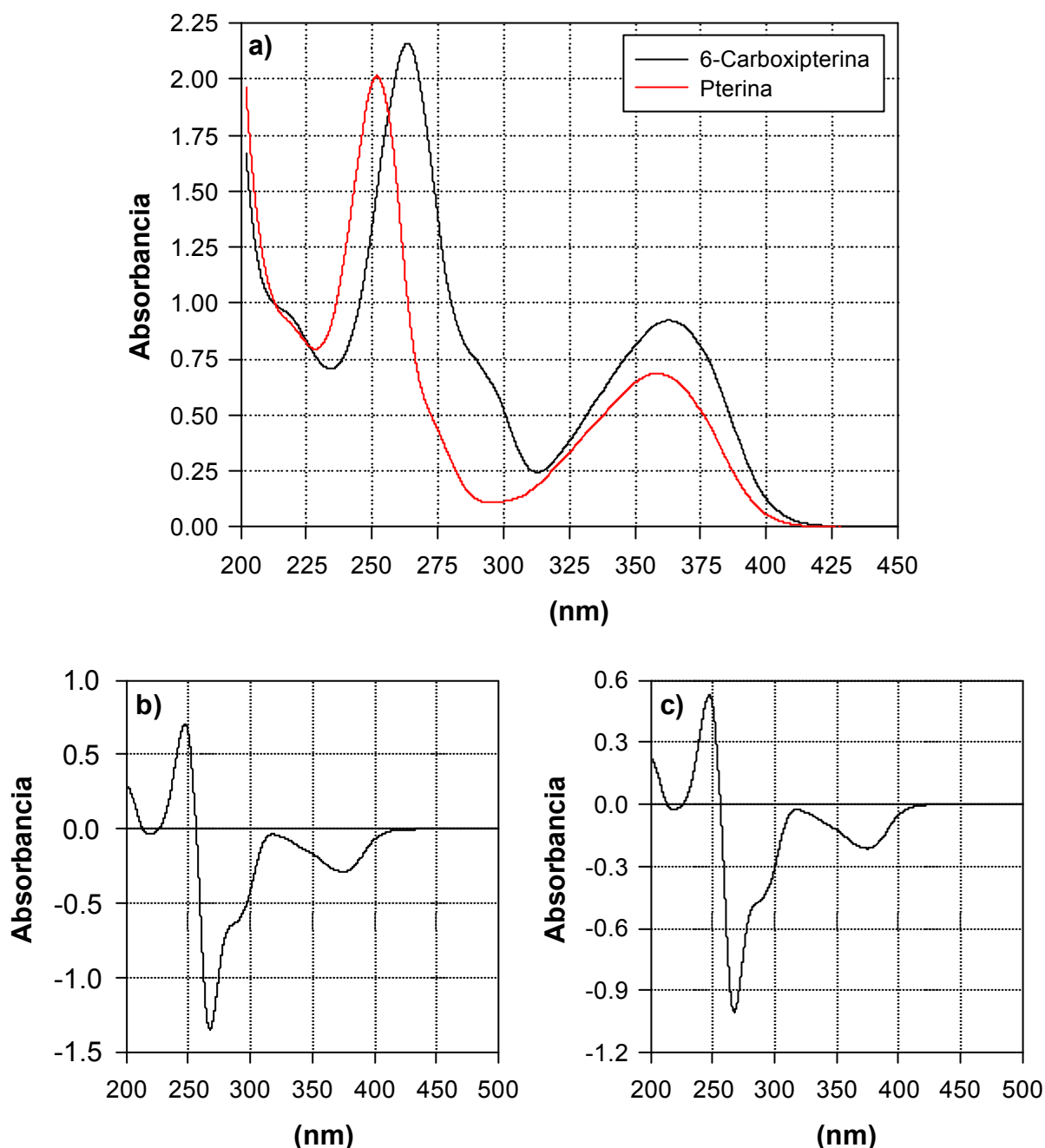


Figura 7.6. a) Espectros de una solución de 6-carboxipterina (100 μ M, pH=11,0) y de una solución de pterina (100 μ M, pH=11,0). b) Espectro DT obtenido a partir de los espectros de a). c) Espectro DTN obtenido a partir del espectro DT.

Teniendo los espectros de las soluciones patrón es fácil combinarlos entre sí, para obtener una serie de espectros DTN, los cuales sirvieron para compararlos con los espectros DEN obtenidos en los experimentos de fotólisis. De esta manera, en muchos casos se logró una primera aproximación en la identificación de diferentes fotoproductos de las transformaciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, siempre se recurrió a la corroboración posterior mediante las técnicas cromatográficas que se describirán en las siguientes secciones. En otros casos, en los cuales los espectros DTN no coincidieron en absoluto con los DEN, este procedimiento sirvió para descartar la presencia de ciertas sustancias como principales productos de reacción. Más aún, como se verá más adelante, existen algunos ejemplos puntuales en los cuales la coincidencia fue parcial, sugiriendo que la reacción propuesta existía, pero que no era la única vía de descomposición del reactivo.

Para concluir, y como puede desprenderse de lo expuesto en esta sección, los análisis detallados de los espectros de absorción, registrados a distintos tiempos de irradiación durante los experimentos de fotólisis continua, fueron de gran utilidad para orientar la identificación de los productos de reacción y diseñar ulteriores experimentos empleando otras técnicas. Debido a esto, esta metodología siempre fue empleada antes que las otras al iniciar el estudio de las distintas reacciones fotoquímicas.

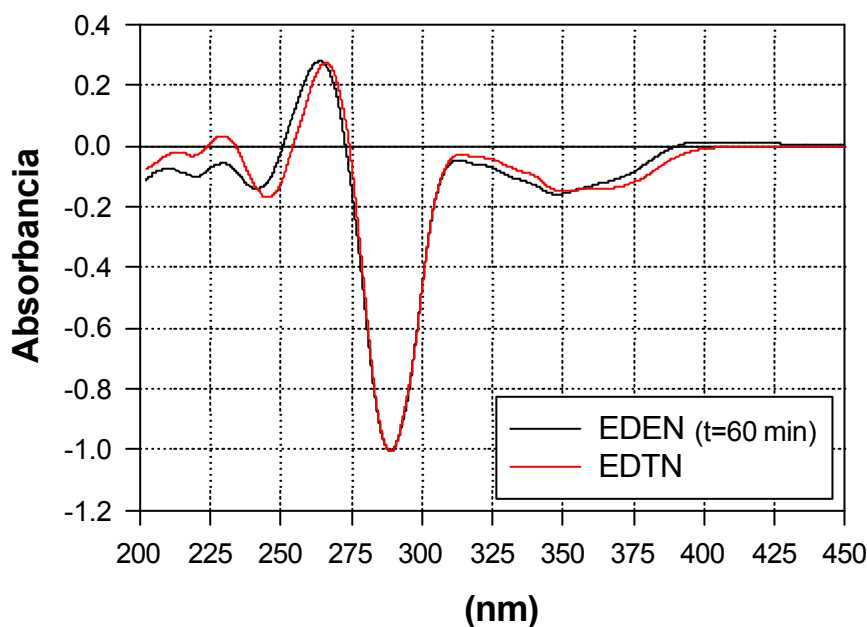


Figura 7.7. Comparación de espectros DEN y DTN para identificar la reacción que ocurre en la fotólisis de la 6-carboxipterina en medio ácido y ausencia de O₂.

7.3. Cromatografía en capa delgada (TLC).

La cromatografía en capa delgada de partición, que es usada habitualmente para separar mezclas de compuestos polares, ha sido reportada como adecuada para la separación de derivados pterínicos (Scott, 1980; McCormack y Newman, 1985). En base a la misma, fueron diseñados los experimentos que se describen en esta sección. El método para este caso particular consiste en utilizar celulosa (o celulosa modificada) como fase estacionaria y una solución acuosa de una sal, o mezclas de solventes polares (H_2O , alcoholes, acetonitrilo, etc) como fase móvil. La celulosa permite, por un lado, sembrar cantidades considerables de soluciones acuosas para ser analizadas, por otro, admite que el solvente de corrida (fase móvil) contenga H_2O .

Con este método se persiguieron dos objetivos principales. En primer lugar, se buscó aportar información que ayuda en la identificación de fotoproductos (cromatografía analítica). En segundo lugar, se empleó una variación de esta técnica para aislar cantidades significativas de los productos de reacción (cromatografía preparativa) que fueron sometidas a ulteriores análisis. Esta segunda aplicación del método fue llevada a cabo, sobre todo, en aquellos casos en los cuales se detectó algún fotoproducto que no pudo ser fácilmente identificado empleando las soluciones patrón.

En estos experimentos fueron usados tres tipos de placas cromatográficas: placas de DEAE-celulosa de 100 μm de espesor, marca Whatman; placas de celulosa de 250 μm de espesor con marcador fluorescente, marca Sigma-Aldrich y placas de DEAE-celulosa de 250 μm de espesor, marca Baker. Las primeras fueron usadas en la identificación de productos de reacción, mientras que las dos últimas fueron empleadas, fundamentalmente, en las cromatografías preparativas.

Soluciones acuosas de NH_4Cl de distinta concentración fueron usadas como fase móvil. Las velocidades relativas con las cuales migran los diversos compuestos analizados en este trabajo dependen sensiblemente de la concentración de esta sal. Por lo tanto, se realizó un estudio minucioso para determinar bajo qué condiciones de concentración se obtenían separaciones aceptables en los distintos experimentos de fotólisis continua. Básicamente, y dependiendo de los productos de reacción particulares, se emplearon soluciones de concentración 0,3 %(p/v) y 3 %(p/v).

Una vez realizada la corrida cromatográfica, para el revelado de las placas, se

aprovechó la fuerte emisión fluorescente que presentan la pterinas al ser irradiadas con luz UV-A. De esta manera, cuando se expone una placa a la luz UV-A pueden observarse las características manchas emisoras de luz azul sobre un fondo negro. Las intensidades relativas de la luz emitida por las manchas dependen, evidentemente, no sólo de la cantidad de la sustancia fluorescente sino también de otros factores tales como el coeficiente de extinción molar y el rendimiento cuántico de fluorescencia. Por otra parte, algunas sustancias fueron reveladas sin necesidad de ser irradiadas por luz UV-A, debido a que presentan manchas coloreadas. Por último aquellas sustancias incoloras y no fluorescentes pudieron ser reveladas empleando la placa con indicador fluorescente citada anteriormente. En estas placas, las manchas se observan oscuras sobre un fondo fluorescente.

7.3.1. TLC analítica.

Se realizaron corridas cromatográficas con soluciones preparadas a partir de los patrones comerciales. En estos ensayos se ajustaron detalles experimentales tales como la concentración de las soluciones sembradas, la cantidad de gotas sembradas, etc. Además, como se mencionó anteriormente, se realizaron pruebas con soluciones de NH_4Cl de distintas concentraciones y con mezclas de solventes. En estos experimentos fueron determinados los valores del factor de retardo (R_f) para los distintos patrones. Cabe recordar que el R_f se define como el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el solvente de corrida en un mismo período de tiempo. El R_f depende de la fase estacionaria, de la fase móvil y de la sustancia analizada, pero no de otros factores tales como el tiempo que dura la corrida, la distancia recorrida por la sustancia, el tamaño de la placa, etc. En la tabla 7.1 se muestran resultados obtenidos con las soluciones patrones.

Contando con la información de la tabla se procedió a aplicar esta técnica a las soluciones sometidas a fotólisis. En cada experimento se sembró sobre la misma placa cromatográfica una alícuota de la solución irradiada (típicamente 20 gotas desde tubo capilar de vidrio) junto con soluciones patrón del reactivo y de los posibles productos de reacción. Luego se determinaron los valores de R_f para todas las manchas presentes en la placa y se compararon entre sí. También se tomó en cuenta la forma de las manchas, ya que se observó que distintos patrones presentaban diferencias en este aspecto. En casi todos los experimentos se realizaron corridas cromatográficas empleando soluciones de NH_4Cl 0,3%(p/v) y 3%(p/v). Cuando se consideró necesario se recurrió a la realización de otras corridas utilizando

distintos solventes. Para guardar registro de los experimentos, las placas, bajo irradiación, fueron fotografiadas con una cámara digital Casio QV-120 o con una cámara Mavica de Sony.

Sustancia	Detección visual ^(a)	Fluorescencia ^(b)	Rf	Rf
			NH ₄ Cl 3%(p/v)	NH ₄ Cl 0,3%(p/v)
Acido fólico	Sí	No	0,14	0,00
Pterina	No	Sí	0,34	0,49
6-carboxipterina	No	Sí	0,39	0,17
6-formilpterina	No	Sí	0,41	0,42
6-metilpterina	No	Sí		0,48
6-hidroximetilpterina	No	Sí		0,53
Xantopterina	Sí	Sí	0,32	0,38
Ac. <i>p</i> -aminobenzoilglutámico	No	No	1,00	1,00

Tabla 7.1. Resultados de TLC realizados sobre soluciones patrones. (a) Esta columna indica si la posición de la mancha puede visualizarse simplemente por el color del compuesto. (b) Fluorescencia de las manchas al ser irradiadas con luz UV de 350 nm.

7.3.2. TLC preparativa.

Como se mencionó anteriormente, una variación de esta técnica fue aplicada para separar productos de reacción y obtener soluciones de los mismos. En esta modalidad, la siembra se realizó “en banda”. Esto quiere decir que las gotas no fueron aplicadas sucesivamente una sobre la otra en el mismo lugar o punto, sino que fueron aplicadas a lo largo de una línea perpendicular a la dirección de movimiento del solvente de corrida. Una vez que se evapora el solvente sobre la línea de siembra se repite la operación. Realizando esta maniobra varias veces puede sembrarse un volumen mucho mayor de muestra; sin embargo, sólo puede sembrarse una solución por placa. Esto no es ningún inconveniente porque en este caso lo que se quiere lograr es preparar una solución de un producto aislado de los demás y no comparar con patrones. Luego de realizar la corrida se obtiene una placa en la cual a distintas alturas (según los correspondientes valores de R_f) se encuentran los productos separados.

Las placas cromatográficas empleadas en esta modalidad fueron también de celulosa o

celulosa modificada, pero de mayor espesor (250 μM); llamadas, frecuentemente, placas semipreparativas. La mayor cantidad de fase estacionaria por unidad de área permite aumentar el volumen de muestra sembrada sin perder la capacidad de separación. Concretamente fueron utilizadas placas de DEAE-celulosa (Baker) y celulosa con indicador fluorescente (Sigma).

En estos experimentos se fotolizaron volúmenes mayores de solución, generalmente entre 10 y 20 ml en tubos de ensayo. Luego de la irradiación las soluciones fueron concentradas, disminuyendo su volumen por evaporación de H_2O hasta aproximadamente 0,5 a 1 ml. Esta operación fue realizada en un equipo rotavapor. Típicamente se evaporó el agua de las soluciones fijando la temperatura entre 30 y 40 $^{\circ}\text{C}$ y la presión entre 0,5 y 2 cm de Hg. De esta manera, se aumentó la masa de las sustancias separadas, no sólo por sembrar un volumen mayor de solución, sino también por la mayor concentración de la misma. Además en todos los casos en los cuales fue aplicada esta técnica se realizaron controles de TLC analítica para verificar que el tratamiento de concentración de la muestra no hubiera alterado químicamente a las sustancias presentes en la misma. Es decir, se tomaron alícuotas de las soluciones irradiadas antes y después de ser concentradas y se realizaron ensayos en los cuales se controlaron que ambas soluciones presenten el mismo patrón cromatográfico; o sea, la misma cantidad de sustancias reveladas y con los mismos valores de Rf.

Luego de realizar la correspondiente corrida cromatográfica, cada una de las bandas obtenidas fue recortada de la placa y raspada para recoger en un tubo de ensayo el sólido contenido en ella. Posteriormente se agregaron a cada tubo soluciones para separar la sustancia de interés de la fase estacionaria y se agitaron durante unos minutos. Los tubos fueron centrifugados 15 minutos a 4000 r.p.m. y se separó el sobrenadante, quedando en el fondo de los tubos la mayor parte de la fase estacionaria. Por último, las soluciones fueron filtradas, empleando filtros de nylon MSI (0,1 μm), para eliminar las partículas de celulosa más pequeñas que no precipitaron durante la centrifugación.

Respecto a la elección de la solución que se agregó en cada caso para separar la sustancia de interés de la celulosa, hay que aclarar que se realizaron numerosas pruebas para determinar las condiciones óptimas de extracción. Se ensayaron soluciones de KOH (pH= 11,0), NH_4Cl 3%(p/v) y HCl de varias concentraciones. Luego de realizar el procedimiento de extracción se obtuvieron los espectros UV-visible de los sobrenadantes para investigar la presencia del analito en los mismos.

De esta manera, se lograron aislar distintos productos de reacción en soluciones

acuosas. Estas soluciones fueron sometidas posteriormente a diversos estudios. Por ejemplo, se compararon sus espectros de absorción con los de soluciones patrón y se realizaron análisis por HPLC. Esto permitió, en casos donde se dudaba si una determinada sustancia, separada por TLC, correspondía a un patrón, corroborar o descartar tal hipótesis. Por otro lado, esta técnica sirvió para aportar información valiosa en aquellos casos en los cuales se separaron productos de los cuales no se tenían patrones. En efecto, como se describirá más adelante, las soluciones de las sustancias desconocidas fueron sometidas a diversos análisis, que permitieron su caracterización.

7.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Esta técnica posee gran capacidad para separar sustancias, mucho mayor que las técnicas de TLC de partición. Considerando que en las soluciones irradiadas analizadas existen varios fotoproductos esta cualidad adquiere gran importancia. Además, este método permite cuantificar un compuesto si se cuenta con el patrón correspondiente; y, en consecuencia, calcular rendimientos cuánticos. Sin embargo, la técnica de HPLC utilizada en este trabajo, no permite aislar las fracciones separadas; es decir, que no puede realizarse ningún análisis ulterior sobre soluciones de los productos separados. Lo cual sí puede hacerse, como se explicó en la sección anterior, con las fracciones separadas por TLC. Como puede observarse, ambas técnicas se complementan en el análisis de los fotoproductos.

Para estas medidas se empleó un equipo HPLC 500 B de Konic Instruments. Se utilizó una columna de separación de fase reversa C18 HPLC Spherisorb S5 ODS2 (250 x 46 mm). El sistema de detección consistió en un espectrofotómetro Lambda 1000 Bischoff HPLC. De acuerdo a antecedentes encontrados en literatura (Kang D. et al., 1998) se realizaron ensayos con distintos eluyentes. En estas pruebas no se encontró una única fase móvil que pudiera separar adecuadamente todos los componentes de las soluciones irradiadas en todos los experimentos de fotólisis continua. En la tabla 7.2 figuran las condiciones de corrida adoptadas para estos estudios.

El sistema de detección permite escoger la longitud de onda de análisis entre 200 y 400 nm. Muchos de los estudios cromatográficos se realizaron a 340 nm, zona en la cual casi

todos los derivados pterínicos presentan una banda característica. En otros experimentos se trabajó en la zona de 270 a 300 nm.

Se realizaron corridas cromatográficas con soluciones de patrones comerciales. Los tiempos de retención (t_R) fueron comparados con los obtenidos para las sustancias presentes en las soluciones irradiadas. Se detectó que los valores de t_R de una determinada sustancia variaban en corridas llevadas a cabo en las mismas condiciones experimentales, pero realizadas en distintos días de trabajo. Estas variaciones llegaron en algunos casos hasta un 20%. La razón de esta baja reproducibilidad en los valores del t_R no pudo ser dilucidada y, por ende, para evitar dudas en la identificación de sustancias, se corrieron soluciones patrón, en cada día de trabajo.

Nombre	Composición	Flujo	pH
Sistema I	95% Acetato de Na 50 mM, ácido cítrico 5mM en H ₂ O 5% Metanol	1,0 ml/min	5,2
Sistema II	KH ₂ PO ₄ 20mM, EDTA 2,5 mM	1,0 ml/min	5,5
Sistema III	93% KH ₂ PO ₄ 20mM, EDTA 2,5 mM 7% Acetonitrilo: H ₂ O (60:40)	1,0 ml/min	5,5
Sistema IV	90% KH ₂ PO ₄ 20mM, EDTA 2,5 mM 10% Acetonitrilo: H ₂ O (60:40)	(a) 1,0 (b) 1,5 ml/min	5,5

Tabla 7.2. Sistemas de solvente de corrida empleados. La composición está expresada como una relación de volúmenes. El pH que se indica en la última columna se refiere a la solución acuosa correspondiente antes de realizar la mezcla.

Para cuantificar las sustancias separadas por esta técnica, se realizaron curvas de calibración empleando soluciones patrón. En cada caso, se preparó, por pesada, la solución de la mayor concentración que se quería ensayar y, a partir de ella, soluciones de menor concentración diluyendo con H₂O. De este modo, se obtuvieron series de soluciones de concentración conocida. Cada una de las soluciones fue inyectada en el equipo y se obtuvo el correspondiente cromatograma que consiste en una gráfica de la señal del espectrofotómetro en función del tiempo de corrida. La señal es proporcional a la absorbancia de la solución a la

longitud de onda seleccionada. Posteriormente se integró el área debajo de los picos presentes en los cromatogramas y se construyeron curvas de área en función de la concentración. En las figuras 7.8, 7.9 y 7.10 se muestran algunas de dichas curvas.

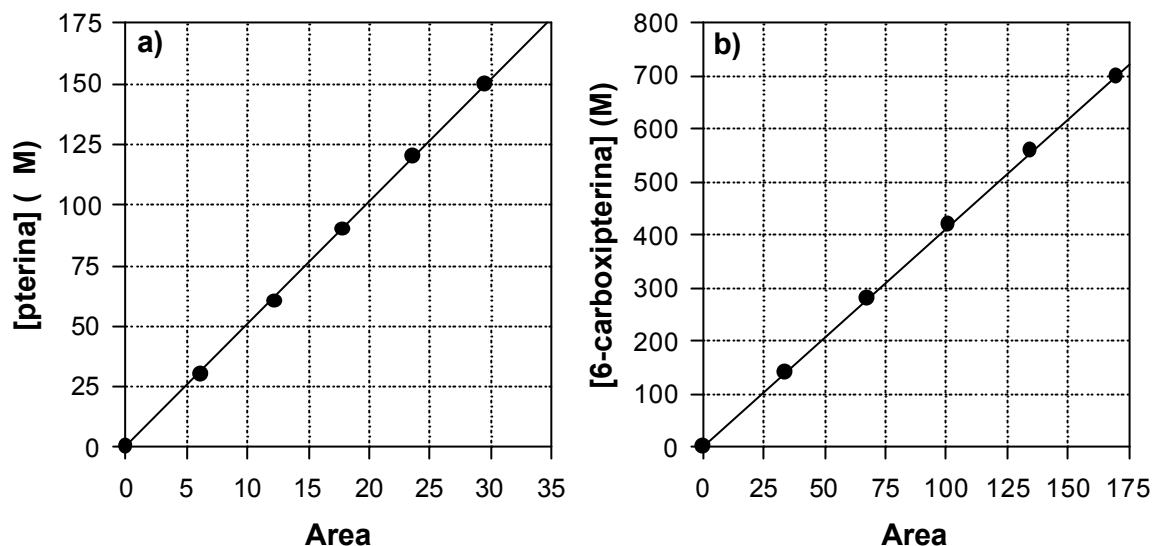


Figura 7.8. Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida II (tabla 7.2). a) 6-carboxipterina, longitud de onda de análisis= 286 nm. b) pterina, longitud de onda de análisis= 270 nm.

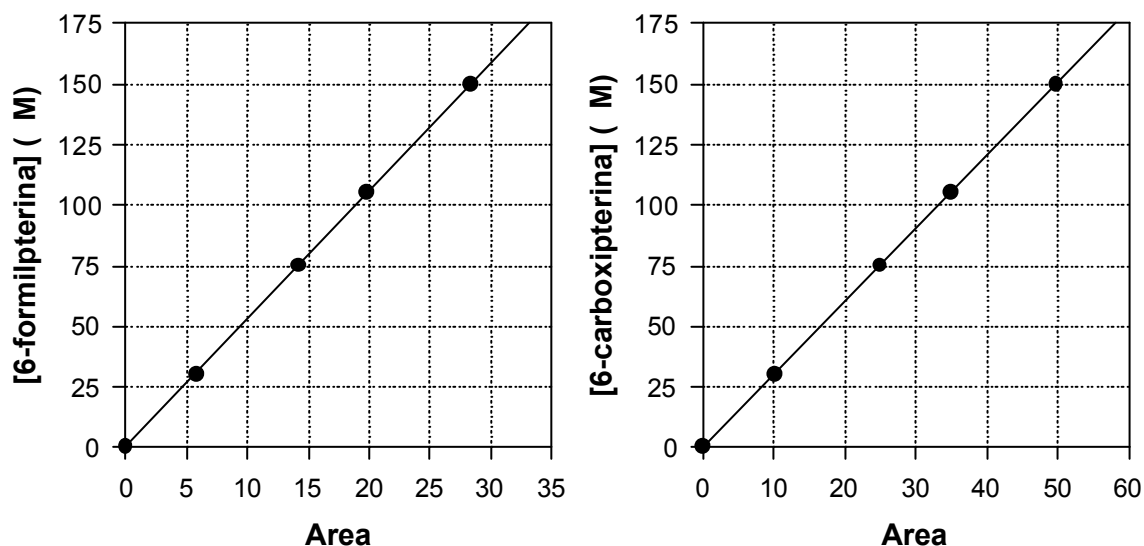


Figura 7.9. Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida IVa (tabla 7.2). longitud de onda de análisis= 280 nm. En ambos gráficos cada punto es el promedio de dos medidas de área.

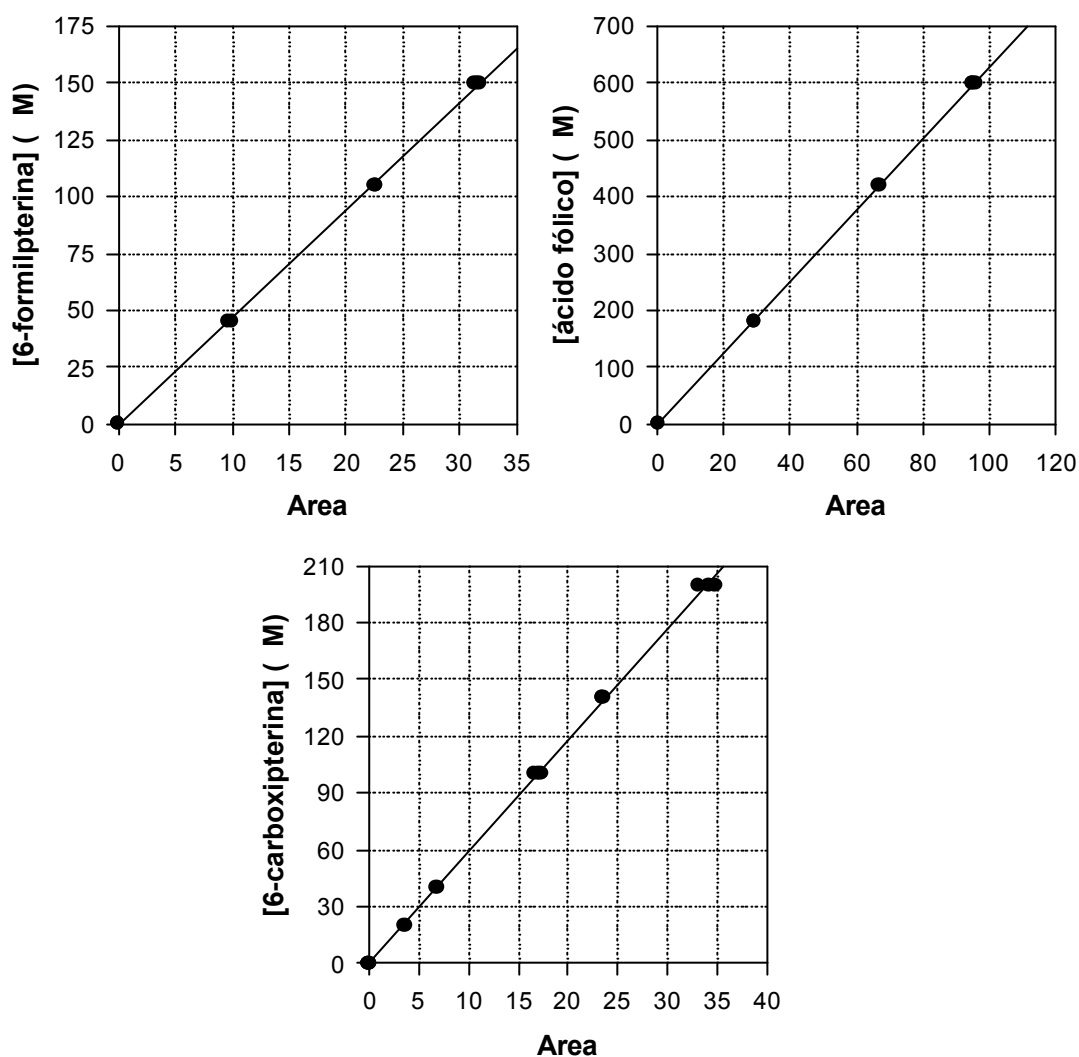


Figura 7.10. Curvas de calibración realizadas con el sistema de corrida III (tabla 7.2). longitud de onda de análisis= 340 nm. Las áreas para cada concentración no fueron promediadas.

Estas curvas de calibración fueron realizadas para todas las sustancias que se cuantificaron. Además se llevaron a cabo en las mismas condiciones experimentales de corrida en las cuales se analizaron las soluciones irradiadas de los experimentos donde se cuantificaron reactivos y productos. Cabe aclarar que la dispersión observada en la determinación de los t_R , no se observó en la determinación de las integrales de los picos cromatográficos. En efecto, soluciones de la misma concentración analizadas bajo las mismas condiciones dos días distintos de trabajo que presentaron diferencias apreciables en los t_R , no lo hicieron en las áreas de integración.

Puede apreciarse en todas las gráficas una relación lineal entre el área y la concentración. Para cada curva de calibración se realizó una regresión lineal de la cual se obtuvo la correspondiente pendiente. Este valor fue utilizado, posteriormente, como factor de conversión entre el área obtenida en los experimentos de fotólisis y la concentración. De esta manera, a partir del análisis cromatográfico de las soluciones irradiadas durante distintos tiempos se obtuvieron las curvas de concentración en función del tiempo.

7.5. Determinación de O₂.

La concentración del O₂ disuelto en las soluciones irradiadas fue determinado electroquímicamente empleando un electrodo sensible a O₂ (Orion, modelo 37-08-99). Para realizar estas medidas se recurrió al uso de una celda de vidrio pyrex provista de cierre hidráulico dentro de la cual se colocó el electrodo y la solución a irradiar; este dispositivo permite fotolizar la solución y dosar el O₂ al mismo tiempo. El electrodo posee en su extremo un buzo magnético, otro se colocó en el fondo de la celda. Un agitador magnético se ubicó por debajo de la celda, de modo tal que las soluciones fueron agitadas durante los experimentos. Por otra parte, la celda se llena completamente con la solución a analizar y el electrodo se ajusta de tal manera que no se permite el intercambio de gases durante el experimento. Además, la membrana del electrodo está protegida de luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico.

Una vez que se prepara todo el dispositivo, se realiza la medida de la concentración de O₂ en la solución antes de ser irradiada. Es necesario puntualizar que, en todos los experimentos llevados a cabo con esta técnica, se emplearon soluciones iniciales saturadas en aire. Finalmente se inicia el experimento de fotólisis estacionaria y, sin apagar la lámpara, se efectúan las medidas a distintos tiempos de irradiación.

Se realizó un experimento control para descartar que la disminución en la concentración de O₂ observada pudiera deberse al descenso en la solubilidad del mismo como consecuencia del calentamiento producido por la lámpara. Si bien el aumento de la temperatura de la solución es de sólo unos pocos grados centígrados, este efecto debía ser tenido en cuenta por la fuerte dependencia con la temperatura que muestra la solubilidad del O₂ en H₂O. El resultado de este control (figura 7.11) muestra que se produce un ligero

descenso de la concentración de O_2 en los primeros minutos de irradiación para luego alcanzar un valor que se mantiene con ligeras oscilaciones. Estos cambios, como se verá cuando se presenten los resultados, pueden despreciarse frente a los cambios observados en las fotólisis que transcurren con consumo de O_2 .

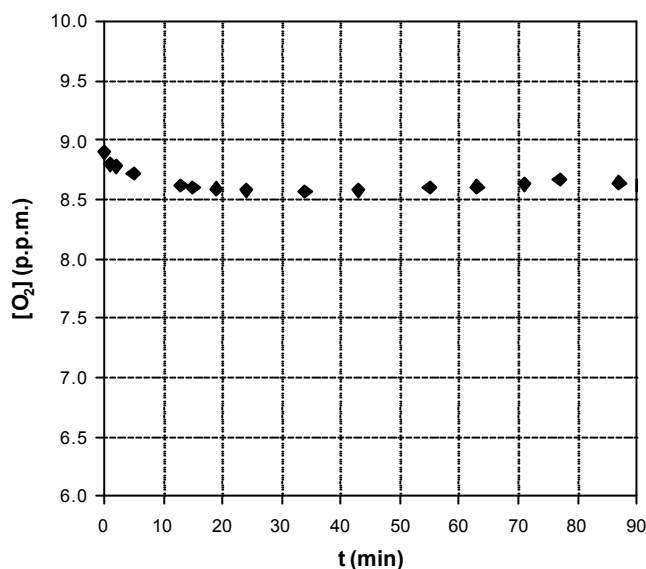


Figura 7.11. Medida de la concentración de O_2 en H_2O bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis y con la misma lámpara.

Las medidas electroquímicas de O_2 disuelto en el medio durante las fotólisis sirvieron para determinar si dicho gas participaba o no en las reacciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser comparados cuantitativamente con aquellos obtenidos en otros experimentos, pues las condiciones experimentales diferían mucho a causa del dispositivo especial empleado para estas medidas.

7.6. Otros métodos analíticos empleados en las fotólisis estacionarias

7.6.1. Determinación colorimétrica de aldehídos.

Se investigó la presencia de compuestos con grupos funcionales carbonílicos mediante la técnica colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se empleó una variante de la técnica general que fue usada previamente con compuestos pterínicos (Robinson et al., 1990). Este procedimiento analítico consiste en la utilización de una solución al 0,1%(p/v) de

2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2 M, la cual reacciona con los compuestos carbonílicos para dar la correspondiente fenilhidrazona que tiene un máximo de absorción a 500 nm.

Esta técnica sirve para detectar y cuantificar compuestos carbonílicos sin diferenciar entre aldehídos y cetonas. Debido a esto, en todos aquellos casos en los cuales esta prueba colorimétrica resultó positiva, se realizó el ensayo de Tollens justamente para distinguir entre estos dos tipos de compuestos. Este último ensayo se basa en la reducción, que producen los aldehídos, del ión Ag^+ a Ag^0 a partir de una solución amoniacal de AgNO_3 . Por el contrario, las cetonas no reducen al ión Ag^+ . A su vez, todos los ensayos de Tollens que se realizaron resultaron positivos.

La técnica colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina fue realizada sobre soluciones irradiadas en las cuales se sospechaba la presencia de compuestos aldehídicos. Puede determinarse la concentración del aldehído debido a que el ϵ de las hidrazonas a 500 nm es conocido y no varía mucho entre las mismas. Sin embargo, en estos ensayos no se pretendió averiguar la concentración absoluta, sino, simplemente establecer si se generaban aldehídos como productos de reacción y analizar cualitativamente la evolución de su concentración durante la fotólisis. De esta manera, se realizaron gráficas de absorbancia a 500 nm en función del tiempo de irradiación.

7.6.2. Fotólisis realizadas en presencia de alcohol furfurílico.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de ciertas reacciones sugirió que intermediarios activados del O_2 podrían participar en el mecanismo de las mismas. Existen ensayos tendientes a dilucidar problemas de este tipo. En particular, puede recurrirse al empleo de secuestradores selectivos de determinadas especies reactivas. Se denomina secuestrador selectivo a una sustancia que reacciona muy rápidamente con la especie reactiva en cuestión y no reacciona con otras especies.

De esta manera, para determinar si en una reacción fotoquímica participa cierta especie reactiva, se agrega a la solución que será irradiada una cantidad elevada de un secuestrador selectivo adecuado. Es importante controlar que el mismo no absorba luz, o que, si lo hace no lo haga en alta proporción. En cuanto a la concentración, hay que elegirla de acuerdo a las reactividades relativas, pero, en principio, una concentración que sea un orden de magnitud superior a la del reactivo puede aceptarse como adecuada. Por último, se realiza la fotólisis bajo las mismas condiciones que otras realizadas en ausencia del agente

secuestrante y se comparan los resultados de los experimentos realizados en presencia y en ausencia del mismo. Se asume que el intermediario reactivo buscado, si existe, reaccionará totalmente con el secuestrador selectivo, o, al menos, en una proporción apreciable. Por lo tanto, una disminución de la velocidad de la reacción en el experimento realizado en presencia del secuestrador indica la participación de la especie reactiva investigada.

En particular, se investigó la participación del oxígeno singlete, cuyas propiedades fueron presentadas en la sección 4.4 (Foote C. S. y Clennan E. L., 1995). En el caso particular de la técnica aplicada en este trabajo se empleó alcohol furfurílico como agente secuestrante (Haag, W. R. et al., 1984 a y b; Haag, W. R. y Hoigné J., 1986). Como puede apreciarse en la figura 7.12, este compuesto reacciona rápidamente con el $^1\text{O}_2$ para dar un endoperóxido intermediario que luego se transforma en una serie de productos (Blough N. V. y Zepp R. G., 1995). La figura 7.13, por su parte, muestra el espectro de absorción de una solución de alcohol furfurílico de concentración igual a la usada en los experimentos. Puede observarse que a la longitud de onda de excitación (350 nm) absorbe una cantidad de luz despreciable.

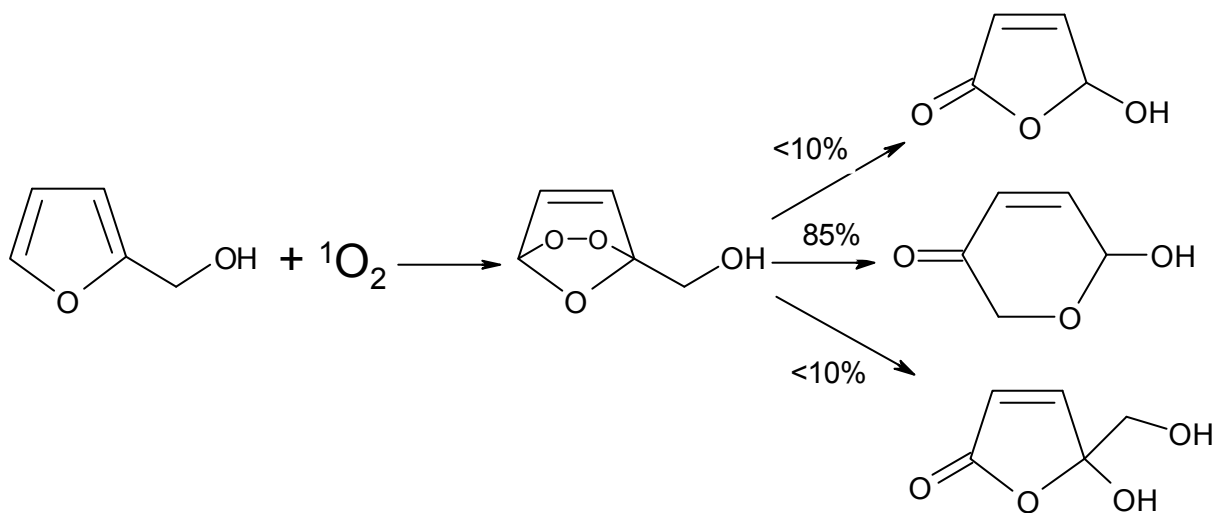


Figura 7.12. Reacciones del $^1\text{O}_2$ con el alcohol furfurílico.

Para ello, se realizaron experimentos de fotólisis estacionaria en condiciones similares a las descritas anteriormente, pero en presencia de alcohol furfurílico 10 mM. Esta concentración superó, en todos los casos, en más de 10 veces a la del reactivo fotolizado (generalmente comprendida ente 0,15 y 0,7 mM). Por último, las soluciones irradiadas fueron analizadas por HPLC, determinándose las concentraciones de reactivos y productos (no se midió el consumo de alcohol furfurílico).

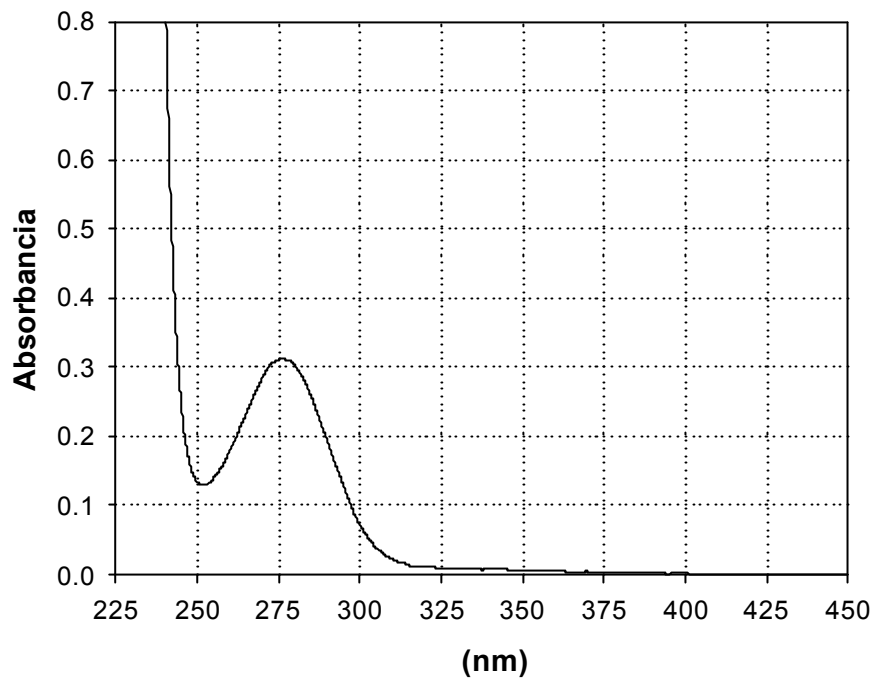


Figura 7.13. Espectro de absorción de una solución 10 mM de alcohol furfurílico en agua.

Capítulo 8.

Estudios complementarios.

En este capítulo se expondrán las técnicas complementarias que fueron aplicadas en este trabajo de tesis, pero que escapan a la metodología general presentada en el diagrama de la figura 6.1 y desarrollada en los capítulos 6 y 7. En particular, se expondrán los aspectos generales de los métodos de fotólisis de flash y flujo detenido. Ambos métodos permiten el análisis cinético de reacciones químicas. Los resultados de estos estudios aportaron información sobre el mecanismo de algunos de los procesos estudiados. También se describirá la técnica empleada para determinar rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$. Por último, se expondrán brevemente los análisis que se realizaron sobre algunas muestras con un equipo de HPLC con detector de masas.

8.1. Método de fotólisis de flash.

8.1.1. Introducción.

Este método, más conocido como flash fotólisis, fue desarrollado por R. G. W. Norrish y G. Porter en 1948 y es utilizado actualmente para el estudio de procesos fotofísicos y fotoquímicos, así como para el estudio cinético de reacciones térmicas rápidas iniciadas a partir de la generación fotoquímica de reactivos. Básicamente, esta técnica consiste en someter al material estudiado, contenido en una celda de reacción, a un corto e intenso flash de luz, generando una cantidad relativamente elevada de moléculas excitadas, a partir de las cuales se producirán cambios en el sistema. La evolución temporal de los mismos es seguida por espectroscopía de absorción o de emisión.

La resolución temporal está limitada por la duración del flash, que es usualmente del

orden de los microsegundos en el caso de las lámparas de plasma (flash fotólisis convencional) y del orden de los picosegundos o nanosegundos cuando se utilizan láseres pulsados (láser flash fotólisis). La intensidad del flash debe ser suficientemente alta como para producir un cambio medible en la composición química del sistema, pero de muy corta duración en comparación con la vida media de los procesos que se desea estudiar. La duración del flash se define, generalmente, como el tiempo durante el cual la intensidad de la luz se mantiene por encima de la mitad del valor máximo. Los límites de sensibilidad del método, por su parte, están determinados por factores tales como la absorción de luz del sistema en estudio y las especies transientes formadas, la potencia del flash y las características del sistema óptico y de detección.

Existen dos variantes técnicas para el seguimiento espectroscópico de los cambios químicos generados por el flash, denominadas flash espectroscopía y espectroscopía cinética. En la primera, se registra en un espectroscopio un espectro a un tiempo preseleccionado después del flash, por medio de la aplicación a la muestra de un segundo flash. En la segunda, se determina, a una longitud de onda preseleccionada, la variación temporal de la absorción del sistema. Para ello, se utiliza un haz luminoso proveniente de una fuente de luz continua (luz de análisis), que se colima, se hace pasar a través de la celda de reacción, atraviesa un monocromador, es detectado por un fotomultiplicador y registrado en un osciloscopio.

8.1.2. Equipo.

En los estudios presentados en este trabajo se empleó un equipo de flash fotólisis convencional. En la figura 8.1 se muestra un esquema del aparato Xenon Co., Modelo 720 C, utilizado; su óptica y electrónica fueron modificadas a fin de aumentar la sensibilidad de detección (San Román et al., 1982). La muestra es colocada en una celda de reacción cilíndrica de cuarzo de 1 cm de diámetro y 10 cm de longitud, que posee una camisa también de cuarzo, la cual permite termostatar la muestra o colocar soluciones filtros que eviten el paso de luz de ciertas regiones del espectro. La celda es iluminada por dos lámparas de flash convencionales Xenon Co. FP-5-100C ubicadas paralelamente a la misma. La energía eléctrica del flash proviene de un banco de capacitores que se carga a un alto voltaje y está dentro del rango comprendido entre 50 y 2000 J. La duración del flash, por su parte, está entre 50 y 200 μ seg.

El equipo consta de un sistema de análisis óptico que se encuadra dentro del método

de espectroscopía cinética mencionado anteriormente. Se emplea una lámpara de análisis de tungsteno-halógeno (Riluma PN240, 24V., 240W), con un intervalo de emisión de 340 a 650 nm. Se empleó un monocromador Bausch & Lomb y la detección de la señal luminosa se logra mediante un fotomultiplicador RCA1P28 o Hamamatsu RCA 4840, alimentado mediante un divisor de tensión resistivo-capacitivo. La señal anódica del fotomultiplicador se envía a la entrada diferencial de un osciloscopio Leader LBO-5825 que está sincronizado con el disparo de las lámparas de flash. Las señales obtenidas (trazas) son digitalizadas empleando una placa de comunicación entre el osciloscopio y una computadora (PC) que fue desarrollada por personal del Laboratorio de Electrónica del INIFTA.

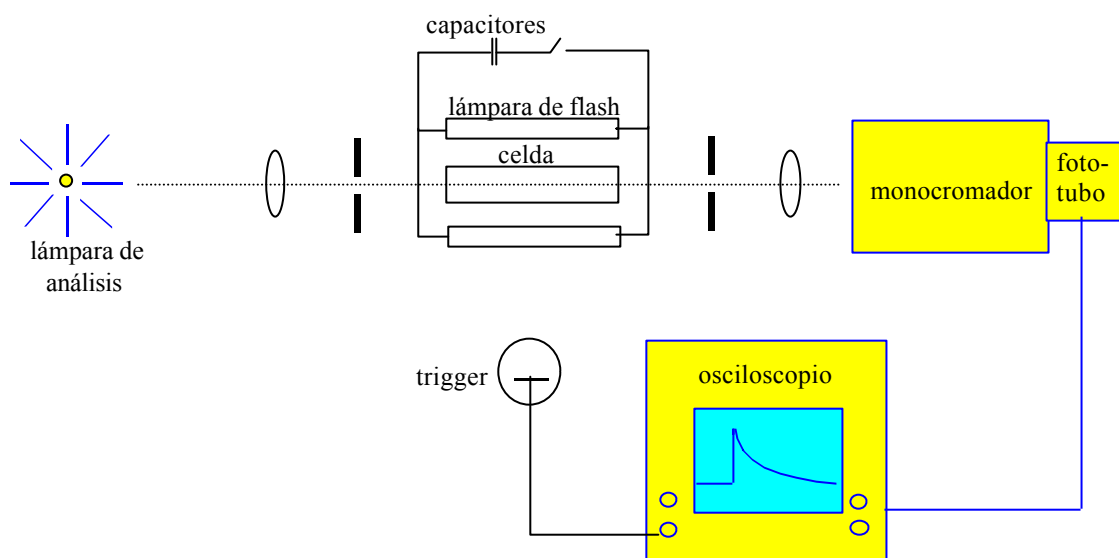


Figura 8.1. Esquema del equipo de flash fotólisis.

8.1.3. Análisis de los resultados.

Si durante el proceso estudiado se forma un intermediario que absorbe más luz que el reactivo a la longitud de onda de análisis, el osciloscopio registrará una señal del tipo de la que se muestra en la figura 8.2.

Debe aclararse que, como el transiente absorbe sólo una pequeña fracción de luz, es necesario amplificar la ganancia del osciloscopio, en cuyo caso la posición correspondiente al 0% de transmitancia no aparecerá en la pantalla del mismo. La respuesta del osciloscopio (x) es proporcional a la intensidad luminosa (I); por lo tanto, pueden plantearse las siguientes relaciones:

$$I_0 = k \cdot x_0$$

$$I = k \cdot x$$

donde k es una constante que depende de la sensibilidad del detector. Considerando estas ecuaciones y la ley de Lambert-Beer puede escribirse la siguiente relación:

$$A = \log(I_0/I) = \log(x_0/x) = \epsilon_\lambda \cdot C_t \cdot l$$

donde ϵ_λ es el coeficiente de extinción molar del transiente a la longitud de onda λ , C_t es su concentración al tiempo t después del flash y l es el camino óptico.

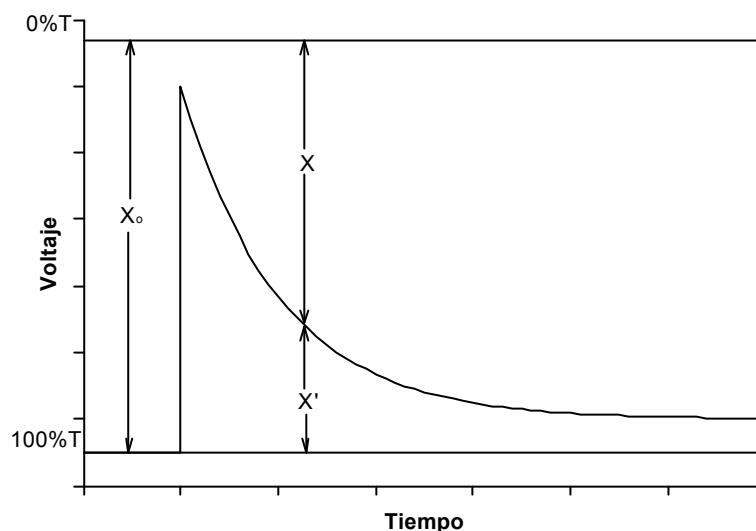


Figura 8.2. Esquema de una traza obtenida en un experimento de flash fotólisis en la que se observa la desaparición (decaimiento) de un transiente formado debido al flash.

La amplitud de la señal (x) está dada en unidades de voltaje. Con el fin de convertir estos valores en absorbancia o transmitancia porcentual, se ajusta a 1 voltio el 100% de transmitancia de la luz de monitoreo utilizando un comparador diferencial conectado al osciloscopio. Como la línea correspondiente a 0% de transmitancia no se registra, no se obtienen las amplitudes x para cada intervalo de tiempo, pero sí las que fueron marcadas como x' en el esquema de la figura 8.2. La relación entre x y x' viene dada por:

$$x' = x_0 - x$$

Puede plantearse entonces, teniendo en cuenta que $x_0 = 1000$ mV, la siguiente ecuación:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{x_0}{x_0 - x'}\right)$$

y, por lo tanto:

$$A = \log\left(\frac{1000}{1000 - x'}\right) = \epsilon_\lambda \cdot C_t \cdot l$$

8.2. Estudios cinéticos

En una de las reacciones fotoquímicas estudiadas se encontró que uno de los fotoproductos no era estable y se descomponía en una reacción térmica. La cinética de este proceso fue estudiada mediante técnicas convencionales y mediante la técnica denominada flujo detenido (stopped flow).

8.2.1. Estudios cinéticos mediante técnicas convencionales.

Se denomina de esta manera a aquellos métodos en los cuales se mezclan manualmente los reactivos y luego se monitorea alguna propiedad del sistema en función del tiempo. Es evidente que, para estudiar la cinética de una reacción de esta manera, el tiempo en el cual se completa la reacción debe ser mayor al tiempo que se emplea en el mezclado de las soluciones. De lo contrario, no se podrá medir la variación de ninguna propiedad.

En los experimentos que se expondrán en el capítulo 15, las mezclas fueron llevadas a cabo en celdas de cuarzo de 4 ml de capacidad. Se midió la variación de la absorbancia de la solución mezcla a distintas longitudes de onda como una función del tiempo. Estas medidas fueron realizadas con el espectrofotómetro Cary3 de Varian descripto anteriormente.

Este equipo presenta dos modalidades para realizar estudios cinéticos. En el modo cíclico, el equipo se programa para tomar espectros de absorción en un rango preestablecido de longitudes de onda, a intervalos definidos de tiempo. Debido al tiempo necesario para barrer un espectro, este modo no puede usarse cuando la reacción estudiada es demasiado rápida. En estos casos es más apropiado el modo cinético. En él, el aparato fija su monocromador en una longitud de onda especificada y se graban los valores de absorbancia como una función del tiempo. Además el equipo cuenta con un software que permite reducir el ruido de los espectros.

8.2.2. Técnica de flujo detenido.

Como se detallará en el capítulo 15, bajo ciertas condiciones, la reacción se vuelve tan rápida que no puede ser estudiada mediante las técnicas convencionales. En estos casos se recurrió a la implementación de la técnica de flujo detenido, mediante la cual, es posible seguir el curso de reacciones cuyos tiempos medios están comprendidos en intervalos de tiempo del orden de los milisegundos.

El aspecto crucial de esta técnica es que logra una muy buena mezcla de pequeñas cantidades de las soluciones de los reactivos en un tiempo muy breve, comparado con el necesario para el mezclado manual. Los aparatos de flujo detenido consisten, básicamente, en un dispositivo que mezcla dos soluciones muy rápidamente inyectándolas en una cavidad, la cual está ajustada con un émbolo que se mueve hacia atrás a medida que los fluidos entran. El flujo cesa cuando el émbolo alcanza un tope y la reacción continúa en las soluciones muy bien mezcladas. Se hacen medidas en función del tiempo, generalmente espectroscópicas, sobre el material mezclado.

La figura 8.3 muestra el esquema básico de un equipo de flujo detenido. Las soluciones con los reactivos son depositadas inicialmente en jeringas de reservorio (R), desde donde pueden llenarse jeringas de vidrio (J), mediante un conjunto de válvulas (V). Estas últimas jeringas poseen émbolos accionables simultáneamente por un martillo (A) conectado a un circuito neumático con aire comprimido aportado por un compresor (C). Ambas soluciones, al ser disparado el mecanismo, son impulsadas hacia una unidad mezcladora (M) completándose el mezclado en unos pocos milisegundos. A su vez parte de la mezcla queda en la celda de observación (O); que posee ventanas de cuarzo. Al mismo tiempo es accionado el émbolo de frenado (D). Todo el sistema de circulación de soluciones, excluyendo los reservorios, está termostatzado con agua proveniente de un termostato

Generalmente, estos equipos poseen un dispositivo espectrofotométrico asociado. El haz de luz, proveniente de una fuente (F) es enviado a un monocromador (B). El haz de luz (L_0) cuya longitud de onda se elige de acuerdo con el sistema bajo observación, pasa a través de la celda de observación (O). El haz emergente (L) incide en un sistema de detección (P), la señal resultante es registrada, y, por último, es digitalizada y analizada.

En los laboratorios de la división de Cinética y Fotoquímica del INIFTA se cuenta con dos aparatos de flujo detenido. Uno es un equipo Durrum modelo D-110 y el otro es un accesorio SFA-20 de Hi-Tech. El primero consiste, esencialmente, en un espectrofotómetro ultravioleta-visible acoplado a un dispositivo de mezclado rápido. La señal adquirida por un fotomultiplicador es registrada y almacenada por un osciloscopio. El segundo es un aparato especialmente diseñado para ser usado en los espectrofotómetros Cary, utilizando de ellos todo su sistema óptico. Las medidas fueron realizadas con este últimos dispositivo, sin embargo, se realizaron algunos controles con el primero para corroborar los resultados obtenidos.

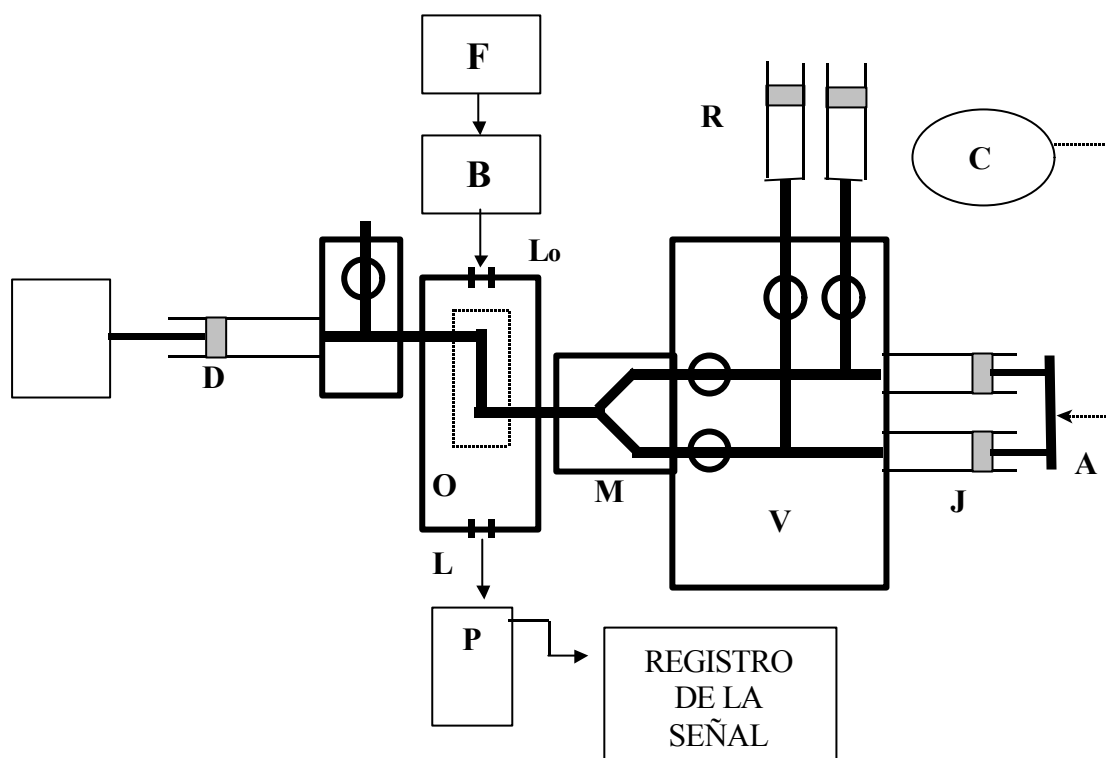


Figura 8.3. Esquema básico de un equipo de flujo detenido.

8.3. Determinación de producción de $^1\text{O}_2$.

Se realizaron experimentos para determinar si algunos de los compuestos estudiados generan $^1\text{O}_2$ fotoquímicamente. Estas medidas fueron realizadas durante una estada de trabajo en el Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe, Alemania, en el marco de un convenio de cooperación e intercambio existente entre los grupos de investigación del Dr. André Braun y del Dr. Alberto L. Capparelli.

El fundamento de la técnica empleada consiste en la medida de la luminiscencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm cuando se irradia, en forma continua, una solución en agua pesada (D_2O) de la sustancia que se quiere investigar. Este método usa D_2O como solvente ya que se obtienen señales mucho mayores que usando H_2O , con lo cual, el método aumenta su sensibilidad significativamente. La razón de este efecto, reside en que el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en D_2O es de 62 μs , mientras que en H_2O es de sólo 3,8 μs . Por consiguiente, en el sistema de irradiación continua que emplea la técnica se obtiene una mayor concentración estacionaria de la especie

excitada que se investiga.

El pD ($-\log [D^+]$) fue medido con un pH-metro convencional, aplicando la siguiente corrección a cada medida (Salomaa P. et al., 1964).

$$pD = pH + 0,4.$$

Donde pH es el valor obtenido del peachímetro. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones concentradas de hidróxido de sodio deuterado (NaOD) y de ácido clorhídrico deuterado (DCI). Las soluciones problemas fueron preparadas de modo tal que la absorbancia a la longitud de onda de excitación sea mayor a 0,8.

El equipo cuenta con una lámpara de excitación Xe/Hg Osram de 1kW. El haz de luz pasa a través de un filtro de agua y un monocromador ISA Jobin Yvon, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. La longitud de onda de excitación fue 367 nm. La mencionada celda, de 1x1 cm, es de cuarzo y puede contener aproximadamente 3,5 ml de solución.

La luz emitida es colectada por un espejo y pasa primero a través de un chopper calibrado a 11 Hz; luego pasa por un filtro tipo cut-off de 1000 nm y por un filtro de interferencia de 1271 nm, para incidir, finalmente, en un fotodiodo de Germanio ubicado en ángulo recto respecto al haz incidente. Este dispositivo de detección trabaja a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, por lo cual consta de un sistema de refrigeración que emplea una mezcla de CO_2 sólido y alcohol isopropílico para alcanzar dicha temperatura. El detector de Germanio está conectado a un registrador X-Y Omnigraphic de Houston Instrument y a un osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz.

Cada medida se realizó registrando, primero, una línea de base sin irradiación, luego se iluminó la muestra y, por último, se realizó nuevamente una línea de base sin irradiación. Típicamente se registraron las señales durante 3 minutos para cada una de las tres etapas de la medida. En la figura 8.4 se muestra el registro de una señal. Además se tomaron los espectros de absorción antes y después de la irradiación en un espectrofotómetro Cary5 de Varian. Este control se realizó para determinar si durante la iluminación de la muestra se producía transformación química de la misma.

La diferencia entre el valor de la señal y la línea de base es proporcional a la concentración del $^1\text{O}_2$ que se genera en la muestra como consecuencia de la irradiación. La magnitud de esta diferencia se compara con la correspondiente a una referencia para determinar el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) de una sustancia. La referencia

es una solución, también en D₂O, de una sustancia cuyo Φ_{Δ} es conocido. A la relación entre ambas señales se le debe introducir dos factores de corrección. Así pues, el cálculo se realiza aplicando la siguiente ecuación.

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^X}{Se^R} \cdot \frac{W^R \cdot \lambda^R}{W^X \cdot \lambda^X} \cdot \frac{(1 - 10^{-AX})}{(1 - 10^{-AR})} \quad (1)$$

donde Φ_{Δ} es el rendimiento cuántico de producción de ¹O₂, Se es la diferencia entre la señal durante la irradiación y la línea de base, W es la potencia de la radiación, λ es la longitud de onda de excitación y A es la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación. El superíndice X indica a la muestra, mientras que el R indica a la referencia.

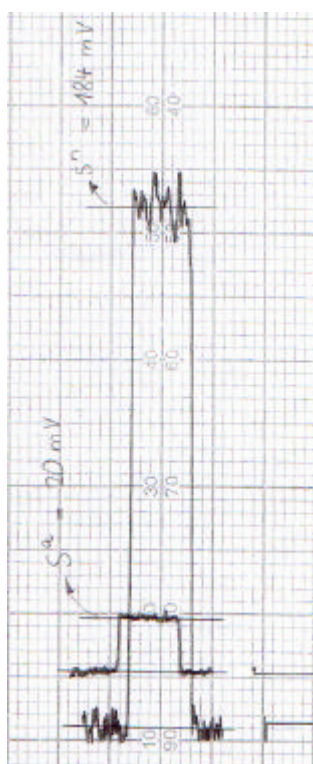


Figura 8.4. Señales correspondientes a una solución de rosa de bengala en D₂O (pD=11,4). Las dos señales corresponden a dos amplificadores diferentes con distinta sensibilidad.

Debido a la diferencia entre la intensidad de la luz incidente (I_0) a las longitudes de onda λ^R y λ^X a causa del espectro de emisión de la lámpara, es necesario introducir el factor de corrección I_0^R / I_0^X . Este factor puede escribirse como $W^R \cdot \lambda^R / W^X \cdot \lambda^X$. W se mide con una termopila Laser Instrumentation modelo 154. El otro factor que está presente en la ecuación (1), $[(1 - 10^{-AX}) / (1 - 10^{-AR})]$, se origina en la diferente cantidad de fotones

absorbidos por la muestra y por la referencia.

En las medidas realizadas en medio ácido se empleó fenalenona como referencia, excitándola a 367 nm. Este compuesto presenta un Φ_{Δ} igual a 0,975. Las soluciones fueron preparadas de tal manera que la absorbancia de las muestras fue igual al de la referencia ($A_X=A_R$). Además, como en este caso, $\lambda^X = \lambda^R$ la ecuación (1) se reduce a:

$$\Phi_{\Delta}^X = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^X}{Se^R}$$

En medio alcalino, en cambio, se utilizó rosa de bengala como referencia ($\Phi_{\Delta} = 0,75$). En este caso este compuesto se excita a 547 nm, ya que a 367 su coeficiente de extinción molar es muy bajo. Por esta razón el factor que hace la corrección necesaria por la diferencia de intensidad a diferentes longitudes de onda ($W^R \cdot \lambda^R / W^X \cdot \lambda^X$) no puede ser eliminado. Para estas medidas también se trabajó con absorbancias de la muestra y la referencia iguales a las respectivas longitudes de onda de excitación.

8.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas como sistema de detección (HPLC-masas).

Ciertas muestras fueron analizadas con la técnica HPLC-masas. Estos experimentos fueron realizados en el marco de un convenio de cooperación existente con los Dres. Edmondo Pramauro y Ezio Pellizetti del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Torino (Italia).

El equipo consta, básicamente, de un módulo convencional de HPLC del cual sale el eluido que es transportado hacia un espectrómetro de masas. El líquido pasa primero por un evaporador de infrarrojos en el cual se retira la mayor parte del disolvente y, luego, por dos cámaras diferenciales de vacío. Finalmente, la muestra ingresa en el espectrómetro de masas propiamente dicho. Primero se vaporiza en la cámara de ionización, la cual genera iones gaseosos de peso molecular una unidad menor al de la molécula analizada ($M-1$) y fragmentos más pequeños. Por último ingresa en el analizador de masas en el cual se obtiene el correspondiente espectro de masas. En definitiva, los distintos componentes de la solución analizada son primero separados en la columna del cromatógrafo y luego se obtiene un espectro de masas para cada uno de ellos por separado.

Para la separación se empleó una columna RP-C18 Chrompack inert-sil ODS 3. La elusión se realizó empleando una solución de acetato de amonio 20 mM (pH= 3,3) (A) y metanol (B). Se operó en gradiente partiendo de una mezcla de 80% de A y 20% de B hasta llegar a 100% de B en 40 minutos.

Las muestras analizadas se prepararon mediante la técnica TLC preparativa descrita anteriormente (sección 7.3.2). Soluciones irradiadas fueron sembradas y las correspondientes bandas fueron recortadas y enviadas para su estudio. Antes de ser analizadas por HPLC-masas, las sustancias fueron separadas de la fase estacionaria como se explicó en la mencionada sección.

PARTE III
FOTÓLISIS DE SOLUCIONES ÁCIDAS

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.

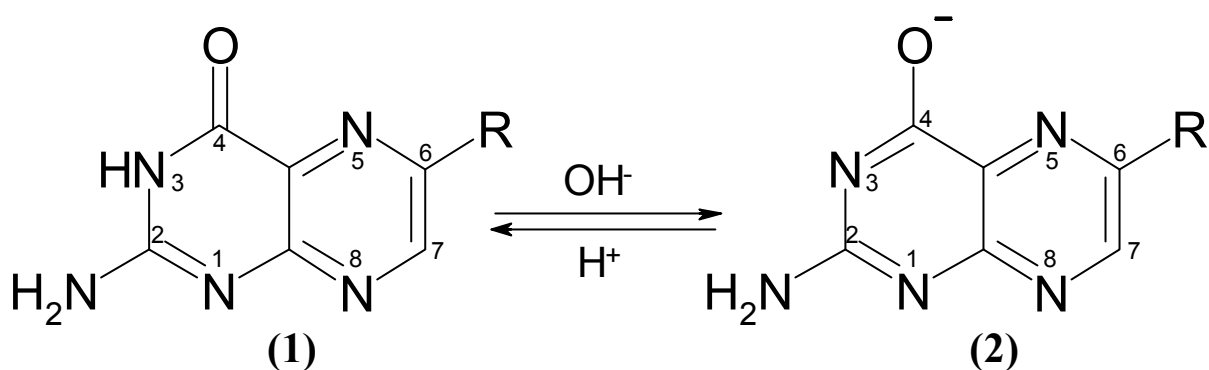


Figura 9.1. Equilibrio ácido-base presente en todos los derivados pterínicos.

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.

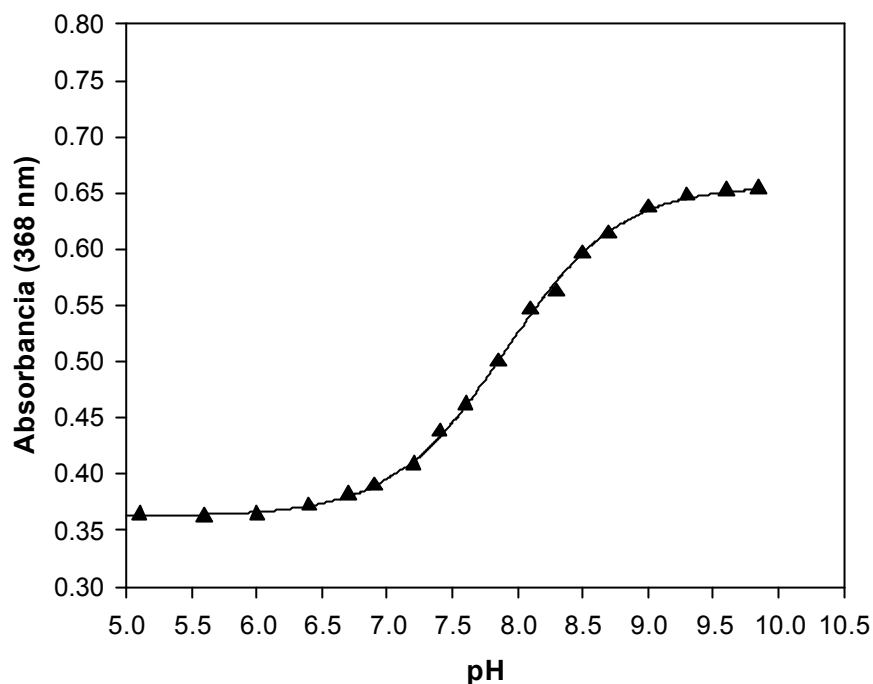


Figura 9.2. Curva de titulación a 368 nm para una solución de pterina (100 M). La línea representa el ajuste no lineal realizado con la ecuación teórica sobre los datos experimentales.

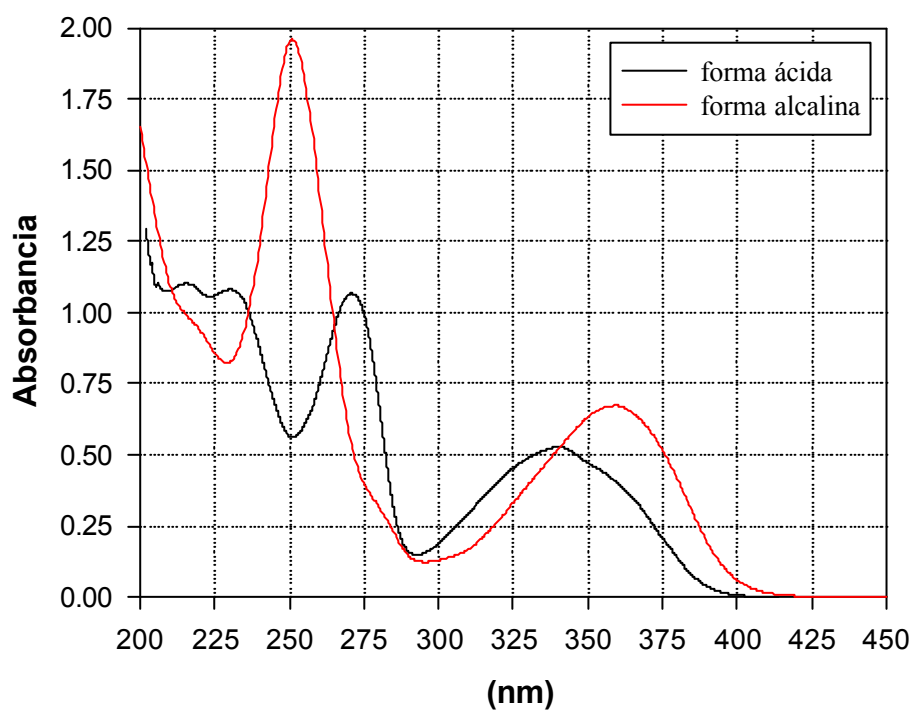


Figura 9.3. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la pterina. Solución acuosa de pterina (100 M). Camino óptico: 1 cm.

	Ka		Ka	<u>Promedio</u> Ka= 1,23x10⁻⁸ σ_{n-1}= 5,5x10⁻¹⁰ CV%= 4,5 pKa= 7,91
250	1,31x10 ⁻⁸	364	1,23x10 ⁻⁸	
272	1,18x10 ⁻⁸	368	1,24x10 ⁻⁸	
312	1,16x10 ⁻⁸	372	1,25x10 ⁻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.

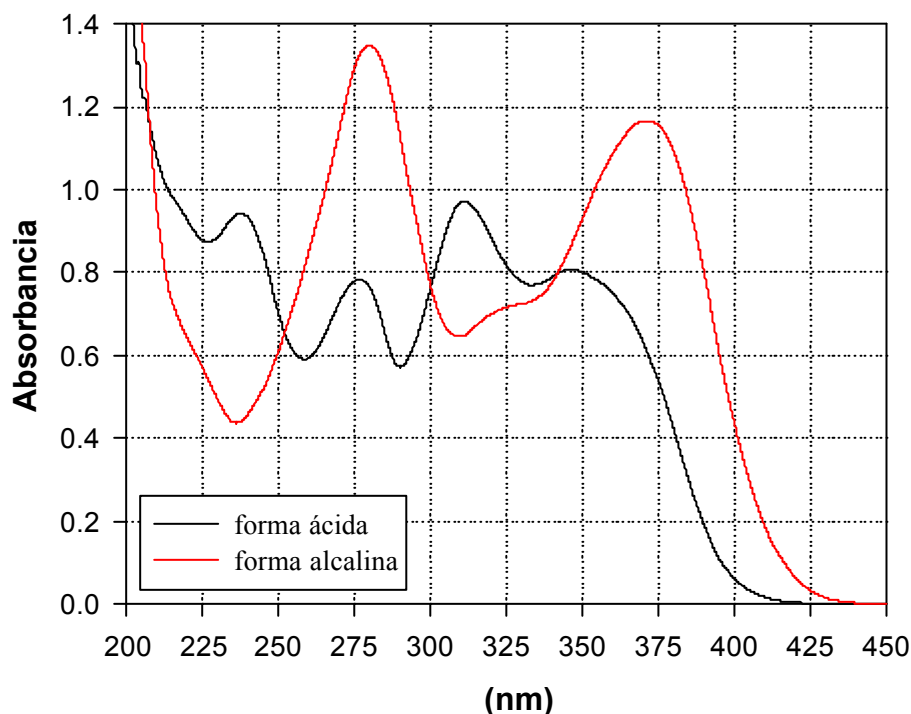


Figura 9.4. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la 6-formilpterina. Solución acuosa de 6-formilpterina (90 M). Camino óptico: 1 cm.

	Ka		Ka	<u>Promedio</u>
274	$4,89 \times 10^{-8}$	374	$4,64 \times 10^{-8}$	Ka= $4,68 \times 10^{-8}$
278	$4,97 \times 10^{-8}$	378	$4,64 \times 10^{-8}$	$\sigma_{n-1} = 1,5 \times 10^{-9}$
310	$4,49 \times 10^{-8}$	382	$4,64 \times 10^{-8}$	CV%= 3,2
314	$4,59 \times 10^{-8}$	388	$4,63 \times 10^{-8}$	pKa= 7,33
370	$4,65 \times 10^{-8}$			

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 $8,83 \times 10^{-4}$ (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 ($pK_a = 1,26$).

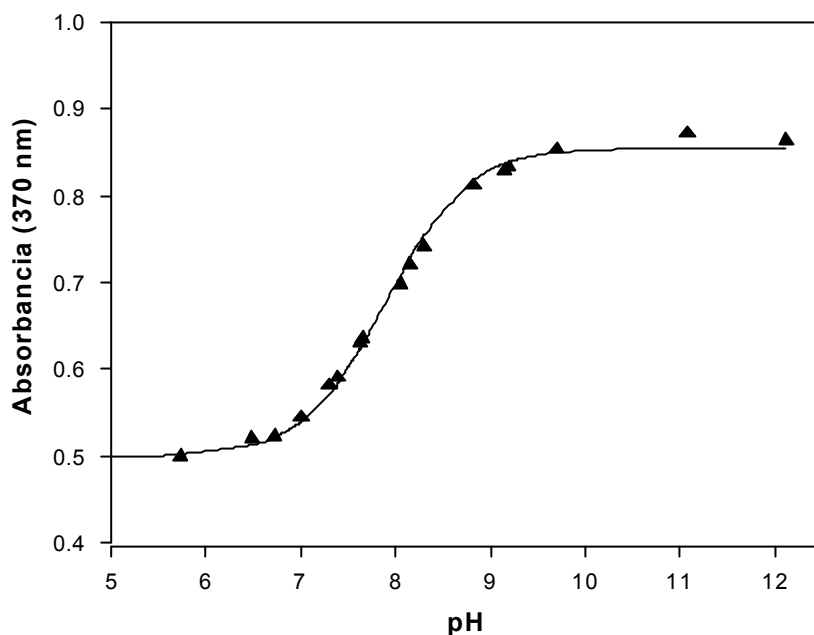


Figura 9.5. Curva de titulación a 370 nm para una solución de 6-carboxipterina (100 M). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación teórica.

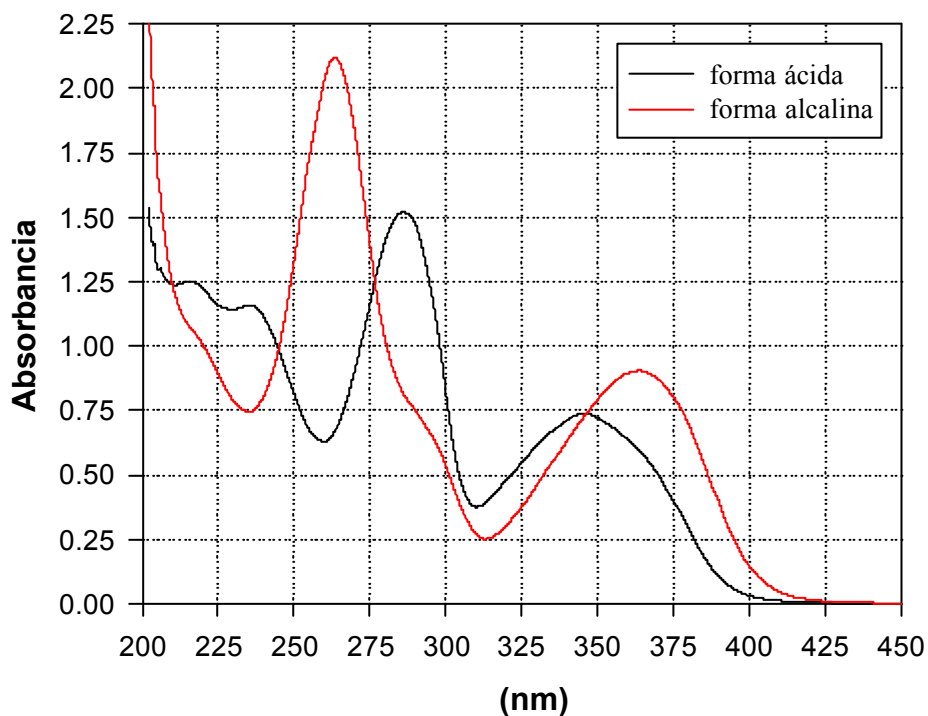


Figura 9.6. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la 6-carboxipterina. Solución acuosa de 6-carboxipterina (100 M). Camino óptico: 1 cm.

	Ka		Ka	Promedio Ka= 1,30x10⁻⁸ σ_{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.

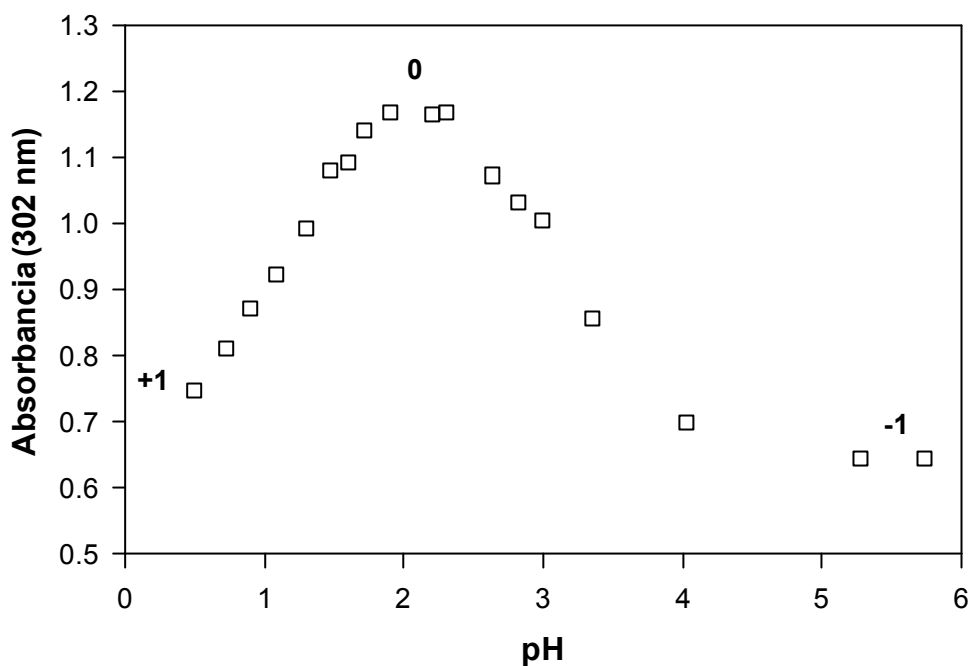


Figura 9.7. Curva de titulación a 302 nm para una solución de 6-carboxipterina (100 M). Se consigna la carga neta de las formas que predominan en distintas zonas de pH.

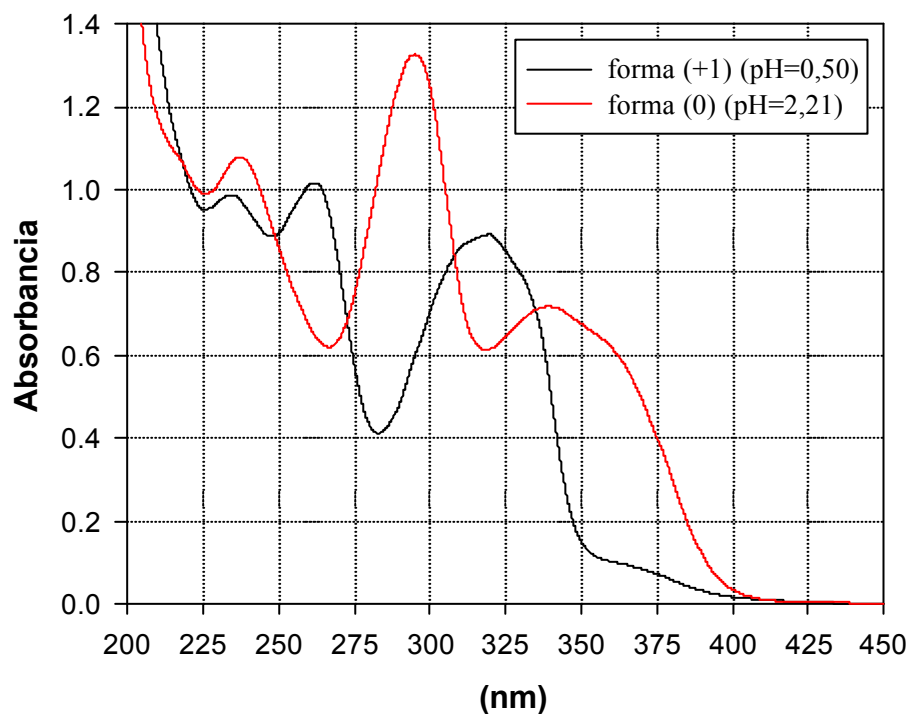


Figura 9.8. Espectros de absorción de las formas con carga neta 0 y +1 de la 6-carboxipterina. Solución acuosa de 6-carboxipterina (100 M). Camino óptico: 1 cm.

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.

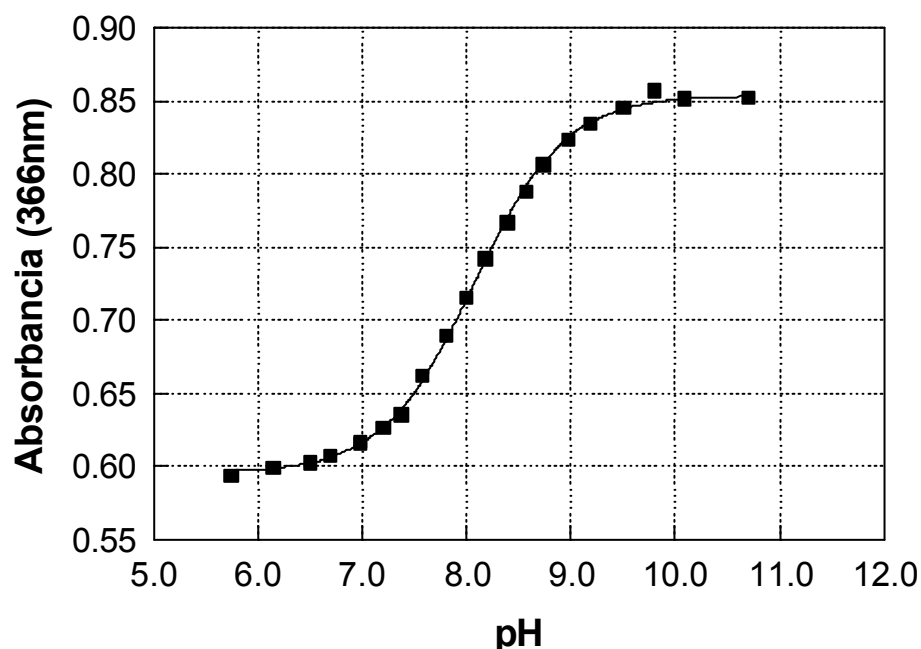


Figura 9.9. Curva de titulación a 366 nm para una solución de ácido fólico (100 M). La línea representa la regresión no lineal realizada con la ecuación teórica.

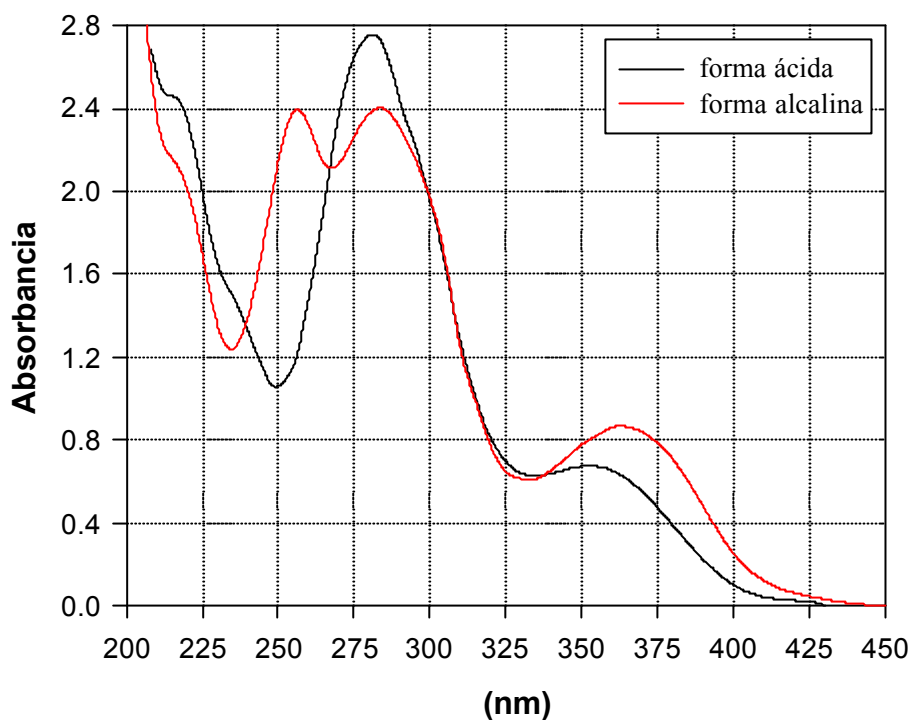


Figura 9.10. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina del ácido fólico. Solución acuosa de ácido fólico (100 M). Camino óptico: 1 cm.

	Ka		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 ente 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.

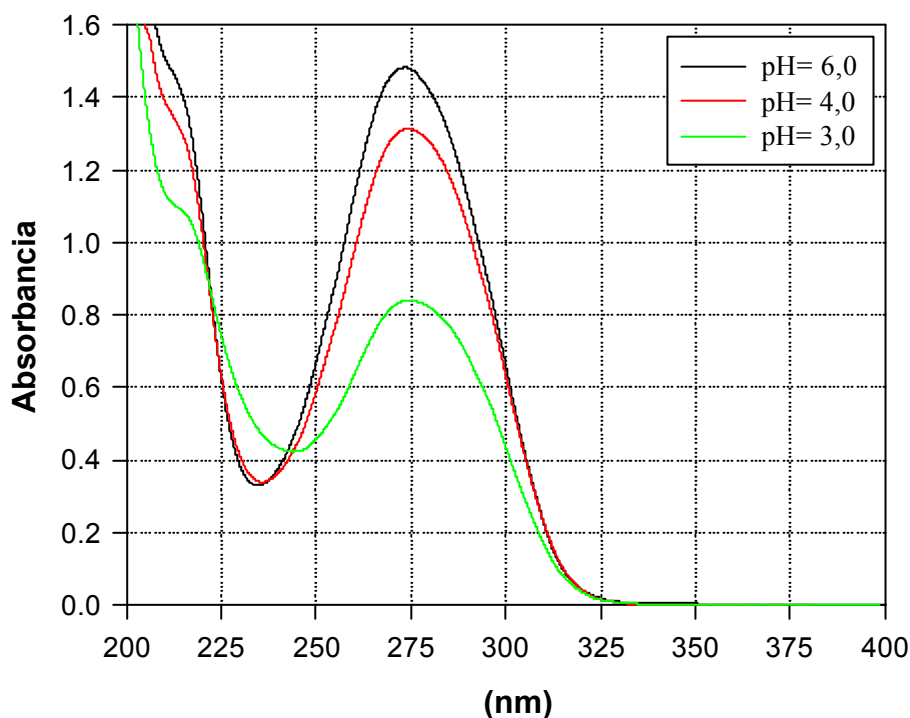


Figura 9.11. Espectros de absorción de una solución 100 M de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Camino óptico: 1 cm.

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.

Capítulo 10.

Fotólisis de ácido fólico.

En este capítulo se presentan los resultados de los experimentos realizados irradiando soluciones ligeramente ácidas de ácido fólico. En estas condiciones, según lo expuesto en el capítulo anterior, está presente, casi exclusivamente, la forma ácida de este compuesto. Antes de comenzar con el desarrollo es necesario adelantar algunos comportamientos generales para tener en cuenta cómo se organiza este capítulo.

Durante la fotólisis del ácido fólico se generan productos que, a su vez, son fotosensibles. Para minimizar los procesos de fotólisis secundaria se trabajó, tal como se explicó en la sección 6.2, con soluciones de ácido fólico lo suficientemente concentradas como para que más de 99,9% de la luz sea absorbida inicialmente por dicho compuesto, actuando, de esta manera, como filtro interno para los fotoproductos. Bajo estas condiciones experimentales se identificaron los productos de reacción y se calcularon los correspondientes rendimientos cuánticos.

Con el objetivo de determinar la participación del O_2 en la reacción de fotodescomposición del ácido fólico, se comparan los resultados obtenidos en presencia y ausencia del mismo. Por otro lado, se presentan los resultados de la investigación del papel del 1O_2 en el mecanismo de la reacción.

En estas condiciones experimentales de concentración y en presencia de O_2 , los cambios observados durante la fotólisis estacionaria pueden dividirse en dos etapas. Una que ocurre dentro de los primeros 5 minutos de irradiación y otra que ocurre posteriormente. A continuación y, con el objeto de exponer más claramente los resultados, se presentarán ambas etapas en dos secciones separadas.

10.1. Primera etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O₂.

En la figura 10.1 pueden apreciarse los cambios espectrales que experimenta una solución acuosa ligeramente ácida de ácido fólico cuando se irradia con luz UV-A. En la figura 10.1.b se muestran los correspondientes espectros DE. Puede observarse la existencia de cuatro puntos isobéuticos bien definidos en 216, 238, 269 y 314 nm; los cuales se mantienen invariantes durante aproximadamente 8 minutos de irradiación. Luego de este período se produce un corrimiento gradual de dichos puntos isobéuticos e, incluso, aparece uno nuevo cerca de los 400 nm (espectros presentados más adelante). Estos resultados indican que existe un único proceso fotoquímico en los primeros minutos de la fotólisis y posteriormente se produce la aparición de otros procesos secundarios.

Como puede observarse en la figura 10.2, el espectro DEN de esta reacción se corresponde bastante bien con el espectro DTN, obtenido a partir de los espectros de la 6-formilpterina y el ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Como se mencionó en el capítulo 3, estas sustancias fueron propuestas por Lowry como fotoproductos del ácido fólico. Debido a esto, y a pesar de que las condiciones de pH en las cuales fue realizado tal estudio son muy diferentes, las mencionadas sustancias fueron seleccionadas para realizar la comparación de espectros diferencia.

Los experimentos de TLC muestran la presencia dos manchas fluorescentes en las soluciones irradiadas de ácido fólico, con valores de R_f que se corresponden a los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Cabe recordar que las manchas de ácido fólico no presentan fluorescencia en estas condiciones experimentales. La figura 10.3 muestra una placa de TLC en la que fue sembrada una solución de ácido fólico a distintos tiempos de irradiación. Puede apreciarse en la foto que la 6-formilpterina aparece antes que la 6-carboxipterina, sugiriendo que este último compuesto se genera en una etapa posterior.

El ácido *p*-aminobenzoilglutámico, por su parte, tampoco puede ser revelado por luz UV-A. Por este motivo, se recurrió a la utilización de placas de celulosa con marcador fluorescente (ver sección 7.3). En experimentos realizados con el correspondiente patrón, se observó que el mismo corre junto con el frente del solvente. Se sembraron soluciones de ácido fólico irradiadas y sin irradiar y pudo observarse que en las primeras existía una mancha a la altura del frente del solvente que no aparecía en las segundas. Este resultado muestra la presencia de una sustancia con las características del ácido *p*-aminobenzoilglutámico en las

soluciones iluminadas de ácido fólico.

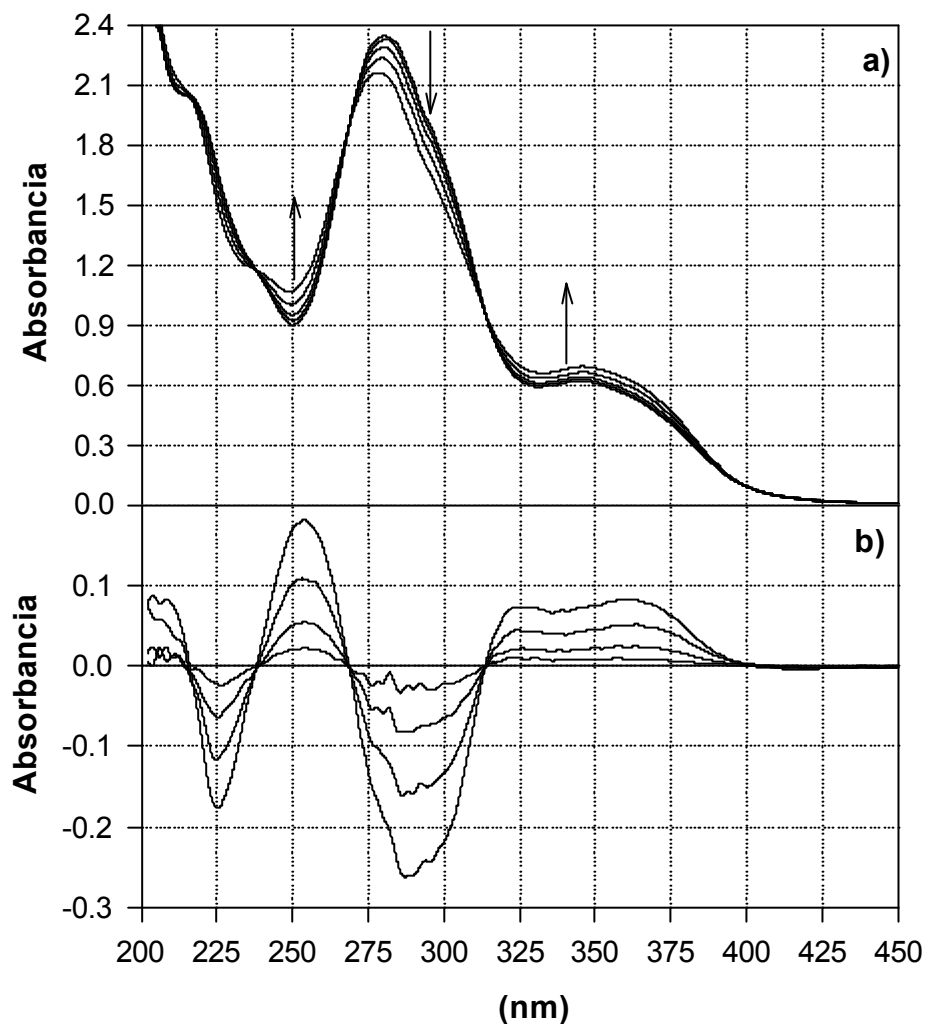


Figura 10.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes.

La presencia de 6-formilpterina en las soluciones irradiadas fue confirmada por los experimentos de HPLC. En la figura 10.4 pueden observarse los cromatogramas correspondientes a una solución de 6-formilpterina, una solución de ácido fólico no irradiada y otra irradiada durante 3 minutos.

Se realizaron monitoreos cromatográficos con soluciones irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Las áreas de los picos fueron integradas y transformadas a concentración empleando los coeficientes obtenidos en las correspondientes curvas de calibración.

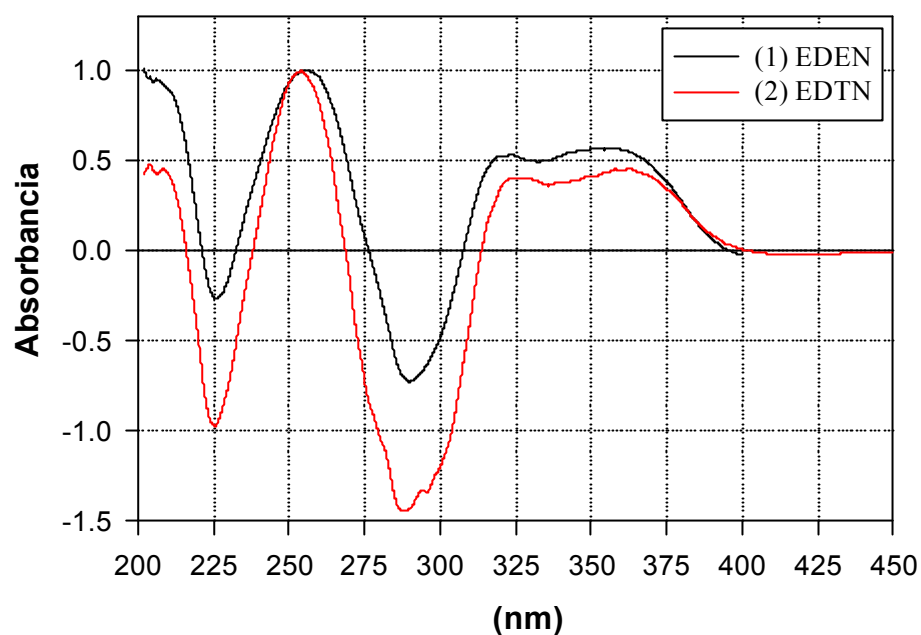


Figura 10.2. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 8 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución que contiene 6-formilpterina 100 μ M y ácido *p*-aminobenzoilglutámico 100 μ M y otra solución de ácido fólico de la misma concentración.

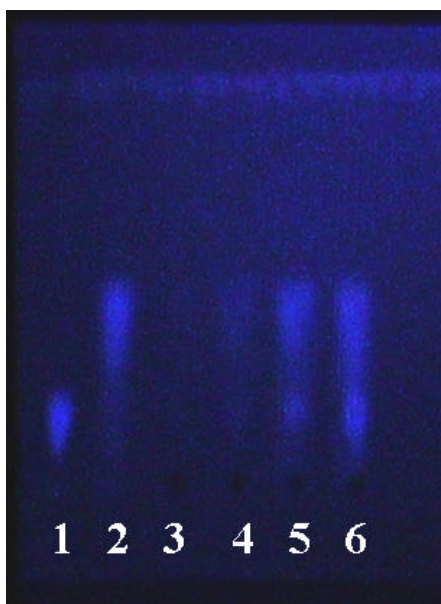


Figura 10.3. Corrida de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 150 μ M; 2, solución de 6-formilpterina 150 μ M; 3, solución de ácido fólico 450 μ M; calles 4, 5 y 6 solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) irradiada con luz de 350 nm; 2 min 6 min y 12 min respectivamente.

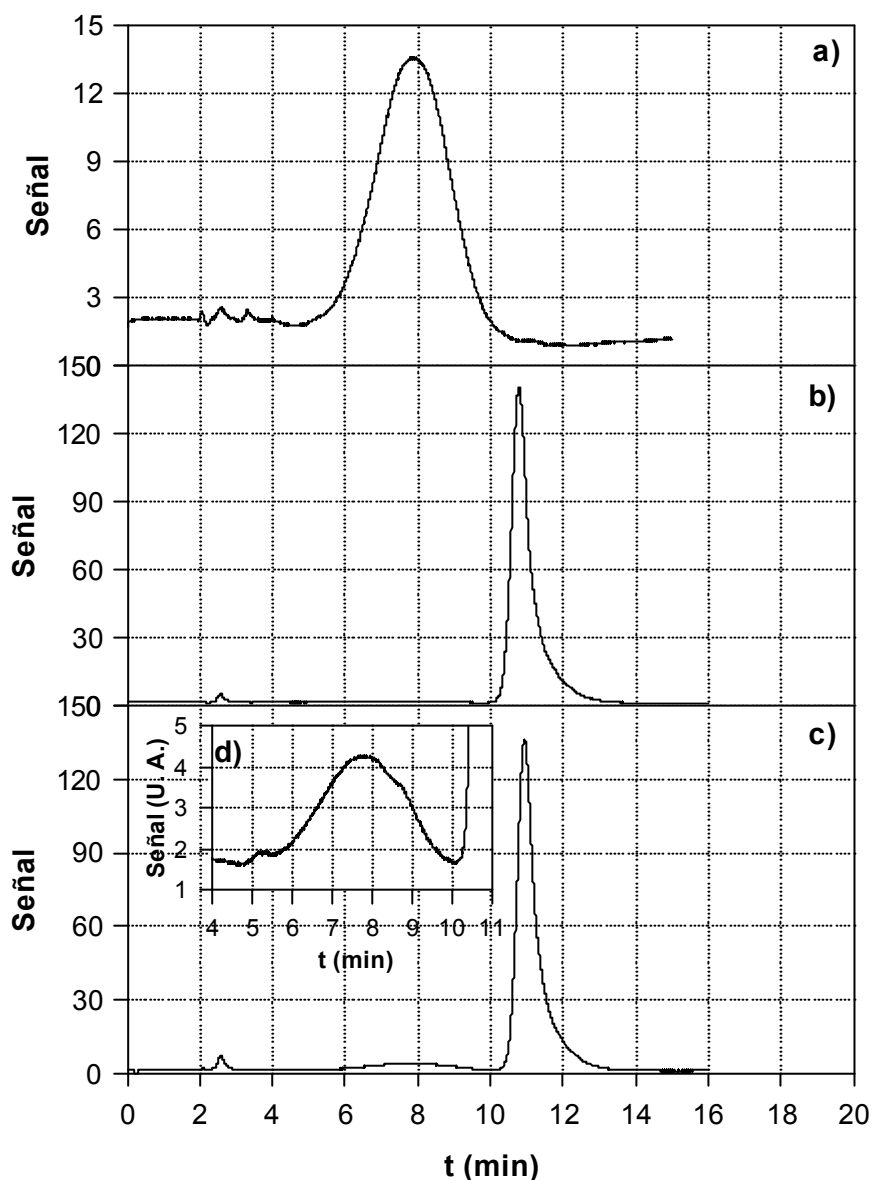


Figura 10.4. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de 6-formilpterina 150 μ M. b) Solución de ácido fólico 600 μ M. c) Solución de ácido fólico 600 μ M irradiada 3 min con luz UV-A de 350 nm. Para los tres cromatogramas la longitud de onda de análisis fue 340 nm. d) detalle del cromatograma c en la zona del pico de la 6-formilpterina.

La figura 10.5 muestra la evolución de las concentraciones de ácido fólico y 6-formilpterina. Puede observarse, en ambos casos, un comportamiento lineal. De las pendientes obtenidas a partir de las correspondientes regresiones lineales se obtuvieron las velocidades de consumo de ácido fólico ($-10,9 \pm 0,7 \mu\text{M}/\text{min}$) y de producción de 6-formilpterina ($10,6 \pm 0,3 \mu\text{M}/\text{min}$). Como este experimento se realizó en condiciones tales

que el ácido fólico absorbe toda la luz incidente, pueden calcularse directamente los rendimientos cuánticos. Los valores obtenidos en ambas curvas son iguales ($2,5 \times 10^{-2}$) dentro del error experimental, indicando que, en estas condiciones, existe una única vía de descomposición fotoquímica del ácido fólico que es su transformación a 6-formilpterina.

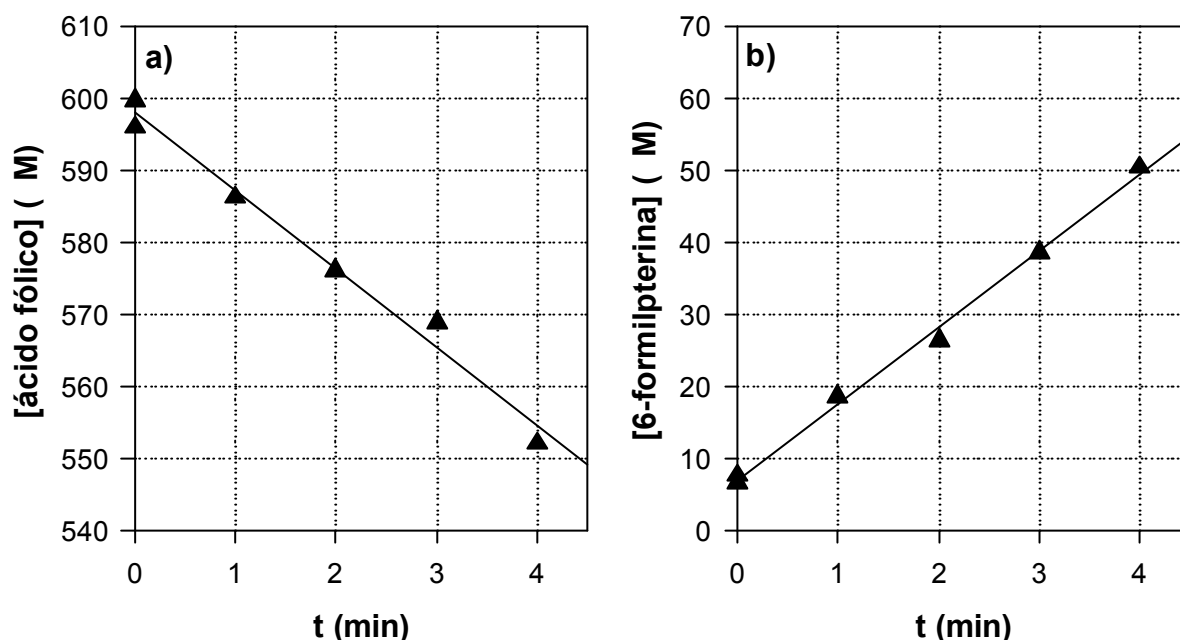


Figura 10.5. Evolución de las concentraciones de ácido fólico (a) y 6-formilpterina (b), determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 μM y pH= 6,0.

Como se aprecia en la figura 10.5.b la solución no irradiada de ácido fólico ($t=0$ min) contiene aproximadamente 7 μM de 6-formilpterina. Esta contaminación puede tener su origen en ciertas impurezas del sólido a partir del cual se preparan las soluciones o puede generarse en la solución ya preparada como consecuencia de la acción de la luz ambiental. Sin embargo, estas impurezas no interfieren en el análisis de los resultados ya que la luz absorbida por las mismas es menor al 2% de la luz absorbida por el ácido fólico.

Como se muestra en la figura 10.6.a, en las soluciones no irradiadas de ácido fólico también se detecta la presencia de trazas de 6-carboxipterina. Para investigar la evolución de este compuesto durante la fotólisis, se lo cuantificó en soluciones irradiadas durante distintos períodos. Estos resultados se muestran en la figura 10.6.b. Puede observarse que la concentración de 6-carboxipterina prácticamente no varía en los primeros 4 minutos de fotólisis que es el período de tiempo que se usó para realizar los cálculos de los rendimientos cuánticos presentados anteriormente. Esta observación tiene dos implicaciones que merecen

ser mencionadas. Como se explicará más adelante, la 6-carboxipterina es también fotosensible, por lo tanto, la no disminución de la concentración implica que la luz no actúa sobre la 6-carboxipterina por ser absorbida totalmente por el ácido fólico (condición buscada empleando concentraciones elevadas del mismo). Por otro lado, el hecho de que tampoco aumente significa que la luz tampoco fotoliza a la 6-formilpterina, la cual es a su vez, también fotosensible. Este último punto es de particular importancia ya que, como se explicará en la próxima sección, descarta la participación de la 6-formilpterina en la primera etapa de la fotólisis.

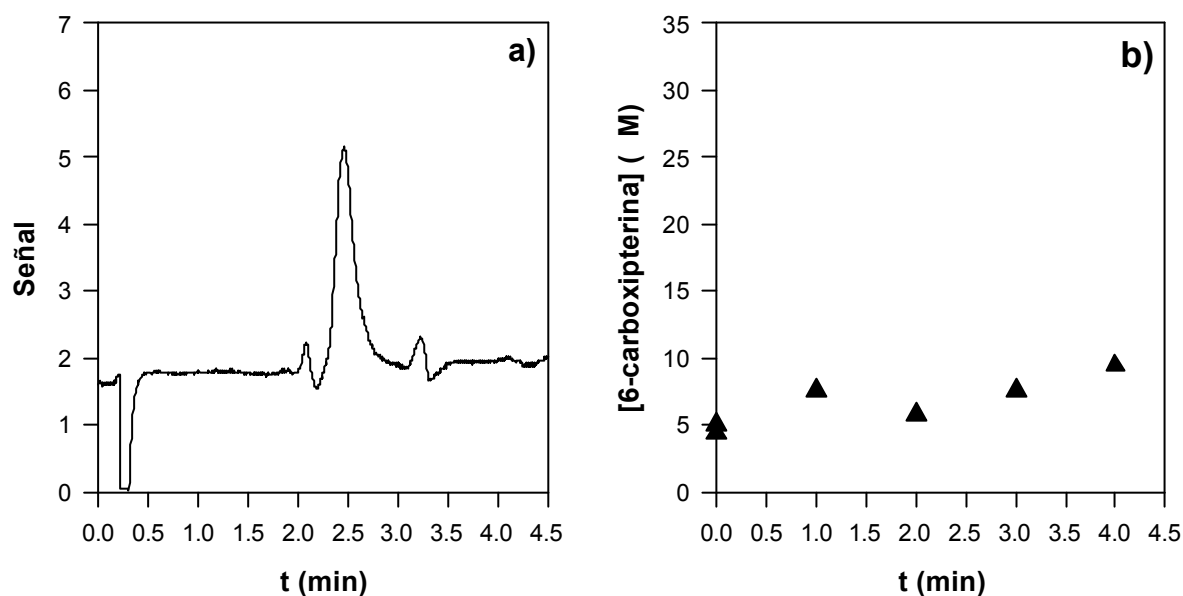


Figura 10.6. (a) Pico de 6-carboxipterina presente en el cromatograma de una solución de ácido fólico 600 M no irradiada. La longitud de onda de análisis fue 340 nm (b) Evolución de la concentraciones de 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 M y pH= 6,0.

Durante el período de análisis, se investigó también la presencia de ácido *p*-aminobenzoilglutámico en las soluciones irradiadas de ácido fólico. Como se mostró en el espectro de la figura 9.11, este compuesto, a diferencia de las pterinas, no absorbe luz a 340 nm, por lo cual, para realizar el cromatograma de la correspondiente solución patrón, se fijó la longitud de onda de análisis en 280 nm. Por otro lado, en las condiciones de corrida empleadas, los valores de k' de este compuesto y de 6-carboxipterina son próximos entre sí. Debido a esto, en ensayos realizados con soluciones que contenían mezclas de ambos compuestos se observa que los dos picos salen parcialmente solapados.

Se realizaron corridas cromatográficas sobre las soluciones irradiadas empleando ambas longitudes de onda de análisis (280 y 340 nm). Como puede observarse en las figuras 10.7.a y 10.7.b los cromatogramas de soluciones irradiadas de ácido fólico presentan en los primeros 6 minutos de corrida 2 picos si la longitud de onda es 280 nm y un solo pico si la misma es de 340 nm. El t_R de este último pico coincide con el t_R del primer pico de los cromatogramas a 280 nm y con el t_R del patrón de 6-carboxipterina. Por otro lado, el segundo pico de los cromatogramas a 280 nm presenta un t_R similar al del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico (figura 10.7.c). Por último, la figura 10.7.d muestra la suma de los cromatogramas, a 280 nm, de los patrones de ambas sustancias. El análisis de estos resultados muestra que el ácido *p*-aminobenzoilglutámico, a diferencia de la 6-carboxipterina, se genera en los primeros minutos de la fotólisis del ácido fólico.

Para cuantificar el ácido *p*-aminobenzoilglutámico se realizó una curva de calibración a 280 nm empleando soluciones preparadas a partir de un patrón. Sin embargo, debido al solapamiento entre el pico de este compuesto con el de la 6-carboxipterina en los cromatogramas de las soluciones de ácido fólico irradiadas, el área del pico del primer compuesto no puede integrarse directamente. Para solucionar este problema se integraron ambos picos juntos y posteriormente se restó el área correspondiente a la 6-carboxipterina.

Para obtener el área de la 6-carboxipterina en los cromatogramas realizados con longitud de onda de análisis de 280 nm se procedió de la siguiente manera. Cada solución irradiada de ácido fólico se analizó a 280 y 340 nm. De los cromatogramas a 340 nm (el ácido *p*-aminobenzoilglutámico no aparece) se cuantificó la 6-carboxipterina usando una curva de calibración realizada a esa longitud de onda. Con la concentración obtenida de esta manera, se calculó el área del pico que le corresponde a dicho compuesto en los cromatogramas realizados a 280 nm, lo cual se realizó a partir de otra curva de calibración empleando esta longitud de onda de análisis.

En la figura 10.8 se muestra la evolución de la concentración de ácido *p*-aminobenzoilglutámico durante la fotólisis del ácido fólico. Aunque son pocos los puntos obtenidos en este experimento, se pueden realizar algunas consideraciones cuantitativas. Para los 3 primeros minutos se obtiene una pendiente de 12,5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Este valor, levemente mayor, es comparable a las velocidades de consumo de ácido fólico y de producción de 6-formilpterina (10,9 y 10,6 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). En este experimento se detectó un aumento de la concentración de 6-carboxipterina a los 3 minutos de irradiación, lo cual, como

se explicó anteriormente, indica que la 6-formilpterina se ha comenzado a fotolizar. Si no se tiene en cuenta este dato, se obtiene una pendiente de $11,0 \mu\text{M}/\text{min}$.

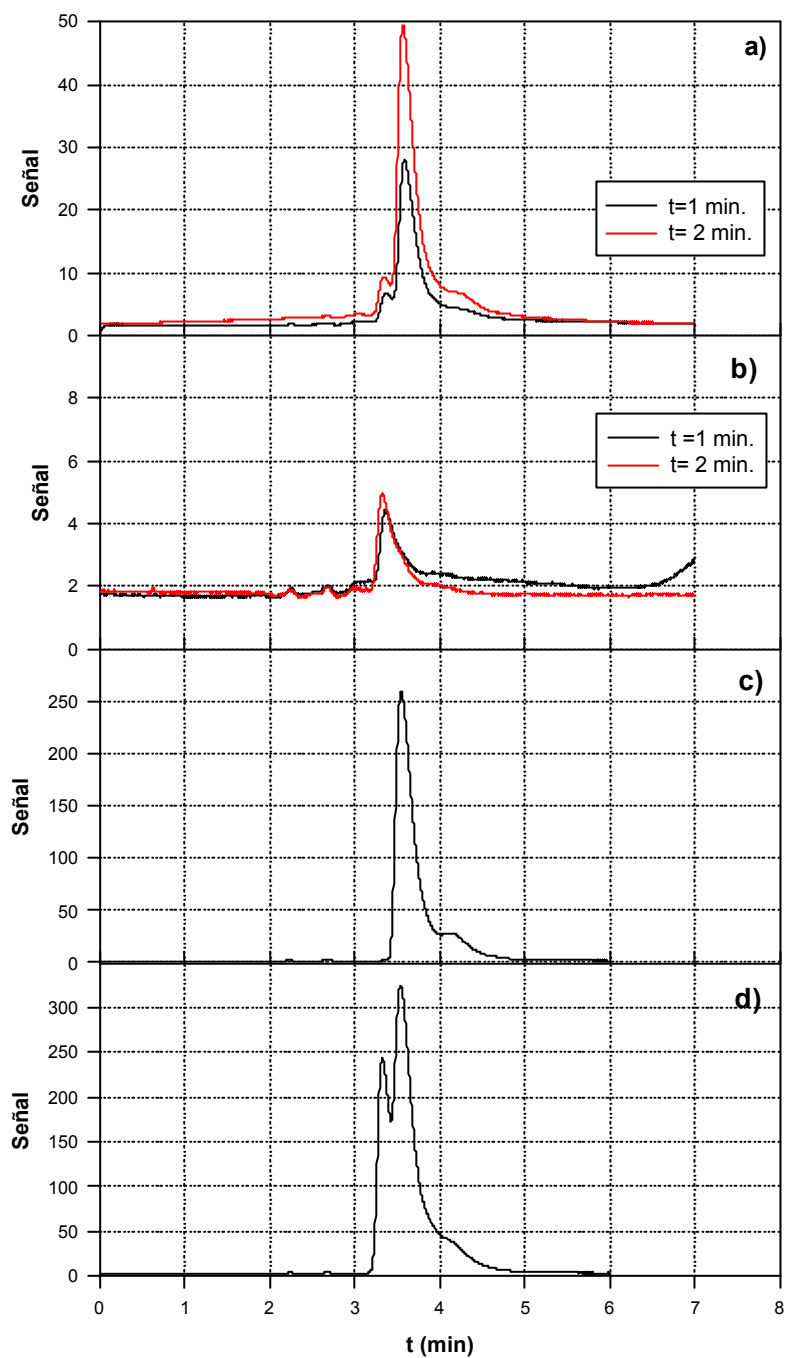


Figura 10.7. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de ácido fólico 700 M (pH= 5,9) irradiada. de análisis= 280 nm . b) Solución de ácido fólico 700 M (pH= 5,9) irradiada. de análisis= 340 nm . c) Solución de ácido *p*-aminobenzoilglutámico 200 M . de análisis= 280 nm . d). Suma de los cromatogramas de una solución de 6-carboxipterina 200 M y de una solución de ácido *p*-aminobenzoilglutámico 200 M . de análisis= 280 nm .

Estos resultados permiten establecer una relación 1:1 entre el ácido fólico consumido durante los primeros minutos de la fotólisis y el ácido *p*-aminobenzoilglutámico producido. De la misma manera existe una relación 1:1 entre la formación de este compuesto y de 6-formilpterina.

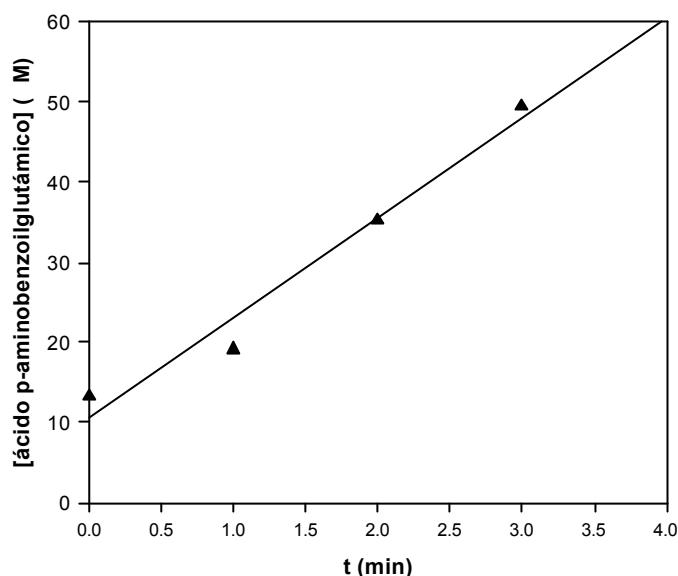


Figura 10.8. Evolución de la concentraciones de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 600 M y pH= 6,0.

10.2. Segunda etapa de la fotólisis de ácido fólico en presencia de O₂.

El comportamiento de los distintos parámetros medidos, explicado en la sección anterior, cambia al avanzar la fotólisis de soluciones de ácido fólico. En la figura 10.9 puede observarse como, para tiempos de irradiación mayores que 8 minutos, los puntos isobéuticos, mostrados en la figura 10.1, comienzan a variar.

Estas modificaciones en los espectros DE pueden atribuirse a la fotólisis de la 6-formilpterina para generar 6-carboxipterina. En esta etapa, la luz es absorbida tanto por el ácido fólico como por la 6-formilpterina y, por ende, ocurren las dos reacciones simultáneamente. Como muestra la figura 10.3, los experimentos de TLC ponen en evidencia la presencia de 6-carboxipterina en las soluciones irradiadas durante más de 5 minutos. Por otra parte, los experimentos de HPLC revelan el mismo tipo de resultados. En efecto, luego de los primeros 5 minutos de irradiación el pico correspondiente a dicha sustancia aumenta

considerablemente. En la figura 10.10 se muestra un cromatograma obtenido a los 16 minutos de irradiación, en el cual puede observarse la presencia de una cantidad importante de 6-carboxipterina en la solución irradiada. Compárese con los cromatogramas de la figura 10.4 en los que este pico es despreciable frente al del ácido fólico.

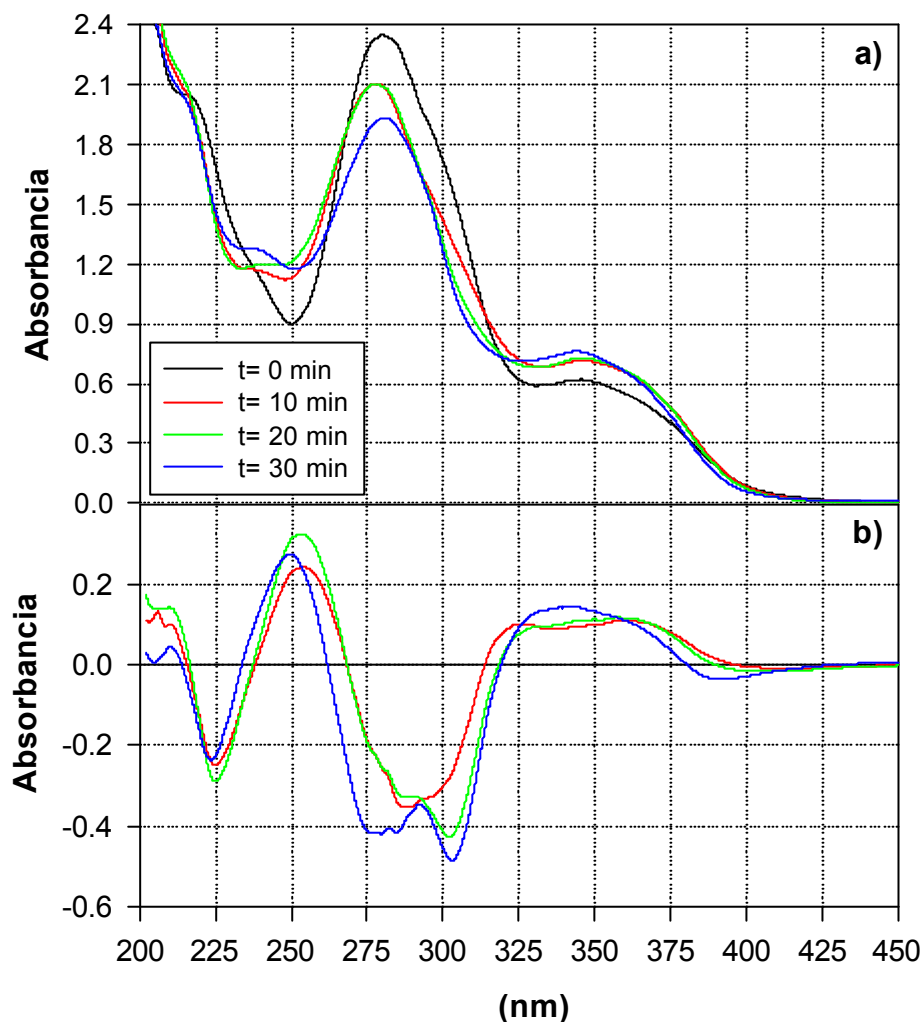


Figura 10.9. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O₂. Este experimento es el mismo que el de la figura 10.1, pero se muestran los espectros obtenidos a mayores tiempos de irradiación. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes a los espectros absolutos de a).

Como se verá más adelante, en ciertas condiciones experimentales, las soluciones irradiadas muestran procesos térmicos lo suficientemente lentos como para ser estudiados por espectrofotometría y aún, en ciertas circunstancias, por HPLC. Para determinar si en las

presentes condiciones experimentales existe este tipo de procesos, se realizaron algunos experimentos en los cuales se dejaron reposar en la oscuridad soluciones de ácido fólico previamente irradiadas. A intervalos regulares de tiempo, tomados a partir del momento de interrumpir la irradiación, se registraron los espectros de absorción de dichas soluciones. En ninguna de las pruebas realizadas se detectaron cambios espectrales significativos producidos en la oscuridad luego de la fotólisis. En la figura 10.11.a se muestran los resultados de uno de los experimentos realizados en este sentido.

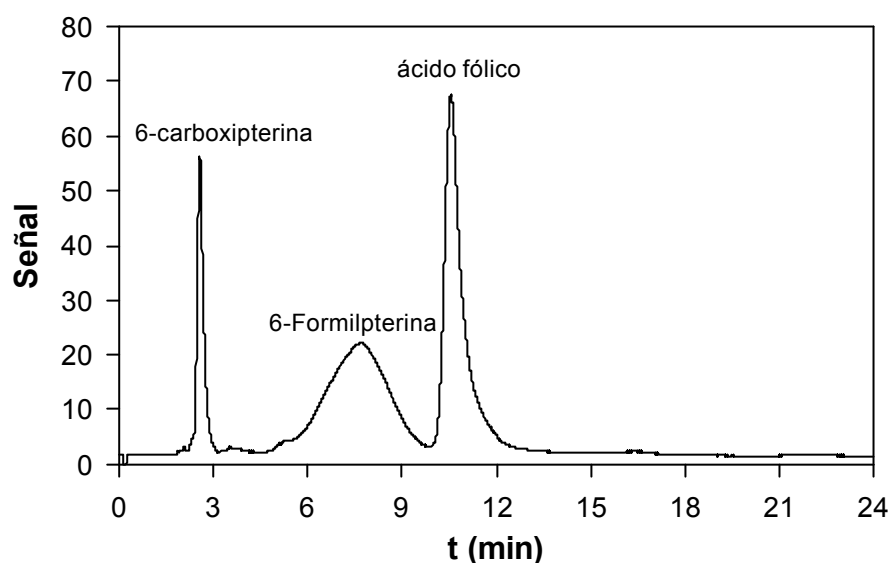


Figura 10.10. Cromatograma de una solución de ácido fólico (600 M, pH=6,0) irradiada durante 16 minutos con luz UV-A de 350 nm.

Mezclas de ácido fólico y 6-formilpterina fueron dejadas en la oscuridad varios días y se compararon los espectros de absorción a distintos tiempos a partir de la preparación. En ningún caso se observaron variaciones espectrales. Además el espectro de las soluciones mezclas siempre pudo ser reproducido a partir de los espectros de las soluciones de ambos componentes por separado. Estos resultados, junto con los anteriores, permiten inferir que no existe reacción térmica que involucre a estas dos sustancias. Este punto es muy importante para entender el fenómeno que se describirá, en esta misma sección, en las próximas páginas.

Tal como será explicado más adelante, existe un fotoproducto proveniente de la fotodescomposición del ácido fólico en medio alcalino que pudo ser aislado, bajo ciertas condiciones, pero que se descompone rápidamente en soluciones fuertemente alcalinas (pH>12). Este producto puede ser detectado, tanto por HPLC como por TLC, con R_f y R_f

característicos. La aplicación de estas dos técnicas a las soluciones de ácido fólico irradiadas en medio ácido no revela la presencia del citado producto. Sin embargo, para descartar definitivamente su presencia, se realizó un experimento más. Se tomó una solución irradiada a pH 6,0, mediante el agregado de solución de NaOH se la llevó a pH 12, se la dejó 30 minutos y, por último, se volvió, con el agregado de solución de HCl, al pH original. Tanto en el agregado de la base como en el del ácido los volúmenes empleados fueron muy pequeños, de tal manera de no modificar el espectro de absorción por efecto de la dilución. Si hubiera estado presente el fotoproducto en cuestión se hubiera observado un cambio neto del espectro por su transformación térmica a otra sustancia, pero esto no tiene lugar.

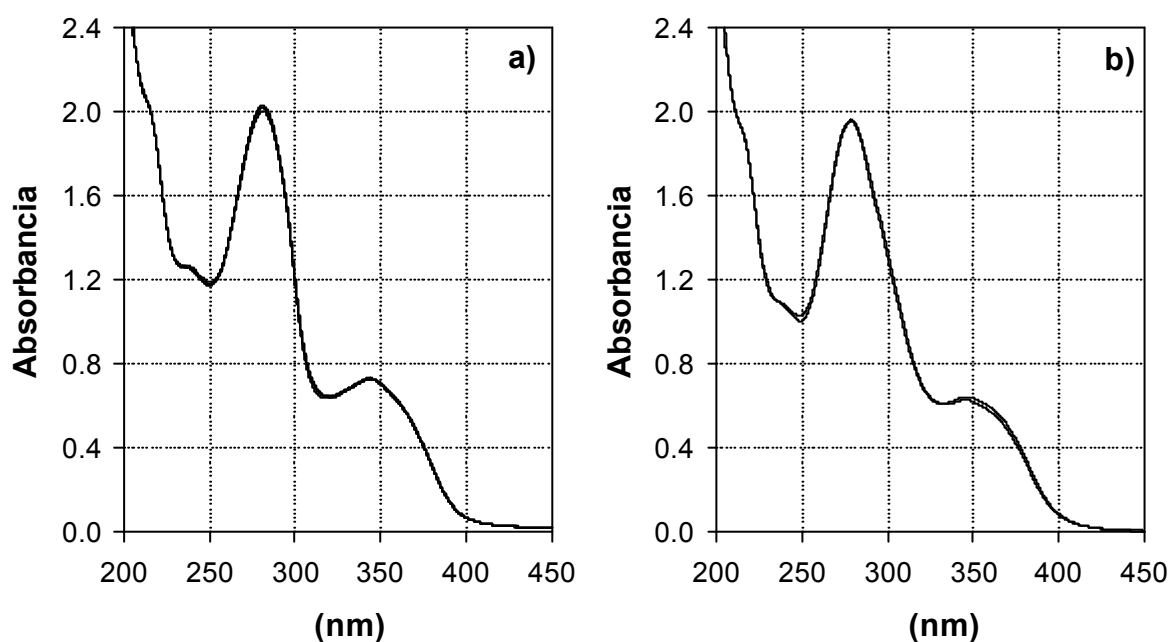


Figura 10.11. a) Espectros de absorción de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 6,0) irradiada en presencia de O₂ durante 40 min y luego dejada en la oscuridad. Los tiempos a los cuales corresponden los espectros son: 0 min (inmediatamente después de interrumpir la iluminación), 25, 50 y 90 min. b) Espectros de una solución irradiada y otra irradiada, alcalinizada y vuelta a acidificar al pH original (ver explicación del texto). Para los experimentos correspondientes a las dos figuras los caminos ópticos para la irradiación y la observación son 1 y 0,2 cm, respectivamente.

Se cuantificaron simultáneamente por HPLC ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación. Se observan aumentos en la velocidad de consumo del ácido fólico y en la velocidad de generación de 6-formilpterina luego de los

primeros 4 a 5 minutos de fotólisis. Estos resultados se muestran en la figura 10.12 que corresponde al mismo experimento de la figura 10.5. Obsérvese que el inicio de este efecto coincide temporalmente con un aumento en la concentración de 6-carboxipterina; es decir, con el comienzo de la etapa en la cual la 6-formilpterina absorbe una cantidad no despreciable de luz y su transformación a 6-carboxipterina se pone en evidencia. Estas observaciones sugieren que la 6-formilpterina excitada por la absorción de la luz, acelera, mediante algún mecanismo, su generación a partir del ácido fólico.

Puede apreciarse además que durante los primeros 14 minutos de fotólisis la suma de las concentraciones de las tres sustancias analizadas permanece constante. Por lo tanto, durante este período no hay otras reacciones diferentes a las ya mencionadas.

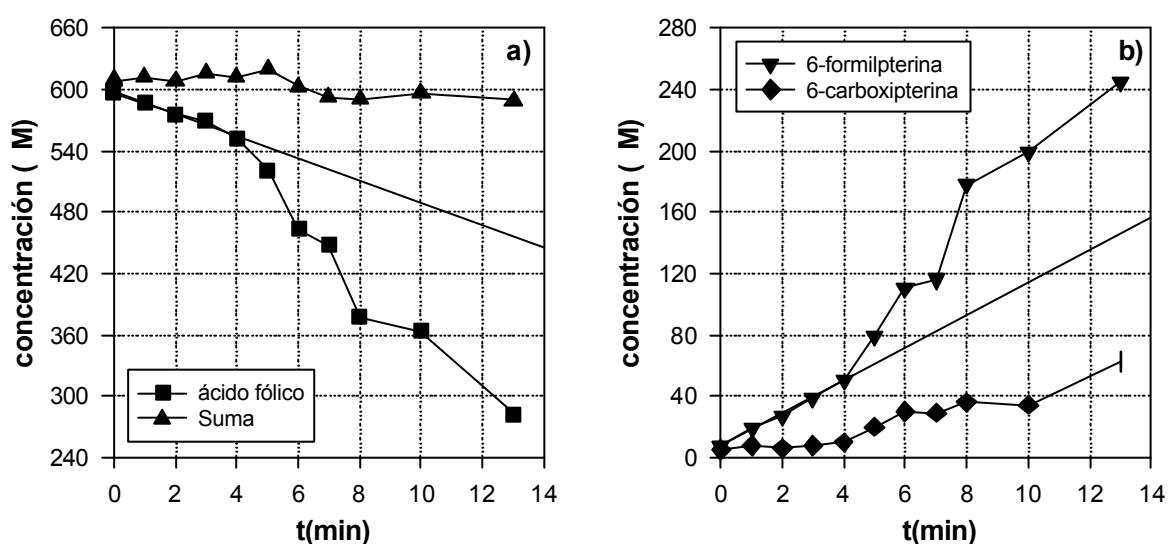


Figura 10.12. a) Evolución en el tiempo de la concentración del ácido fólico durante la fotólisis. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 10.5.a. Se observa también la suma de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. b) Evolución con el tiempo de irradiación de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 10.5.b.

En la figura 10.13 se muestran los resultados de un experimento completo. Puede observarse que la velocidad de consumo del ácido fólico disminuye luego de los 15 minutos de irradiación. Esto puede explicarse porque la cantidad de luz absorbida por el mismo ha disminuido mucho en esta etapa. La competencia entre las velocidades de producción y consumo de 6-formilpterina hace que su concentración pase por un máximo a los 12 minutos

aproximadamente y luego comience disminuir. La 6-carboxipterina, por su parte, aumenta a lo largo de todo el experimento. La suma de las concentraciones de las tres especies disminuye suavemente, sobre todo después de los 20 minutos. Esto obedece a que la 6-carboxipterina, a su vez, se fotoliza, pero sobre esto se hablará más adelante.

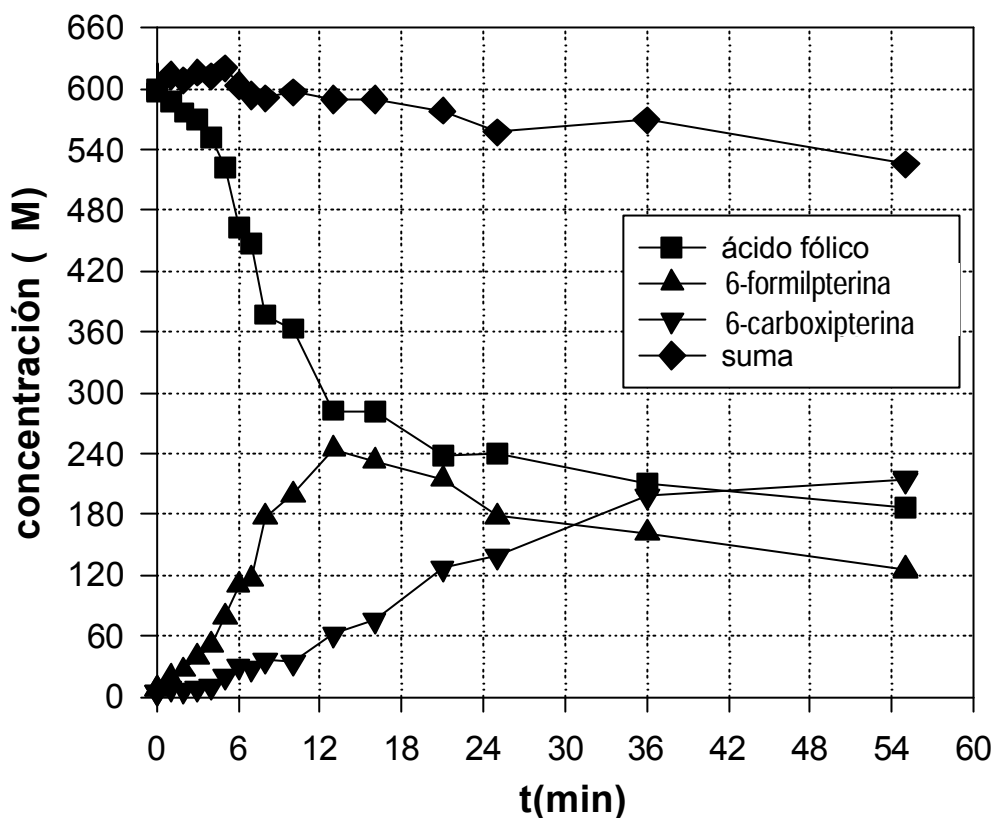


Figura 10.13. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante 55 minutos de fotólisis de una solución de ácido fólico 600 M y pH= 6,0.

Para corroborar la existencia del fenómeno de aumento de la velocidad de descomposición del ácido fólico por la presencia de 6-formilpterina se realizó otro experimento en el cual se partió de una mezcla de ambas sustancias. Se irradió una solución que contenía 43 μM de ácido fólico y 53 μM de 6-formilpterina. Puede calcularse la cantidad de luz incidente que absorbe cada compuesto inicialmente teniendo en cuenta los respectivos ϵ a 350 nm, las concentraciones y la cantidad total de luz incidente.

$$I_a^{AF} = \frac{\epsilon_{350}^{AF} \cdot [AF]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_a \quad (1)$$

$$I_a^{FPT} = \frac{\epsilon_{350}^{FPT} \cdot [FPT]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot I_a \quad (2)$$

en estas ecuaciones AF representa al ácido fólico y FPT a la 6-formilpterina, I_a^i es la intensidad de luz absorbida por el componente i e I_a es la intensidad de luz absorbida total ($\sum I_a^i$).

Considerando despreciable la luz absorbida inicialmente por la 6-carboxipterina, puede calcularse I_a a partir de la absorbancia del ácido fólico (A^{AF}) y la absorbancia de la 6-formilpterina (A^{FPT}).

$$A^{AF} = \epsilon_{350}^{AF} \cdot l \cdot [AF] = 6.757 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 4,29 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0.230$$

$$A^{FPT} = \epsilon_{350}^{FPT} \cdot l \cdot [FPT] = 9.779 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 5,29 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0.517$$

La absorbancia total de la solución (A^T) será:

$$A^T = A^{AF} + A^{FPT} = 0.230 + 0.517 = 0.747$$

La ecuación que relaciona I_a , con A^T y la intensidad de luz incidente (I_0) es la siguiente.

$$I_a = I_0 \cdot (1 - 10^{-A^T}) \quad (3)$$

En la parte experimental se detalló como se midió I_a . Las intensidades de luz tienen unidades de moles de fotones por litro de solución y por minuto (M/min).

$$I_a = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min} \cdot (1 - 10^{-0.747}) = 3,5 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Con este valor pueden calcularse I_a^{AF} y I_a^{FPT} iniciales, es decir en el momento de iniciar la irradiación, a partir de las ecuaciones (1) y (2).

$$I_a^{AF} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ M/min} \quad I_a^{FPT} = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Nótese que en este caso el ácido fólico absorbe sólo una baja proporción de la luz incidente (26%), a diferencia de los experimentos descritos anteriormente en los cuales se partía de una absorción de más del 99%. La 6-formilpterina, por su parte, absorbe una proporción mucho mayor (56%). De esta manera, se parte de una situación en la cual ambas sustancias son excitadas por la irradiación. En la figura 10.13 se muestran los resultados de este experimento y puede observarse la evolución de las concentraciones con el tiempo de irradiación.

Puede calcularse la velocidad inicial de conversión de ácido fólico a 6-formilpterina ($v_0^{AF \rightarrow FPT}$) en estas condiciones, teniendo en cuenta el valor de I_a^{AF} y el rendimiento cuántico calculado en la sección anterior (Φ_{AF}).

$$v_o^{AF \rightarrow FPT} = \Phi_{AF} \cdot I_a^{AF}$$

$$v_o^{AF \rightarrow FPT} = 2,53 \times 10^{-2} \cdot 1,1 \times 10^{-4} \text{ M/min} = 2,8 \text{ } \mu\text{M/min.}$$

No obstante, es necesario aclarar que, como se explicará más adelante, Φ_{AF} es fuertemente dependiente de la concentración de ácido fólico, disminuyendo al disminuir la misma. Por consiguiente, un valor mucho menor es estimado para la concentración empleada en este experimento. De esta manera, la velocidad de formación de la 6-formilpterina desencadenada por la excitación del ácido fólico sería mucho menor que la calculada anteriormente.

Sin embargo la velocidad de desaparición de ácido fólico, como puede observarse a simple vista en el gráfico de la figura 10.14 es mucho mayor, incluso, que la velocidad calculada con el Φ_{AF} correspondiente a 600 μM . En efecto, durante el primer minuto de fotólisis se produce un consumo de 20,0 μM . Estos resultados muestran que debe existir algún proceso que acelere esta reacción y que en el mecanismo de dicho proceso debe intervenir la 6-formilpterina. Además puede observarse que la suma de las tres concentraciones se mantiene constante en todo el transcurso del experimento indicando que sólo se producen las dos reacciones consideradas. Esto descarta el consumo de ácido fólico por otras vías que generen fotoproductos distintos a 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

Otro grupo de experimentos también mostró la aceleración en la velocidad de la reacción de transformación de ácido fólico a 6-formilpterina. Fue el realizado midiendo la cantidad total de derivado aldehídicos con la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. En la figura 10.15 se aprecian los resultados de un experimento llevando a cabo la mencionada prueba sobre soluciones irradiadas de ácido fólico durante distintos tiempos. Esta curva representa la evolución de la concentración de 6-formilpterina. Si bien, esta determinación presenta una dispersión experimental importante de los datos y fue realizada con una geometría distinta a los experimentos anteriormente mostrados en este capítulo, puede observarse el mismo comportamiento global que ya ha sido analizado (compárese con la evolución de la concentración de 6-formilpterina en la figura 10.13). Es decir, un aumento considerable de la velocidad luego de los primeros minutos de irradiación, alcance de un máximo luego de los 10 minutos y luego una disminución de la concentración.

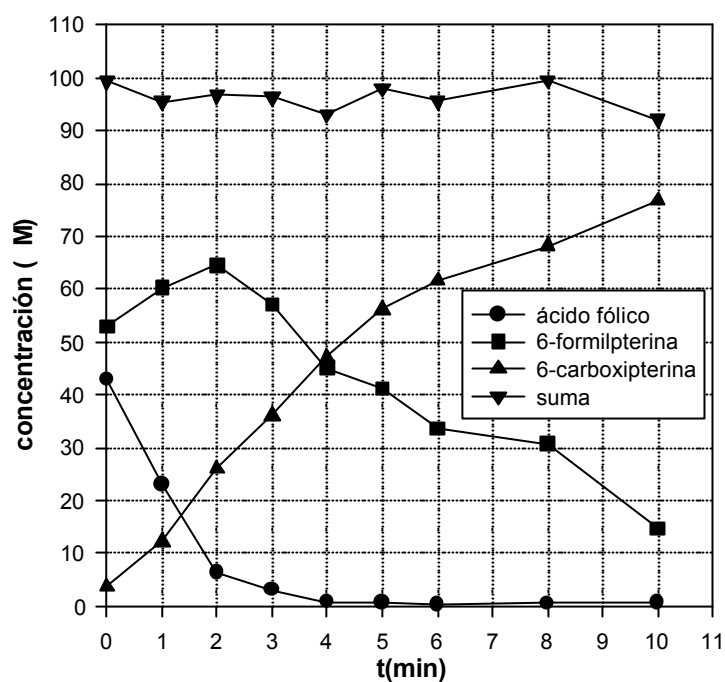


Figura 10.14. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado partiendo de una solución mezcla (pH= 6,0) que contenía 43 M de ácido fólico y 53 M de 6-formilpterina.

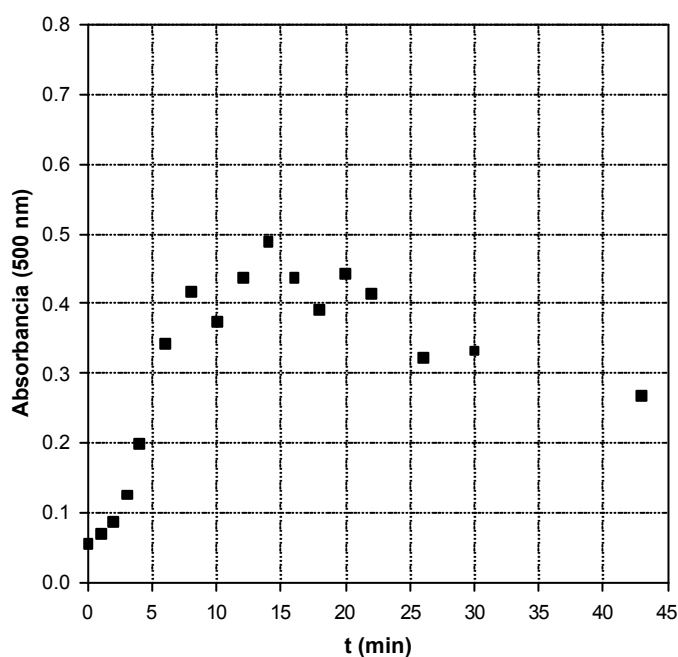


Figura 10.15. Determinación de aldehídos en una solución de ácido fólico (450 M, pH=6,0) irradiada con luz UV-A. La concentración de aldehídos es proporcional a la absorbancia de la solución a 500 nm, luego de la reacción colorimétrica con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

10.3. Papel del O₂ en la fotólisis del ácido fólico.

La conversión de ácido fólico a 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico implica una oxidación en el átomo C-6 de la estructura pterínica. Para determinar si el O₂ disuelto en la solución participa en esta fotooxidación, se realizaron medidas de la concentración de dicho gas, con el correspondiente electrodo selectivo, durante la fotólisis de soluciones aireadas. Puede observarse claramente en la figura 10.16 que existe un importante consumo de O₂ durante la fotólisis.

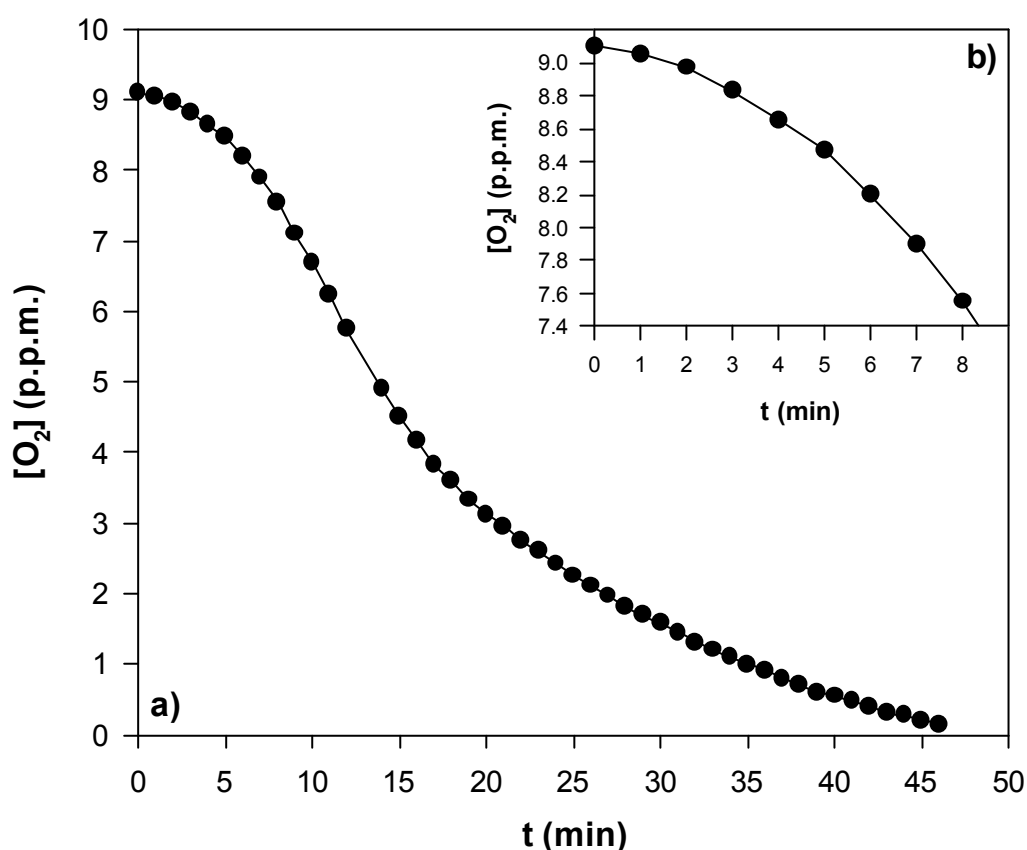


Figura 10.16. Evolución de la concentración de O₂ durante la irradiación de una solución de ácido fólico 156 M. b) Detalle de los primeros 9 minutos de fotólisis.

Como se mencionó en la parte experimental, estas medidas no son directamente comparables con las de las fotólisis realizadas en celdas de cuarzo por ser distinta la geometría. Sin embargo, puede apreciarse una aceleración en el consumo de O₂ ya en los primeros minutos. Debido a que este experimento está realizado con una concentración inicial

de ácido fólico relativamente baja, esta observación puede atribuirse a la pronta aparición del efecto acelerador de la 6-formilpterina y a su propia fotólisis que, como se demostrará en el próximo capítulo, también consume O₂.

Como ya ha sido mencionado, en muchas reacciones fotoquímicas en las que participa el O₂ disuelto en el medio como oxidante, la especie reactiva es el oxígeno singlete (¹O₂). Para averiguar si esta especie participa en el mecanismo de la reacción estudiada en este capítulo, se realizaron experimentos empleando alcohol furfurílico como “secuestrador selectivo” de ¹O₂ (la metodología fue descrita en la sección 7.6.2). A continuación se presentan los resultados de tales pruebas.

Se preparó una solución que contenía ácido fólico 573 μM (pH=6,0) y alcohol furfurílico 10 mM. Se realizó una fotólisis en la forma habitual y se analizaron las soluciones irradiadas con el HPLC. Es importante mencionar que, excepto por la presencia del secuestrador selectivo de ¹O₂, este experimento está realizado en las mismas condiciones que los experimentos descritos en las secciones anteriores (ver figuras 10.5, 10.12 y 10.13). En la figura 10.17.a se muestra la evolución de la concentración del ácido fólico durante este experimento y se la compara con la obtenida en el experimento descrito en la figura 10.12. Puede observarse que el consumo de ácido fólico es mucho menor en el experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico. En los primeros 4 minutos de fotólisis, por ejemplo, la disminución de la concentración es imperceptible en este experimento, mientras que en el realizado en ausencia de alcohol furfurílico se produce una reducción de un 7,6%. Si se hace la comparación a los 10 minutos tenemos que para el primer experimento se produce una disminución del 5,4%, mientras que en el segundo la merma alcanza el 39,3%. La figura 10.17.b muestra el escaso aumento en la concentración de 6-formilpterina que se produjo durante la fotólisis.

Estos resultados sugieren que el ¹O₂ es un intermediario fundamental para la reacción. Es decir, que el ácido fólico, excitado electrónicamente por la absorción de luz, transfiere parcialmente su energía al O₂ disuelto generando la especie excitada ¹O₂, la cual ataca la molécula de ácido fólico provocando su escisión y oxidación. Esta última etapa, por supuesto, no requiere luz para llevarse a cabo.

Se realizaron, por último, experimentos para investigar si en el efecto acelerador de la 6-formilpterina sobre la descomposición del ácido fólico, descrito en la sección anterior, también interviene el ¹O₂. Para ello se preparó e irradió una mezcla de ácido fólico(41 μM),

6-formilpterina (35 μM) y alcohol furfurílico (10 mM). Una vez más y con fines comparativos, se respetaron las condiciones experimentales empleadas en las fotólisis realizadas en ausencia de alcohol furfurílico, excepto la concentración de 6-formilpterina que es un poco menor. En la figura 10.18 puede observarse que, en este experimento, el consumo de ácido fólico es muy pequeño. En efecto, en 10 minutos de irradiación la concentración sólo disminuyó un 3,5%. En el experimento homólogo, realizado en ausencia del secuestrador selectivo (figura 10.14) se observa una reducción en la concentración del 85%, ya a los 2 minutos y, a los 10 minutos, asciende casi al 99%. Puede concluirse que la 6-formilpterina no ejerce ningún efecto sobre el ácido fólico en ausencia de O_2 o, dicho de otra manera, este compuesto es fotoestable en ausencia de O_2 , aún en soluciones que contienen cantidades considerables de 6-formilpterina.

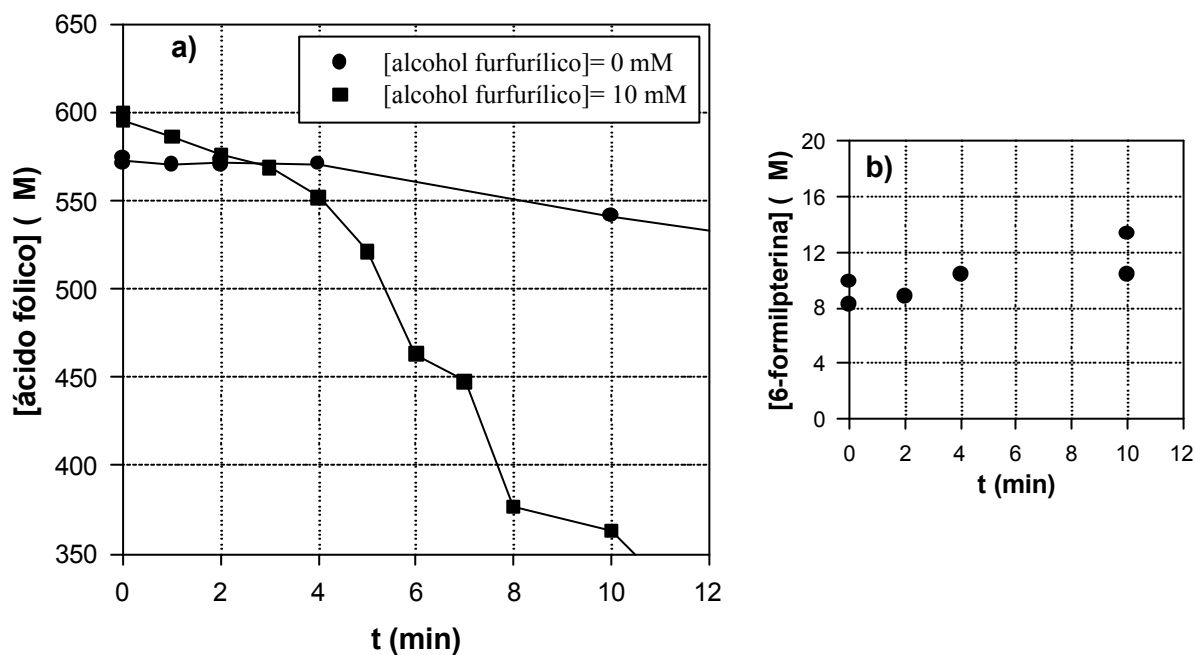


Figura 10.17. a) Comparación de la evolución de la concentración de ácido fólico en un experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico (10 mM) con la de otro realizado en ausencia de alcohol furfurílico. Ambas fotólisis se llevaron a cabo en similares condiciones (pH=6,0) b) Evolución de la concentración de 6-formilpterina durante la fotólisis de una solución de ácido fólico 570 μM (pH=6,0) en presencia de alcohol furfurílico (10 mM).

Las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación también fueron obtenidas en este experimento. Sin embargo, estos resultados se mostrarán y analizarán en el capítulo siguiente; en el cual se evaluará el papel del $^1\text{O}_2$ en la

conversión fotoquímica de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina. Basta con decir aquí que, en concordancia con lo expuesto en el párrafo anterior, en este experimento no se observó un aumento inicial de la concentración de 6-formilpterina (proveniente del ácido fólico), tal como se había observado en el correspondiente experimento en ausencia de alcohol furfurílico (figura 10.14).

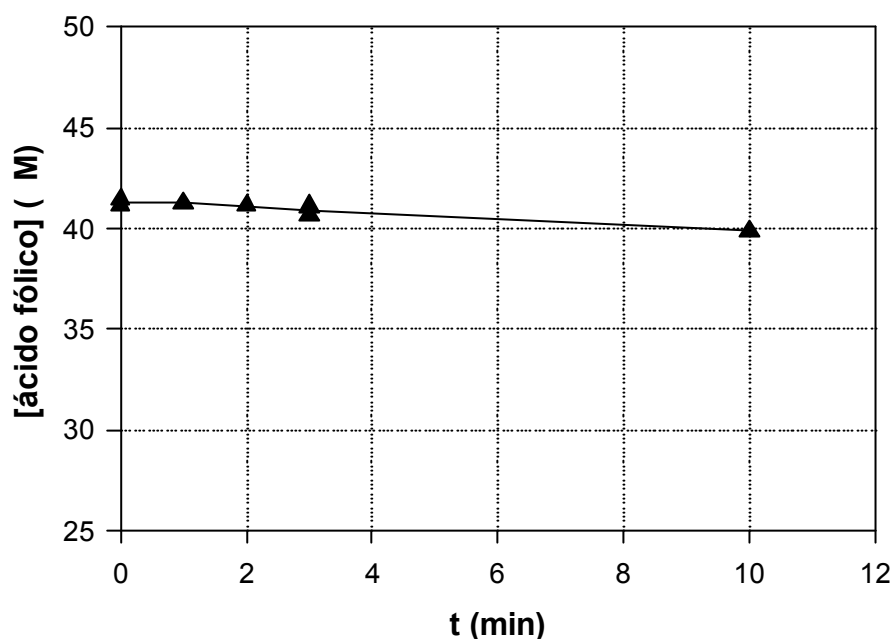


Figura 10.18. Evolución de la concentración de ácido fólico, determinadas por HPLC, durante la irradiación de una solución (pH= 6,0) que contenía 42 M de ácido fólico, 35 M de 6-formilpterina y 10 mM de alcohol furfurílico.

Las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina a distintos tiempos de irradiación también fueron obtenidas. Sin embargo, estos resultados se mostrarán y analizarán en el capítulo siguiente; en el cual se evaluará el papel del $^1\text{O}_2$ en la conversión fotoquímica de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina. Basta con decir aquí que, en concordancia con lo expuesto en el párrafo anterior, en este experimento no se observó un aumento inicial de la concentración de 6-formilpterina (proveniente del ácido fólico), tal como se había observado en el correspondiente experimento en ausencia de alcohol furfurílico (figura 10.15).

Estos resultados sugieren fuertemente que el $^1\text{O}_2$ interviene en el efecto acelerador de la 6-formilpterina. Puede postularse una hipótesis razonable para explicar este fenómeno: la 6-formilpterina fotoexcitada genera $^1\text{O}_2$, el cual posteriormente reacciona con el ácido fólico. Es

decir que el aumento en la velocidad de consumo del ácido fólico cuando en la solución está presente la 6-formilpterina se debe a un aumento en la concentración en el medio del $^1\text{O}_2$.

Esta hipótesis es reforzada por los resultados obtenidos en las medidas de $^1\text{O}_2$ realizadas en soluciones de ácido fólico y 6-formilpterina disueltos en D_2O (ver detalles experimentales expuestos en la sección 8.3). Ambos compuestos generan $^1\text{O}_2$, sin embargo, los rendimientos cuánticos (Φ_Δ) son muy diferentes. En efecto, en experimentos realizados a pD igual a 6,4, mientras que para el ácido fólico se obtuvo un valor de sólo 0,06, para la 6-formilpterina se obtuvo un valor de 0,33. En la figura 10.19 se muestran las señales registradas para el ácido fólico junto con las respectivas señales producidas por una solución de fenalenona, la cual fue usada como referencia. Para cada compuesto existen dos señales que corresponden a dos amplificaciones diferentes. Las señales del ácido fólico presentan un ruido superior al de las de la fenalenona debido a que, por ser las mismas muy débiles, fueron registradas con una sensibilidad diez veces mayor. Por esta razón, el valor de Φ_Δ obtenido para el ácido fólico presenta un error relativo importante. En la figura 10.20, por su parte, pueden observarse las señales obtenidas con una solución en D_2O de 6-formilpterina y las de su correspondiente referencia.

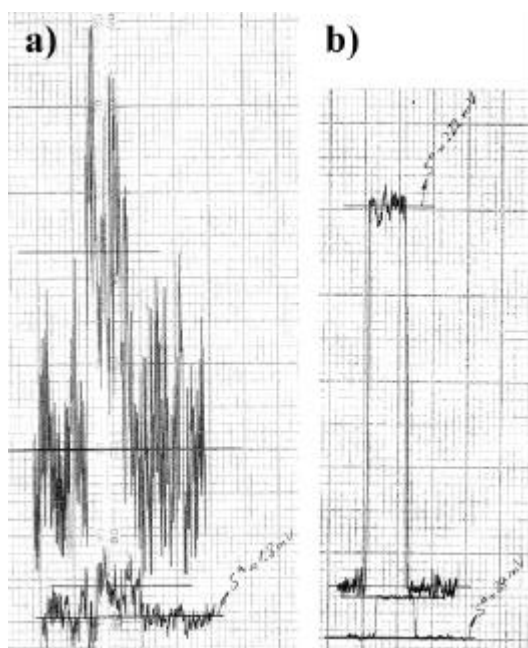


Figura 10.19. Determinación del Φ_Δ del ácido fólico. Experimento realizado en D_2O (pD= 6,4). a) Señales de la solución de ácido fólico. b) Señales de la solución de fenalenona.

Estos resultados implican que, cuando la cantidad de luz absorbida por la

6-formilpterina deja de ser despreciable, este compuesto se transforma en otra fuente de $^1\text{O}_2$. Debido a que el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ del ácido fólico es mucho menor que el de la 6-formilpterina y que el coeficiente de extinción molar de ambos compuestos es comparable a 350 nm ($6.757 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $9.779 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente), la concentración de $^1\text{O}_2$ debe aumentar en el seno de la solución irradiada en esta etapa. Esto tendría que provocar, un incremento en la velocidad de descomposición del ácido fólico, si el intermediario fuera esta especie excitada. Además, al avanzar la fotólisis y las moléculas de ácido fólico ser reemplazadas por moléculas de 6-formilpterina este efecto debería aumentar. Como se ha mostrado en los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, esto es justamente lo que se observa luego de los 4 a 5 primeros minutos de irradiación.

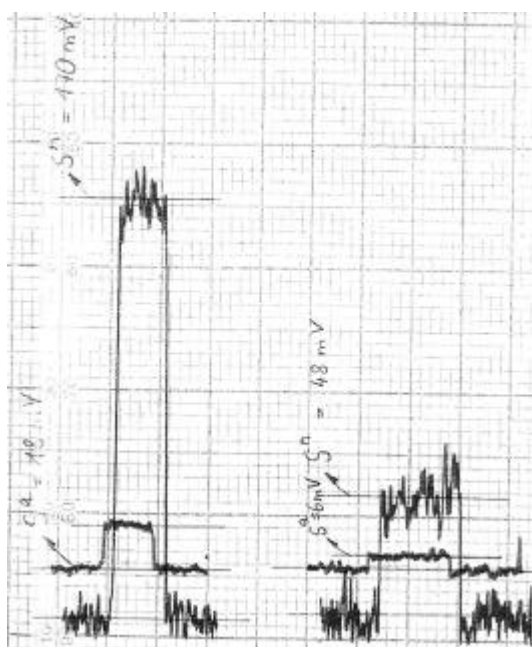


Figura 10.20. Determinación del Φ_{AF} de la 6-formilpterina. Experimento realizado en D_2O ($\text{pD}=6,4$). Las señales de la izquierda corresponden a una solución de fenalena, mientras que las de la derecha corresponden a una solución de 6-formilpterina.

Asimismo, el mecanismo propuesto involucrando al $^1\text{O}_2$ como intermediario, implica que el ácido fólico es, a la vez, sensibilizador y sustrato, de acuerdo a las definiciones dadas en la sección 4.4. Además, el rendimiento cuántico de consumo de ácido fólico (Φ_{AF}) en la primera etapa de la fotólisis viene dado por la ecuación (4) deducida en dicha sección. En la segunda etapa comienza a actuar la 6-formilpterina como otro sensibilizador.

El valor de Φ_{AF} reportado en la sección anterior corresponde a una concentración de

ácido fólico de 600 μM y la constante cinética de desactivación del $^1\text{O}_2$ en H_2O (k_d) es de $2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Gorman y Rodgers, 1989). Introduciendo estos datos, juntamente con el valor de Φ_Δ del ácido fólico, en la mencionada ecuación puede obtenerse una estimación de la constante de velocidad para la reacción bimolecular entre el ácido fólico y el $^1\text{O}_2$ (k_s).

$$\Phi_P = \Phi_\Delta \cdot \frac{k_s \cdot [\text{S}]}{k_s \cdot [\text{S}] + k_d} \quad 2,53 \times 10^{-2} = 0,06 \cdot \frac{k_s \cdot 6,0 \times 10^{-4} \text{ M}}{k_s \cdot 6,0 \times 10^{-4} \text{ M} + 2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}}$$

Este cálculo permite estimar un valor de $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para k_s , el cual está en el orden de otras constantes cinéticas bimoleculares de reacción entre el $^1\text{O}_2$ y compuestos heterocíclicos biológicos tales como los aminoácidos histidina ($4,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y triptofano ($5,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Foote y Clennan, 1995).

Antes de continuar, es necesario mencionar ciertos errores que afectan al valor de Φ_Δ obtenido para el ácido fólico. Este parámetro fue determinado empleando la ecuación (1) de la sección 8.3, la cual considera que Φ_Δ es proporcional a la concentración estacionaria de $^1\text{O}_2$ que se genera cuando una solución del sensibilizador es iluminada. Sin embargo, dicha ecuación no contempla la reacción entre el $^1\text{O}_2$ y el sensibilizador, por lo cual, estrictamente no es válida para el ácido fólico. Por lo tanto, el valor obtenido es, en realidad, una cota inferior para Φ_Δ .

Sin embargo, es posible evaluar este error comparando la velocidad del consumo de $^1\text{O}_2$ por reacción con el ácido fólico ($k_s [\text{S}]$) y la velocidad de su desactivación por el solvente (k_d). Los experimentos de determinación de Φ_Δ fueron realizados con una solución de ácido fólico 135 μM . Tomando el valor de k_s obtenido anteriormente, $k_s [\text{S}]$ tiene un valor de $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ para esta concentración, el cual representa un 15% de k_d . Esta comparación sugiere que la determinación de Φ_Δ no es afectada en forma importante por la reacción del ácido fólico con el $^1\text{O}_2$.

Para la 6-formilpterina este error en la determinación de Φ_Δ no existe porque, tal como se demostrará en el próximo capítulo, la principal vía de reacción de este compuesto no involucra al $^1\text{O}_2$.

Por otra parte, teniendo en cuenta que, en los experimentos de fotólisis de soluciones ácido fólico expuestos en la sección anterior, la concentración de 6-carboxipterina aumenta significativamente luego de los primeros 5 minutos de irradiación, surge la necesidad de evaluar el papel de este compuesto en el mecanismo de la reacción. Con este objetivo se

determinó el rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ para la 6-carboxipterina empleando la misma técnica que la utilizada para ácido fólico y 6-formilpterina. Los resultados de estos experimentos arrojaron un valor igual al obtenido para este último compuesto (0,33). Es evidente, entonces, que la 6-carboxipterina contribuirá al proceso de aumento de la velocidad de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina cuando la cantidad de luz absorbida por este compuesto sea significativa.

Por último, antes de finalizar esta sección, es conveniente realizar ciertas consideraciones sobre las ya mencionadas trazas de 6-formilpterina presentes en las soluciones de ácido fólico no irradiadas. Esta pequeña proporción producirá cierta cantidad de $^1\text{O}_2$. Realizando un cálculo sencillo puede evaluarse la importancia de esta fuente de $^1\text{O}_2$ respecto a lo generado por el propio ácido fólico.

Si se considera que para la generación de $^1\text{O}_2$ contribuyen ambos compuestos, puede plantearse la siguiente ecuación para la velocidad total ($v_0(^1\text{O}_2)$) con la cual se forma en el seno de la solución.

$$v_0(^1\text{O}_2) = \Phi_{\Delta}^{\text{Ef}} \cdot I_{\text{A}} = \Phi_{\Delta}^{\text{AF}} \cdot I_{\text{A}}^{\text{AF}} + \Phi_{\Delta}^{\text{FPT}} \cdot I_{\text{A}}^{\text{FPT}} \quad (4)$$

$\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}}$ es el rendimiento cuántico efectivo medido en el experimento (0,06) y $\Phi_{\Delta}^{\text{AF}}$ y $\Phi_{\Delta}^{\text{FPT}}$ son los rendimientos cuánticos reales del ácido fólico y la 6-formilpterina, respectivamente. Por último, I_{A} es la intensidad de luz total absorbida por la solución (en moles de fotones/min) e I_{A}^{AF} e $I_{\text{A}}^{\text{FPT}}$ representan la intensidad de luz absorbida por los dos compuestos presentes en la solución. Estos últimos dos parámetros pueden expresarse con las ecuaciones (1) y (2) presentadas en la sección anterior, reemplazando h por I_{A} . La ecuación (4) puede, por lo tanto escribirse de la siguiente manera:

$$\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}} \cdot I_{\text{A}} = \Phi_{\Delta}^{\text{AF}} \frac{\epsilon_{350}^{\text{AF}} \cdot [\text{AF}]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} I_{\text{A}} + \Phi_{\Delta}^{\text{FPT}} \frac{\epsilon_{350}^{\text{FPT}} \cdot [\text{FPT}]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} I_{\text{A}}$$

Está claro que si el segundo término del segundo miembro de la igualdad es despreciable respecto al valor de $\Phi_{\Delta}^{\text{Ef}}$, la cantidad de intermediario generado por la 6-formilpterina será despreciable.

Aunque en soluciones más diluidas las impurezas no son detectadas, en las soluciones de ácido fólico de concentración 600 μM se han encontrado concentraciones de 6-formilpterina de alrededor de 7 μM , lo cual representa aproximadamente 1,2 % del total de los moles. Puede calcularse el valor del término correspondiente a la 6-formilpterina,

considerando dicha proporción de la misma y suponiendo que el resto es ácido fólico.

$$0,33 \times \frac{9.779 \cdot 1,2}{9779 \cdot 1,2 + 6.757 \cdot 98,8} = 5,7 \times 10^{-3}$$

El valor medido (0,06) es más de diez veces mayor al valor encontrado para la contribución inicial de la 6-formilpterina. Este cálculo permite descartar que las impurezas de este fotoproducto sean las responsables de la degradación fotoquímica del ácido fólico en la primera etapa de la fotólisis.

10.4. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de O₂.

Soluciones de ácido fólico a las cuales se les eliminó el O₂ burbujeando previamente N₂ fueron iluminadas con luz UV-A durante distintos períodos de tiempo. Las soluciones irradiadas fueron analizadas para investigar los procesos que tienen lugar en estas condiciones.

El estudio espectrofotométrico de tales soluciones mostró que no se producen cambios espectrales apreciables en estas condiciones experimentales. La figura 10.21 muestra los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución durante aproximadamente una hora. Estos resultados sugieren que la molécula de ácido fólico es fotoestable en ausencia de O₂.

Las soluciones irradiadas fueron analizadas por TLC. En estos experimentos no pudo observarse la aparición de las típicas manchas fluorescentes correspondientes a la 6-formilpterina ni a la 6-carboxipterina. En consecuencia, tal como era de esperar, no se producen dichas sustancias bajo estas condiciones experimentales. Tampoco se observan otras manchas fluorescentes en la placa cromatográfica. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 10.22.

Las medidas realizadas por HPLC sobre las soluciones irradiadas muestran que la concentración de ácido fólico no disminuye con el tiempo de irradiación. En la figura 10.23 se muestran los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 30 min. Además, con el tiempo de exposición a la luz UV, los picos correspondientes a la 6-formilpterina y a la 6-carboxipterina no aparecen. Tampoco se detectó la aparición de otros picos.

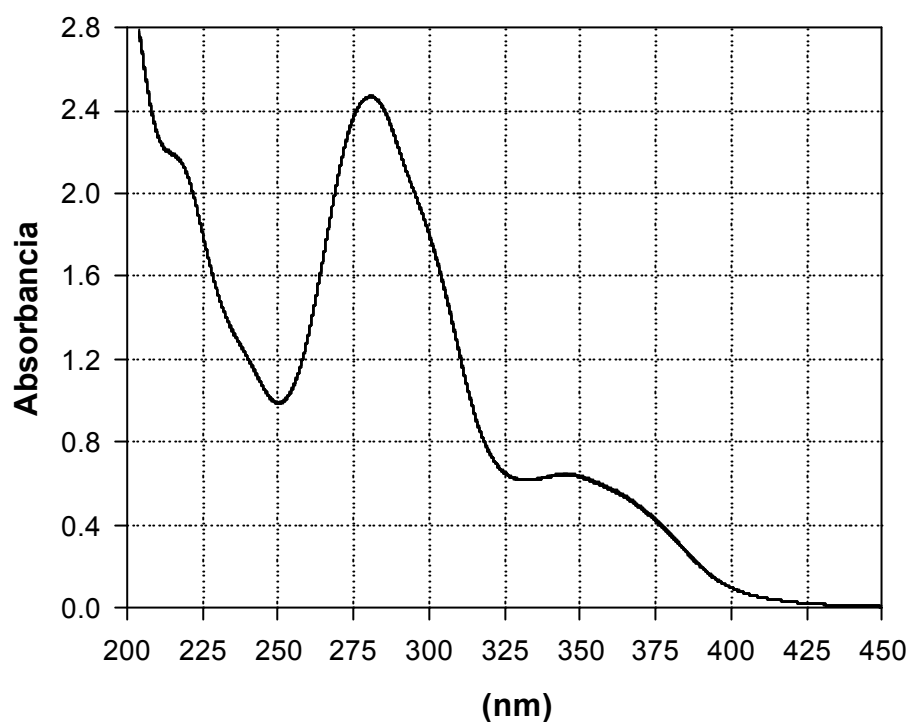


Figura 10.21. Irradiación de una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 5,8) en ausencia de O_2 . Los espectros de absorción fueron tomados cada 10 min durante 50 min. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente.

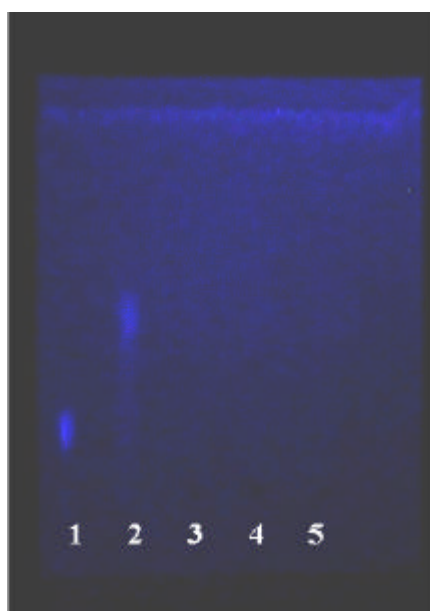


Figura 10.22. Corrida de TLC. Calle: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 150 μ M; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 3, solución patrón de ácido fólico 450 μ M; calles 4 y 5 solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 6,0) irradiada; 10 min y 20 min respectivamente.

Estos resultados muestran que el ácido fólico es fotoestable en ausencia de O_2 . Sin embargo, estos ensayos son importantes porque, como se explicará más adelante, existen casos estudiados en este trabajo de tesis, en los cuales un compuesto se descompone fotoquímicamente a través de dos vías distintas, en una participa el O_2 y en la otra no. En estas reacciones, al eliminar el O_2 , se observa que la velocidad de consumo del fotorreactivo disminuye, pero que no es nula.

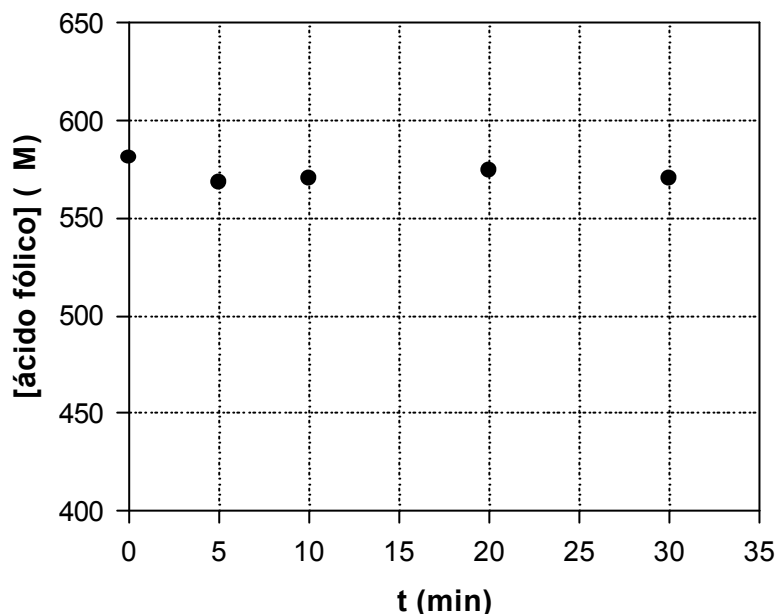


Figura 10.23. Irradiación de una solución de ácido fólico 580 M (pH= 5,8).

10.5. Conclusiones.

El esquema 10.24 resume las principales conclusiones a las que se arribaron al analizar los resultados expuestos en este capítulo. El ácido fólico al ser irradiado con luz UV-A se excita y genera 1O_2 , pero con un rendimiento cuántico muy bajo ($\Phi_{\Delta} = 0,06$). Esta forma excitada del O_2 reacciona con el ácido fólico provocando su escisión a 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Esta reacción, en la que hay un ataque del 1O_2 al grupo CH_2 unido al C-6 de la estructura pterínica, por su complejidad, debe ocurrir en más de una etapa. A medida que avanza la reacción se acumulan los productos, a la vez que se consume el reactivo. En las fotólisis realizadas en condiciones tales que el reactivo absorbe inicialmente casi la totalidad de la luz, el mencionado proceso es el único que ocurre en una primera etapa,

observándose una cinética de orden 0 y un rendimiento cuántico para esta reacción de $2,5 \times 10^{-3}$, cuando la concentración de ácido fólico es $600 \mu\text{M}$.

La 6-formilpterina, por su parte, también genera $^1\text{O}_2$, pero con un rendimiento cuántico más de cinco veces superior ($\Phi_{\Delta} = 0,33$). En consecuencia, cuando la concentración de este fotoproducto es lo suficientemente alta como para que la luz absorbida por él no sea despreciable, la velocidad de formación de $^1\text{O}_2$ aumenta y, por ende, su concentración en el medio. Por esta razón, la velocidad de la transformación de ácido fólico en 6-formilpterina aumenta al avanzar la fotólisis, en vez de disminuir por agotamiento del reactivo. Asimismo, en esta segunda etapa, se observa la aparición de otro compuesto, 6-carboxipterina, pudiendo postularse que el mismo es el producto de la fotodegradación de la 6-formilpterina. Sin embargo, este punto será tratado en el siguiente capítulo.

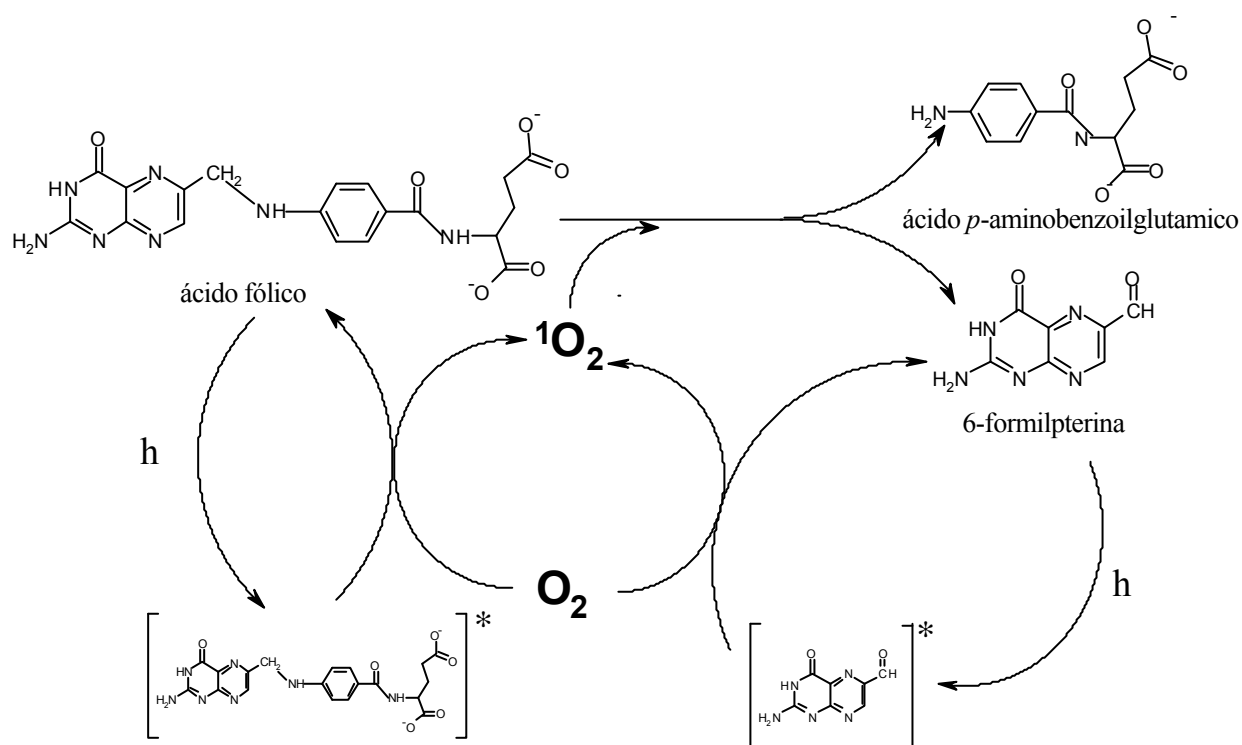


Figura 10.24. Esquema de reacciones propuesto para explicar los resultados obtenidos en los experimentos de fotólisis de ácido fólico. Las especies excitadas se indican con *.

Finalmente, puede reconocerse una tercera etapa en la cual tanto la concentración de ácido fólico como la de 6-formilpterina decrecen con el tiempo de irradiación. En este período se observa un aumento continuo de la concentración de 6-carboxipterina. Sin embargo, el balance de masas realizado con las tres especies sugiere que este último compuesto es, a su

vez fotosensible; no obstante, el análisis de esta hipótesis será presentado recién en el capítulo 12.

Es necesario realizar un comentario sobre las trazas de fotoproductos encontradas en las soluciones de ácido fólico no irradiadas. La influencia de estas trazas, que posiblemente se generen durante la preparación de las soluciones, fue considerada y se concluyó que su efecto es despreciable durante la primera etapa de las fotólisis. Varias evidencias fueron encontradas a favor de esta hipótesis. En primer lugar, si la 6-formilpterina inicial fuera la responsable de iniciar los procesos fotoquímicos observados, el ácido fólico debería ser fotoestable en ausencia de la misma. Sin embargo, tal como se comentara en la sección 4.1, ha sido reportado en literatura que el ácido fólico purificado por recristalización, no es fotoestable (Robinson et al., 1990). Por otro lado, tal como se explicó en la sección 10.1, durante la primera etapa de la fotólisis la concentración de 6-carboxipterina permanece constante, indicando que la 6-formilpterina presente no recibe una cantidad de luz significativa por actuar el ácido fólico como filtro interno absorbiendo casi toda la luz incidente. Por último, los cálculos realizados con los valores de los correspondientes Φ_{Δ} muestran que la cantidad de $^1\text{O}_2$ generada inicialmente por la 6-formilpterina es despreciable respecto a la generada por el ácido fólico.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones expuestas hasta aquí, es posible plantear un conjunto de reacciones que describe el modelo propuesto para explicar el mecanismo de los procesos fotoquímicos estudiados. Tales reacciones, junto con las correspondientes velocidades, se listan en la tabla 10.1. A partir de este mecanismo pueden plantearse las ecuaciones de velocidad que definen el cambio de concentración de las especies involucradas. Estas ecuaciones se muestran en la parte inferior de la tabla 10.2.

Resulta evidente que las reacciones o etapas que figuran en la tabla 10.1, no son etapas elementales, a excepción de la desactivación del $^1\text{O}_2$ por el solvente. Por el contrario, representan procesos que incluyen varias etapas elementales, pero que, por conveniencia, fueron agrupadas. Por ejemplo, las tres primeras etapas representan la formación de $^1\text{O}_2$ por parte de los fotosensibilizadores que poseen esta capacidad. Sin embargo, cada uno de estos procesos puede ser descrito más detalladamente tal como fue explicado en la figura 4.7. Es decir, en una primera etapa el sensibilizador, inicialmente en su estado basal, absorbe luz y pasa a un estado excitado singlete, en una segunda etapa, se genera un estado triplete por entrecruzamiento de sistemas, y finalmente, es el estado triplete el que genera la especie $^1\text{O}_2$

transfiriendo su energía al O₂ disuelto en el medio. De la misma manera, la reacción entre el ácido fólico y el ¹O₂ debe involucrar varios pasos. Por último, los resultados expuestos en el próximo capítulo mostrarán que la fotooxidación de la 6-formilpterina ocurre también en varias etapas.

Etapa	Velocidad
$AF + O_2 \xrightarrow{h\nu} AF + {}^1O_2$	$I_a^{AF} \cdot \Phi_{\Delta}^{AF}$
$FPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} FPT + {}^1O_2$	$I_a^{FPT} \cdot \Phi_{\Delta}^{FPT}$
$CPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} CPT + {}^1O_2$	$I_a^{CPT} \cdot \Phi_{\Delta}^{CPT}$
$AF + {}^1O_2 \longrightarrow FPT + PABA-Glu$	$k_s \cdot [AF] \cdot [{}^1O_2]$
${}^1O_2 \longrightarrow O_2$	$k_d \cdot [{}^1O_2]$
$FPT + O_2 \xrightarrow{h\nu} CPT$	$I_a^{FPT} \cdot \Phi_{FPT}$

Tabla 10.1. Mecanismo propuesto para explicar los cambios observados cuando se irradia una solución de ácido fólico. PABA-Glu representa a ácido *p*-aminobenzoilglutámico, las demás abreviaturas poseen el mismo significado que en el texto.

Especie	Ecuación de velocidad
Acido fólico	$d[AF]/dt = -k_s [AF] [{}^1O_2]$
6-formilpterina	$d[FPT]/dt = k_s [AF] [{}^1O_2] - I_a^{FPT} \Phi_{FPT}$
6-carboxipterina	$d[CPT]/dt = I_a^{FPT} \Phi_{FPT}$
¹ O ₂	$d[{}^1O_2]/dt = I_a^{AF} \Phi_{\Delta}^{AF} + I_a^{FPT} \Phi_{\Delta}^{FPT} + I_a^{CPT} \Phi_{\Delta}^{CPT} - k_s [AF] [{}^1O_2] - k_d [{}^1O_2]$

Tabla 10.2. Ecuaciones de velocidad que definen el cambio en la concentración de las especies involucradas en el mecanismo propuesto.

En la tabla 10.3 se listan los valores de todas las constantes que aparecen en las ecuaciones de velocidad de la tabla 10.1 y que fueron calculadas en los experimentos descriptos en este capítulo; excepto Φ_{FPT} cuya determinación será abordada en el próximo capítulo.

Empleando las ecuaciones y las constantes presentadas en las tablas precedentes se

realizó una simulación con el programa Kinesim 8.5 (García Einschlag y Capparelli, 2000) que utiliza el método matemático Runge-Kutta (integración numérica de sistemas de ecuaciones diferenciales). Además este programa usó la luz incidente (I_0^v) y los correspondientes valores de los coeficientes de extinción molar a 350 nm para el cálculo de las intensidades de luz absorbidas por cada especie involucrada (I_a). Los resultados de esta simulación se muestran en la figura 10.25.

Constante	Descripción	Valor
Φ_{Δ}^{AF}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 del ácido fólico	0,06
Φ_{Δ}^{FPT}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 de 6-formilpterina	0,33
Φ_{Δ}^{CPT}	Rendimiento cuántico de generación de 1O_2 de 6-carboxipterina	0,33
k_s	Constante de velocidad de la reacción de ácido fólico con 1O_2	$3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_d	Constante de velocidad de desactivación del 1O_2 en agua.	$2,63 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
Φ_{FPT}	Rendimiento cuántico de la reacción de conversión de 6-formilpterina en 6-carboxipterina	$3,8 \times 10^{-2}$

Tabla 10.3. Constantes del sistema de ecuaciones que describe el modelo propuesto.

Puede observarse que los perfiles de concentración simulados reproducen el comportamiento general observado experimentalmente para los primeros 15 minutos de fotólisis. Sin embargo, el modelo muestra ciertas limitaciones. En primer lugar, el cambio abrupto en las velocidades del ácido fólico y de la 6-formilpterina que se observa en los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, alrededor de los 4 a 5 minutos, no es reflejado por la simulación que, por el contrario, predice cambios más graduales.

No obstante, las diferencias más importantes entre los datos experimentales y los calculados residen en la etapa posterior a los 15 minutos (no mostrados en la figura 10.25). En efecto, mientras los datos experimentales muestran que la concentración de ácido fólico se mantiene con escasas variaciones, la simulación predice un descenso considerable de la misma. Debe tenerse en cuenta que el modelo propuesto es sencillo y no incluye ciertos factores que pueden adquirir importancia en determinadas etapas del proceso global. En particular, debe considerarse que las tres primeras ecuaciones de la tabla 10.1 son estrictamente válidas sólo para soluciones que estén equilibradas con atmósfera de aire,

debido a que en estas condiciones se midieron los rendimientos cuánticos de generación de $^1\text{O}_2$. Si bien los experimentos de fotólisis fueron realizados en celdas abiertas a la atmósfera y con agitación, el consumo de O_2 es muy importante y la transferencia de este gas desde la fase gaseosa podría no ser suficiente y, por ende, la concentración del mismo podría descender lo suficiente como para detener la reacción de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina.

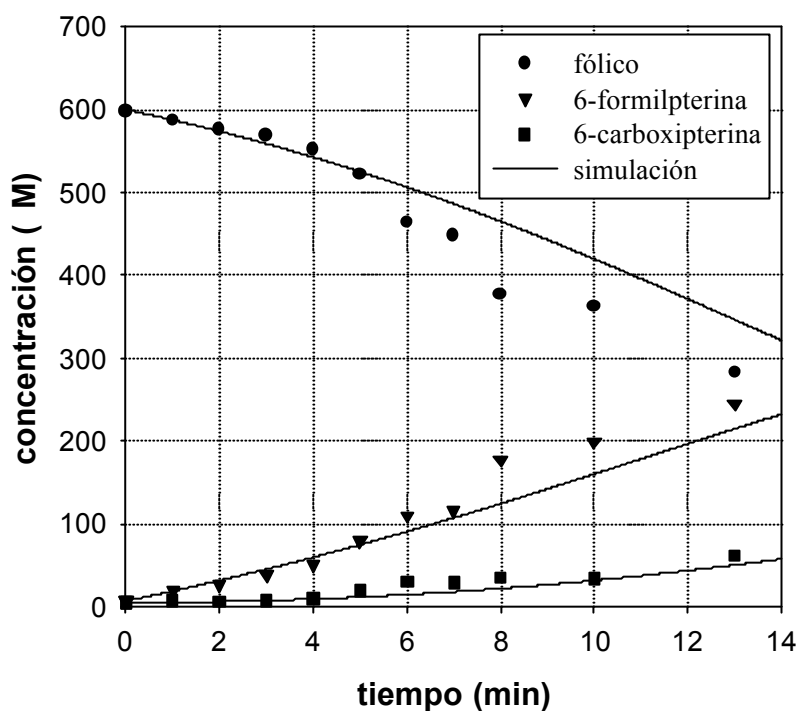


Figura 10.25. Comparación de los resultados obtenidos en la simulación con los resultados experimentales correspondientes al experimento de la figura 10.13.

Capítulo 11.

Fotólisis de 6-formilpterina.

En el capítulo 10 se mostró que en las soluciones irradiadas de ácido fólico está presente la 6-carboxipterina, pero que este compuesto no proviene directamente del reactivo y se sugirió que es el producto de la fotólisis secundaria de la 6-formilpterina. En este capítulo se exponen y analizan los resultados de experimentos realizados con soluciones que contienen únicamente 6-formilpterina, con el fin de analizar en detalle solamente la reacción de fotólisis de este derivado pterínico.

Al igual que en el capítulo anterior, en las próximas secciones se mostrarán los resultados que condujeron a la identificación de productos y a la determinación de los correspondientes rendimientos cuánticos. Asimismo, esta fotólisis se estudió en presencia y ausencia de O_2 y se investigó la participación del 1O_2 en el mecanismo de la reacción.

11.1. Fotólisis de 6-formilpterina en presencia de O_2 .

La figura 11.1 muestra los profundos cambios espectrales que se producen cuando una solución ligeramente ácida de 6-formilpterina se irradia con luz UV-A. En la figura 11.1.b se observan los espectros DE durante la fotólisis. En los 14 minutos que duró este experimento se observó que el punto isobéptico de 300 nm permanecía invariante. Además luego de los 8 minutos, aproximadamente, el espectro de la solución varió muy poco. En la figura 11.2 puede observarse la variación de la absorbancia con el tiempo para distintas longitudes de onda. Esto sugiere que la 6-formilpterina se transforma, en este período de tiempo, cuantitativamente en un compuesto que es mucho más estable fotoquímicamente, pero que, sin embargo, comienza a consumirse significativamente luego de los 10 min de irradiación.

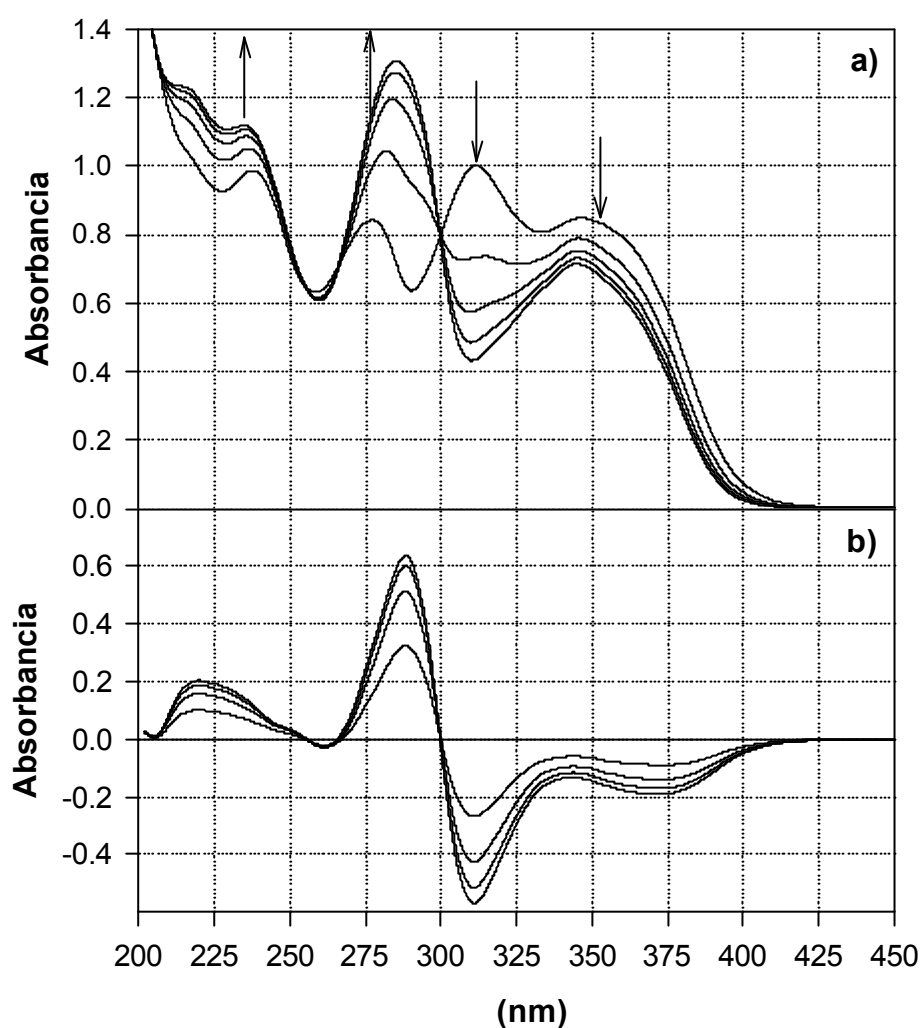


Figura 11.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (110 M, pH= 6,0) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 2 min. y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.

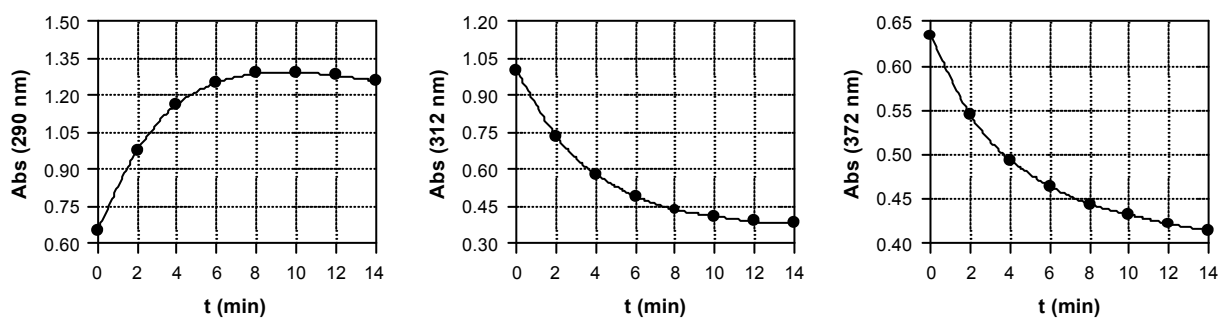


Figura 11.2. Variación con el tiempo de irradiación de la absorbancia a distintas de una solución de 6-formilpterina (110 M, pH=6,0).

Como puede observarse en la figura 11.3, el espectro DEN de esta reacción se corresponde muy bien con el espectro DTN, obtenido a partir de los espectros de la 6-formilpterina y la 6-carboxipterina. Más aún, como se aprecia en la figura 11.4, el espectro de la solución fotolizada puede compararse directamente con el espectro de una solución de 6-carboxipterina.

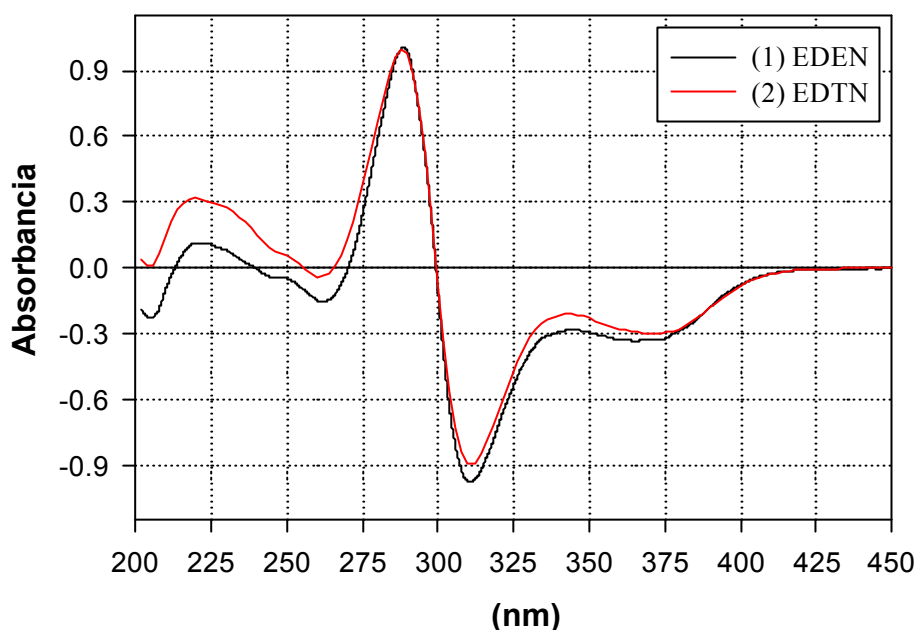


Figura 11.3. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 8 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones que contiene 6-formilpterina 100 M y 6-carboxipterina 100 M.

Los experimentos de TLC (figura 11.5), revelan la presencia de dos manchas fluorescentes en las soluciones irradiadas de 6-formilpterina, con valores de R_f que se corresponden a los patrones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Se observa que la mancha correspondiente al reactivo disminuye significativamente en intensidad respecto a la solución no fotolizada. No se detectan otras manchas coloreadas y/o fluorescentes además de las dos mencionadas, sugiriendo que la única vía de descomposición de la 6-formilpterina, en estas condiciones, es su oxidación a 6-carboxipterina.

El análisis por HPLC de las soluciones de 6-formilpterina irradiadas muestra que el área del pico de este compuesto disminuye al avanzar la fotólisis. Además se observa el crecimiento de un pico con t_R y forma coincidente con el del patrón de 6-carboxipterina. La figura 11.6 muestra un cromatograma correspondiente a una solución iluminada y se lo

compara con los cromatogramas de las soluciones de los patrones.

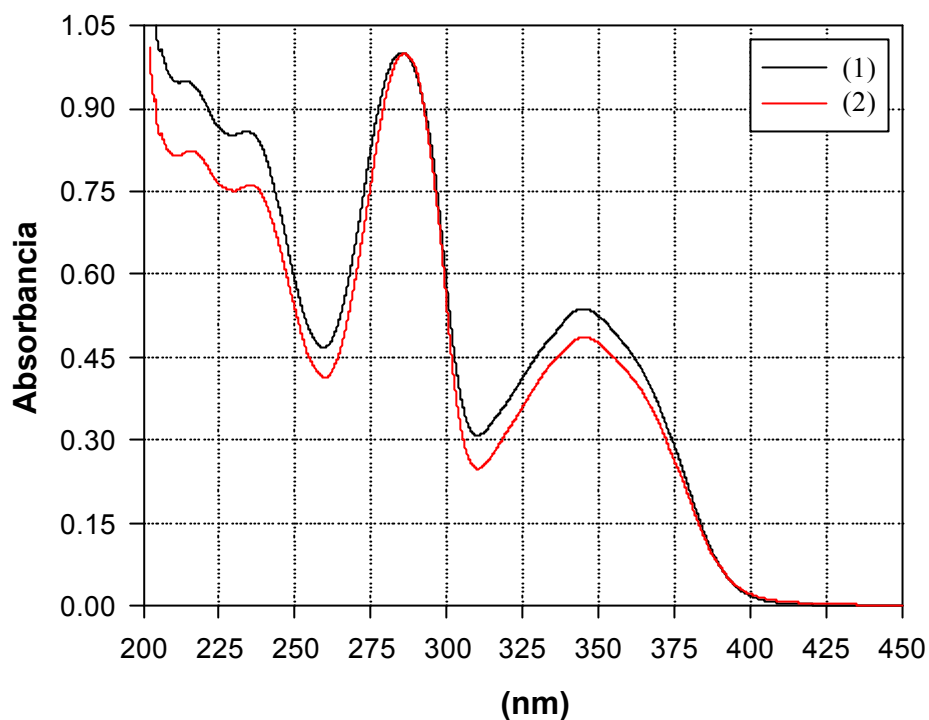


Figura 11.4. (1) Espectro DEN de una solución de 6-formilpterina (100 μ M, pH=5,8) irradiada 10 min. (2) Espectro normalizada de una solución de 6-carboxipterina (100 μ M, pH= 5,7).

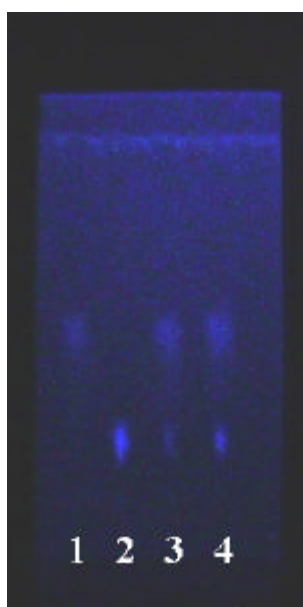


Figura 11.5. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 2, solución patrón de 6-carboxipterina 150 μ M; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 6,0) irradiada con luz de 350 nm; 2 min. y 4 min., respectivamente.

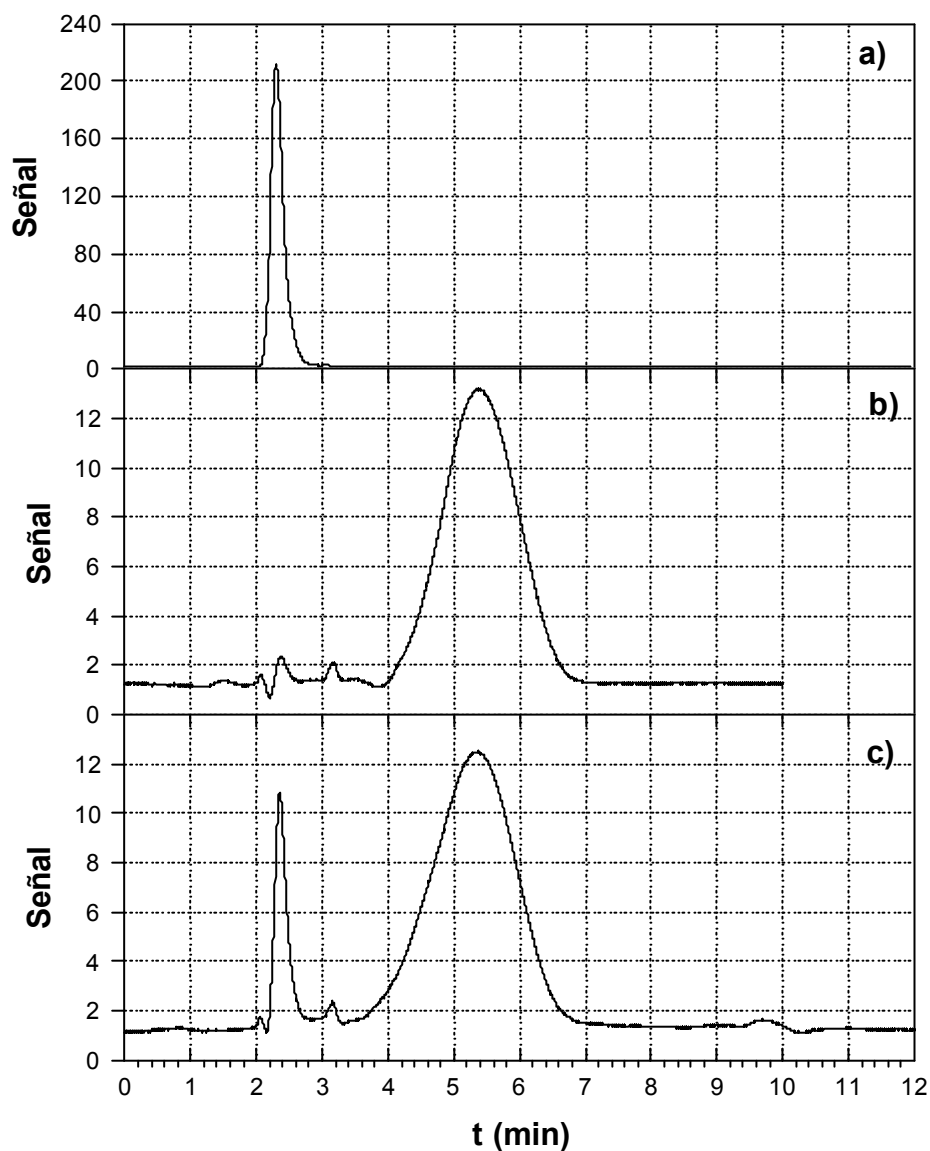


Figura 11.6. Cromatogramas de HPLC. a) Solución de 6-carboxipterina 150 μ M. b) Solución 6-formilpterina 95 μ M. c) Solución de 6-formilpterina 150 μ M irradiada 0,5 min. Para los tres cromatogramas la longitud de análisis fue 340 nm.

Mediante las correspondientes curvas de calibración se obtuvieron los perfiles de concentración de ambos compuestos durante la fotólisis. La figura 11.7 muestra la evolución de dichas concentraciones, observándose un comportamiento lineal para el intervalo de tiempo analizado. Se obtuvieron las siguientes velocidades en este experimento: $-14,5 \pm 0,7$ μ M/min para la descomposición del reactivo y $13,8 \pm 0,3$ μ M/min para la formación de producto. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $3,9 \times 10^{-2}$ y $3,7 \times 10^{-2}$,

respectivamente. Puede apreciarse que estos valores son lo suficientemente parecidos entre sí como para aceptar que la única vía cuantitativamente importante de descomposición de la 6-formilpterina es su oxidación a 6-carboxipterina.

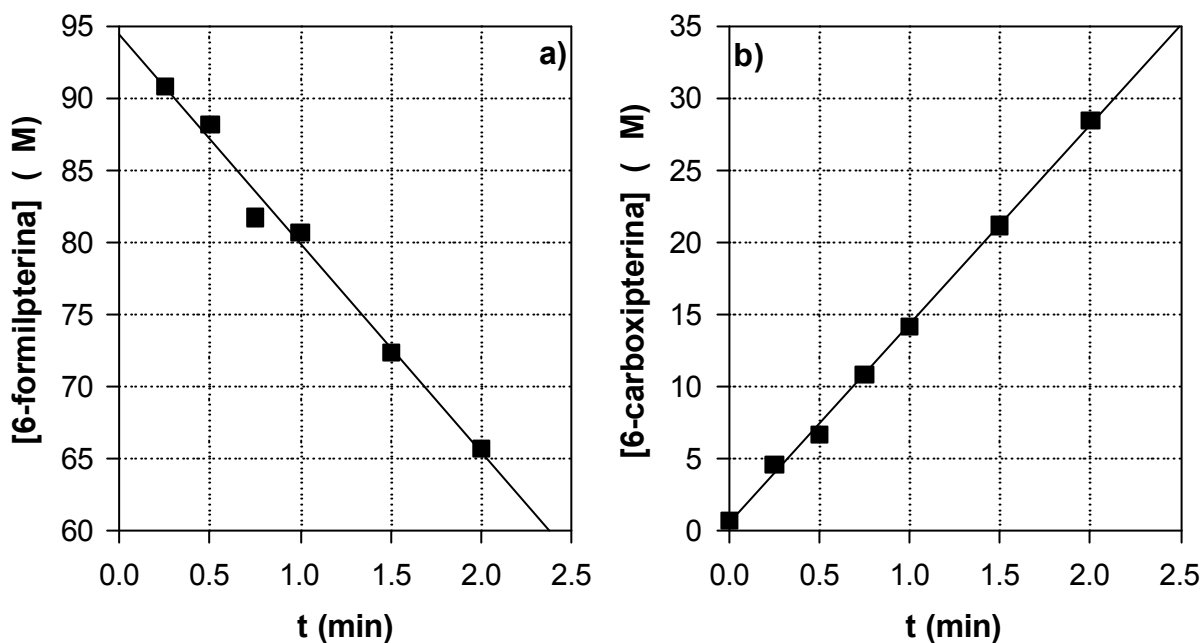


Figura 11.7. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina 95 M y pH= 5,5.

En este caso no puede suponerse absorción total de luz por parte de la 6-formilpterina, ya que la absorbancia inicial es de sólo 0,89. Por este motivo, el cálculo de los rendimientos cuánticos se realizó empleando la luz absorbida inicialmente y no el total de la luz incidente.

11.2. Papel del O₂ en la fotólisis de la 6-formilpterina.

La transformación del grupo 6-formilo al grupo 6-carboxilo que ocurre en la reacción que se está estudiando implica una oxidación. Para evaluar la participación del O₂ disuelto, se dosó este gas con el correspondiente electrodo selectivo durante la fotólisis. Como muestra la figura 11.8, en una fotólisis de una solución de 6-formilpterina saturada en aire se observa una significativa disminución de la concentración de O₂ con el tiempo de irradiación.

Se analizó por HPLC la evolución de las concentraciones de 6-formilpterina y

6-carboxipterina en los experimentos realizados en presencia de alcohol furfurílico descritos en la sección 10.3. En la fotólisis de la figura 10.18 se partió de una mezcla aireada que contenía ácido fólico ($42 \mu\text{M}$), 6-formilpterina ($32 \mu\text{M}$) y alcohol furfurílico 10 mM . Como se detalló en la explicación de dicho experimento la concentración de ácido fólico varió muy poco durante el mismo. Por lo tanto, puede analizarse la evolución de la concentración de 6-formilpterina sin tener en cuenta a aquel compuesto. La única alteración que produce su presencia es la absorción de parte de la luz incidente, pero debido a su baja concentración, este efecto no es importante.

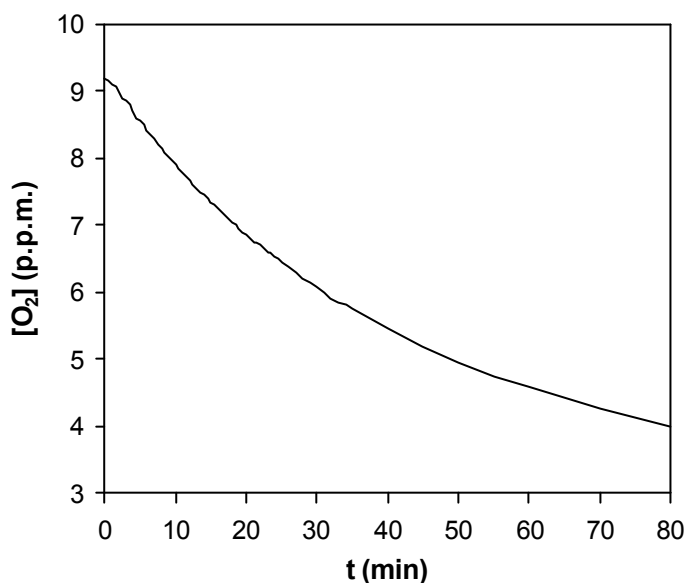


Figura 11.8. Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución de 6-formilpterina (200 M , $\text{pH}=6,0$).

En esta fotólisis se observó que, a diferencia del ácido fólico, la 6-formilpterina se consumía rápidamente. Además se generó en los primeros minutos de irradiación una cantidad apreciable de 6-carboxipterina que alcanza un máximo y luego disminuye. La evolución de la concentración de estos dos compuestos, durante este experimento, se muestra en la figura 11.9.

Estos resultados indican que el O_2 participa en la reacción siendo el agente oxidante, lo cual queda evidenciado por la disminución de su concentración al avanzar la fotólisis. No obstante, no lo hace a través de su intermediario activado, el $^1\text{O}_2$. En el capítulo anterior se demostró que la 6-formilpterina genera $^1\text{O}_2$ al ser irradiada en presencia de O_2 ; sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados en esta sección el mismo no ataca a la molécula y la

fotooxidación que conduce al derivado carboxílico ocurre a través de otro mecanismo.

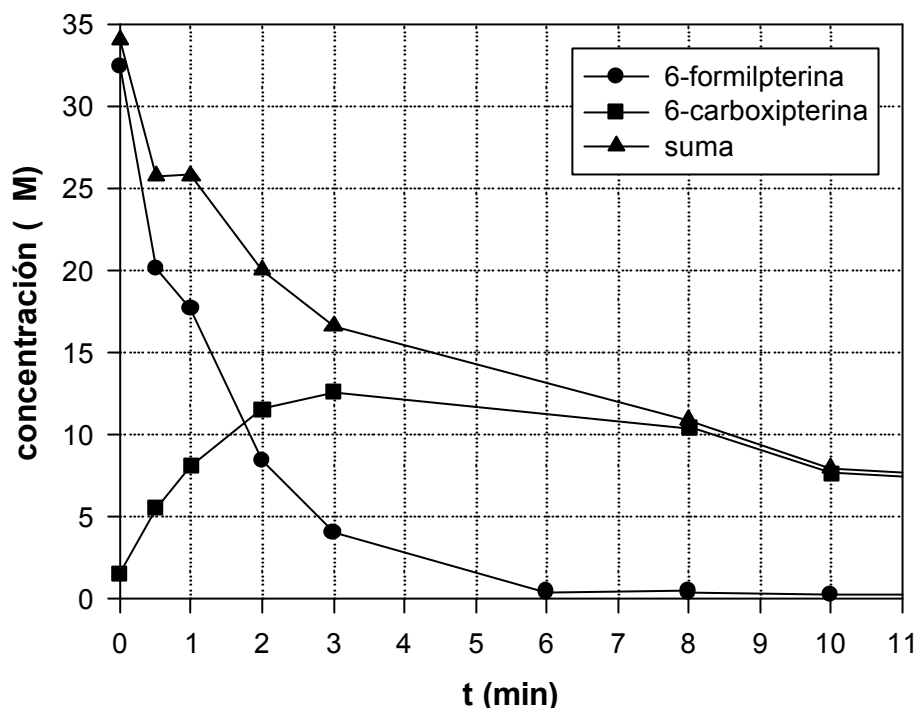


Figura 11.9. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado en presencia de alcohol furfurílico (10 mM).

Es necesario realizar algunas observaciones acerca de los últimos resultados presentados. Nótese en la figura 11.9 que la suma de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina no se mantiene constante sino que, por el contrario, disminuye rápidamente al avanzar la fotólisis. Este hecho podría indicar que el reactivo, bajo estas condiciones experimentales, además de transformarse en 6-carboxipterina, se descompone por otra vía; lo cual no invalida las conclusiones expuestas más arriba, pero sugiere que el alcohol furfurílico está involucrado en esta nueva vía fotodegradativa. Además se observa un consumo importante de 6-carboxipterina lo cual contribuye a que la suma disminuya.

Para obtener mayor información en este sentido, se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones que contenían solamente 6-formilpterina y alcohol furfurílico (recuérdese que el experimento anterior fue llevado a cabo sobre una mezcla que contenía ácido fólico además de estos dos compuestos). Se tomaron los espectros a distintos tiempos de irradiación (figura 11.10.a) y se obtuvieron los correspondientes espectros DE y DEN. Cuando se comparan los espectros DEN con el espectro DTN de la reacción que rinde como

producto 6-carboxipterina, puede apreciarse que existen diferencias entre ellos (figura 11.10.b). Resulta evidente que dicha reacción, si bien está presente, no es la única que está ocurriendo.

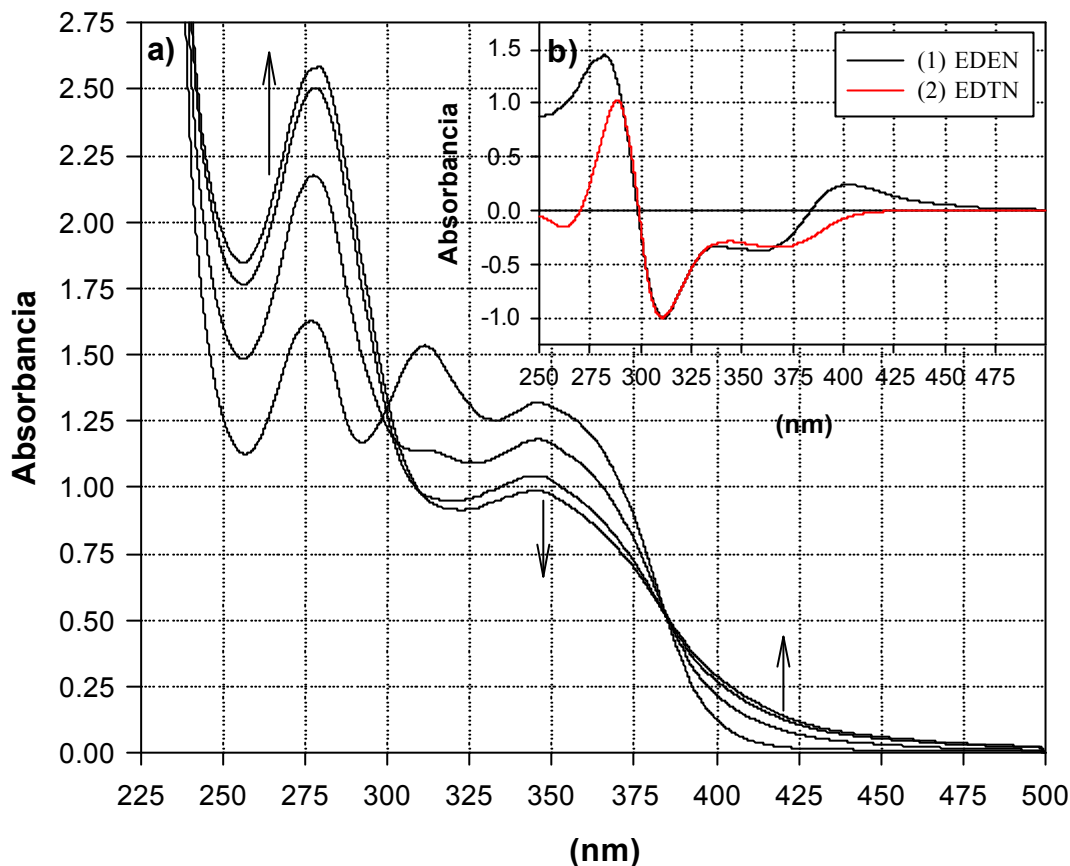


Figura 11.10. a) Evolución del espectro de una solución de 6-formilpterina (160 μ M, pH=6,0), y alcohol furfurílico (10 mM) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación. b) (1) Espectro DEN obtenido luego de 2 min de irradiación. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones que contiene 6-formilpterina 100 μ M y 6-carboxipterina 100 μ M.

Debido a que las soluciones empleadas para estos experimentos son estables en la oscuridad, puede especularse sobre la posible reacción de la 6-formilpterina excitada con el alcohol furfurílico o con alguno de sus productos oxidados por reacción con el 1O_2 . Sin embargo, no es objetivo de este capítulo profundizar sobre esta cuestión.

11.3. Fotólisis de 6-formilpterina en ausencia de O₂.

Cuando se irradia una solución ligeramente ácida de 6-formilpterina burbujeada con N₂, se observa que la solución, inicialmente de un color amarillo muy pálido, se torna, en el término de unos pocos minutos, color naranja-rojizo. Este efecto queda registrado en los profundos cambios espectrales que ocurren como consecuencia de la irradiación. Estos resultados se muestran en la figura 11.11. Puede observarse la aparición de una banda de absorción, relativamente poco intensa y ancha, con un máximo en 480 nm. Ninguno de los patrones comerciales de pterinas mencionados presenta tal característica espectral. Por ende, los espectros DEN de la fotólisis no concuerdan con ninguno de los posibles espectros DTN obtenidos a partir de soluciones patrones. No puede, en consecuencia, proponerse la identidad de este "fotoproducto rojo" en base a comparaciones espectrofotométricas con soluciones de patrones comerciales.

El "fotoproducto rojo" no es estable en presencia de O₂. 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 11.12 la desaparición de la banda con máximo en 480 nm. Esto implica, obviamente la pérdida del color rojo-anaranjado de la solución irradiada.

La figura 11.13.a muestra el espectro DEN obtenido en la reacción que ocurre al airear la solución irradiada en ausencia de O₂. El espectro de la figura 11.13.b es el espectro DEN global obtenido en el proceso de irradiación (en condiciones anaeróbicas) y posterior aireación. Es decir, este espectro se obtuvo restando al espectro 3 de la figura 11.11 el espectro 1 de la misma figura y luego normalizando. En la figura 11.13.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 O₂ del aire es la 6-carboxipterina.

Los experimentos de TLC muestran que, en las soluciones irradiadas en ausencia de O₂ y posteriormente aireadas, aparece una mancha fluorescente con R_f coincidente con el de la 6-carboxipterina. Estos resultados pueden apreciarse en la figura 11.14. Puede observarse además que la intensidad de la mancha del reactivo disminuye con el tiempo de irradiación y que no se detectan otras manchas que indiquen la presencia de otros fotoproductos.

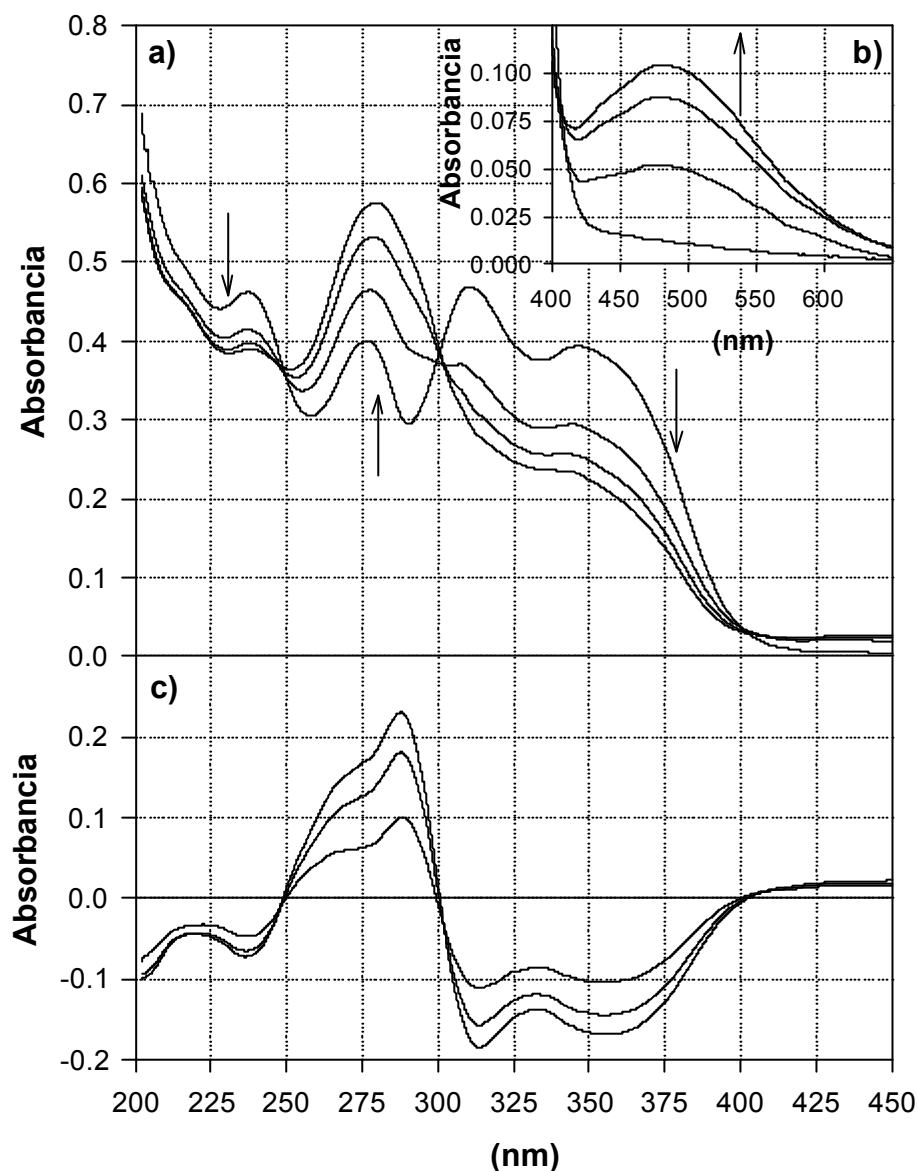


Figura 11.11. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (200 M, pH= 5,8) al ser irradiada en ausencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 2 min. y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Detalle de la zona del espectro comprendida entre 400 y 650 nm. Camino óptico= 1 cm. c) Espectros DE correspondientes.

Se analizaron por HPLC soluciones de 6-formilpterina irradiadas en condiciones anaeróbicas durante períodos crecientes de tiempo y posteriormente puestas en contacto con el aire. Se observa, en estas muestras, la aparición de un pico correspondiente a la 6-carboxipterina, el cual aumenta su área con el tiempo de irradiación. Simultáneamente se

observa una disminución del área del pico de la 6-formilpterina. En la figura 11.15 se muestra un cromatograma típico obtenido durante este experimento.

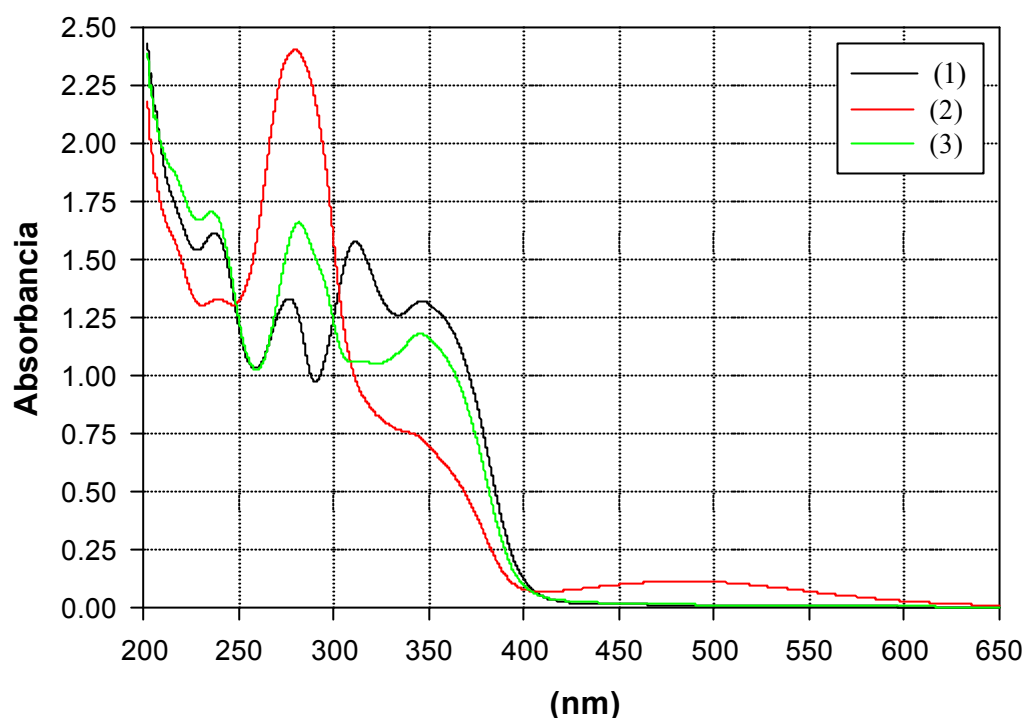


Figura 11.12. Espectros obtenidos en un experimento de fotólisis partiendo de una solución de 6-formilpterina (134 M , $\text{pH}=5,0$) Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. (1) Espectro de la solución original no irradiada. (2) Espectro de la solución irradiada 10 minutos en ausencia de O_2 . (3) Espectro de la solución irradiada 10 minutos en ausencia de O_2 y luego aireada.

En la figura 11.16 se muestra la evolución de las concentraciones de los dos compuestos. Se obtuvieron las siguientes velocidades en este experimento: $-14 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ para la descomposición de la 6-formilpterina y $16,8 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ para la formación de 6-carboxipterina. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $3,5 \times 10^{-2}$ y $4,2 \times 10^{-2}$, respectivamente. Estos valores indican que la única vía cuantitativamente importante de descomposición de la 6-formilpterina es su oxidación a 6-carboxipterina. Además son comparables a los rendimientos cuánticos correspondientes a los experimentos realizados en presencia de O_2 . En definitiva, realizando la irradiación en ausencia de O_2 y luego aireando la solución, se obtiene el mismo producto y con el mismo rendimiento cuántico que en las fotólisis realizadas en condiciones aeróbicas. Esto sugiere que en ambas condiciones experimentales la reacción ocurre a través del mismo mecanismo: se genera un fotoproducto

que posteriormente reacciona con el O₂ disuelto en el medio.

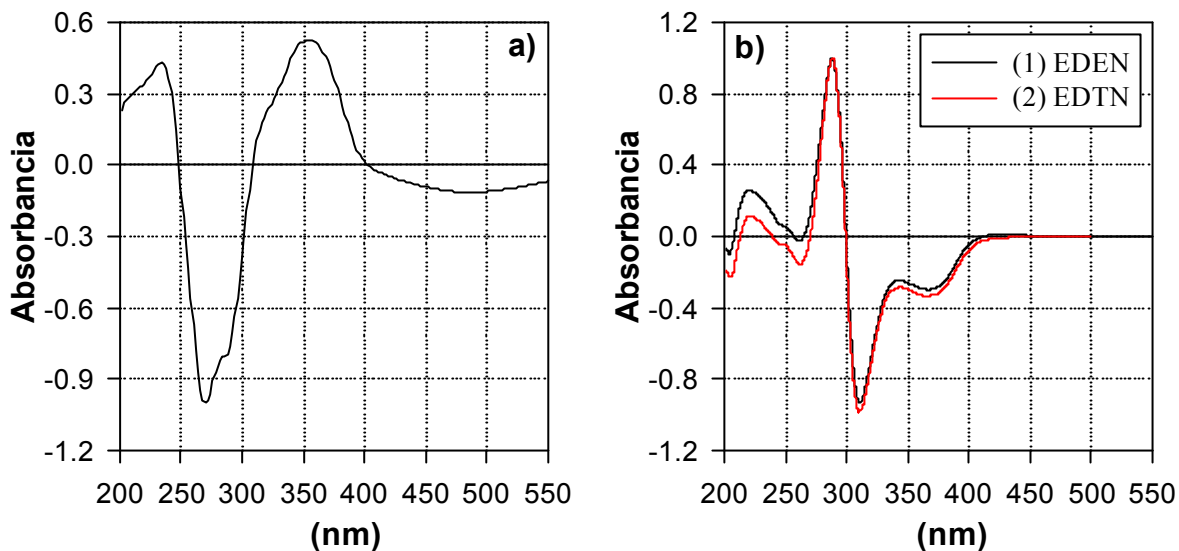


Figura 11.13. a) Espectro DEN obtenido entre los espectros 2 y 3 de la figura 11.11. b) (1) Espectro DEN obtenido entre los espectros 1 y 3 de la figura 11.11. (2) Espectro DTN entre una solución que contiene 6-formilpterina 100 M y 6-carboxipterina 100 M.

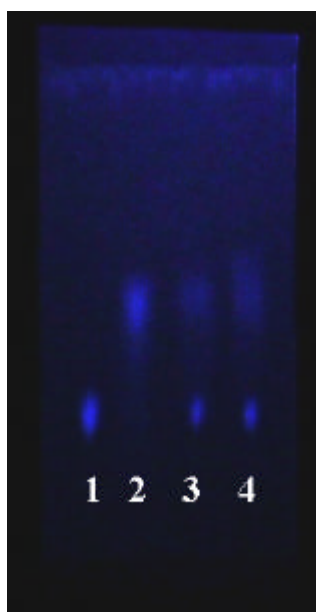


Figura 11.14. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 150 M; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 M; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 M (pH= 5,5) irradiada con luz de 350 nm; 10 min. y 30 min. respectivamente.

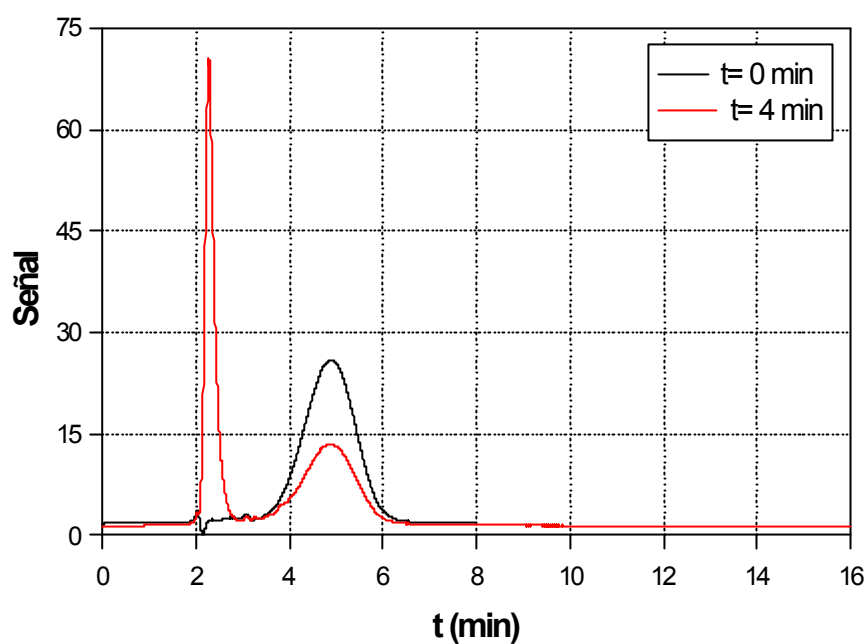


Figura 11.15. Cromatogramas. Solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 5,0) irradiada con luz UV-A de $\lambda = 350$ nm. λ de análisis= 340 nm.

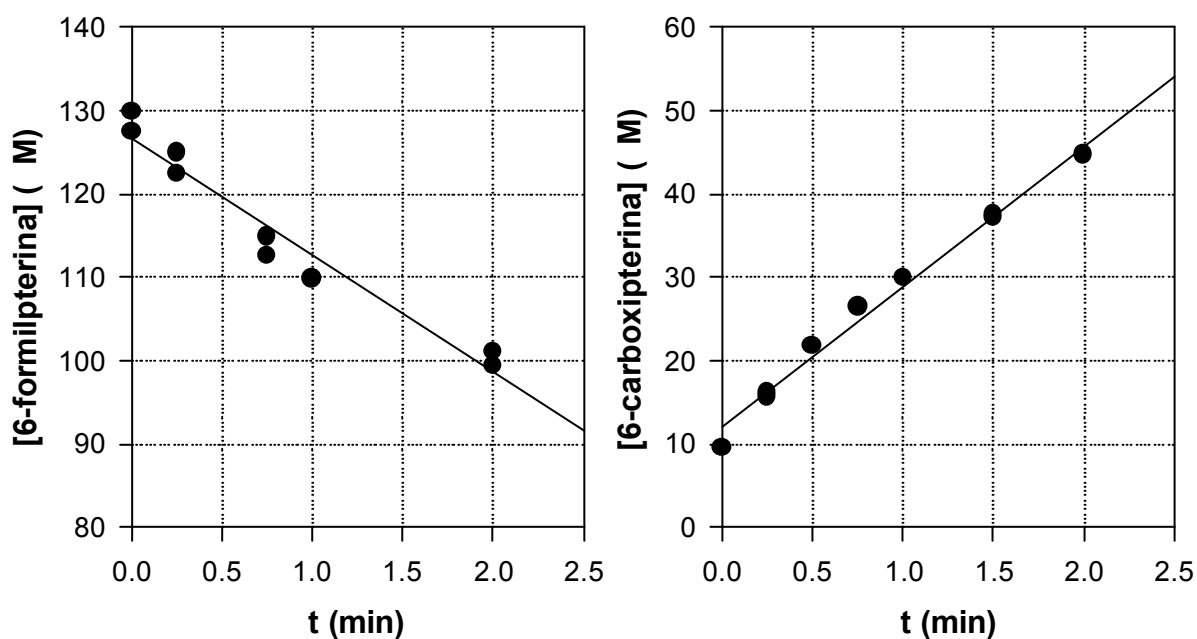


Figura 11.16. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina (130 μ M y pH= 5,2).

En el experimento recién descrito, se obtuvieron los espectros de absorción de las

soluciones irradiadas antes de ser aireadas. Luego, como se explicó, se pusieron en contacto con el aire y fueron analizadas por HPLC, obteniéndose las concentraciones de las sustancias involucradas en la reacción para los distintos tiempos de irradiación. A partir de estos datos y el espectro de una solución patrón de 6-formilpterina se obtuvo la evolución de los espectros de dicha sustancia durante el experimento. Pudo, entonces, obtenerse el espectro del "compuesto rojo" de la siguiente manera: para un tiempo de irradiación dado, al espectro de la solución irradiada, pero aún no aireada, se le restó el espectro de la 6-formilpterina (correspondiente a la concentración a ese tiempo determinada por HPLC). Los espectros así determinados a distintos tiempos, se dividieron por la concentración del "compuesto rojo" que es igual a la concentración determinada por HPLC para la 6-carboxipterina, y se promediaron obteniéndose el espectro que se muestra en la figura 11.17.

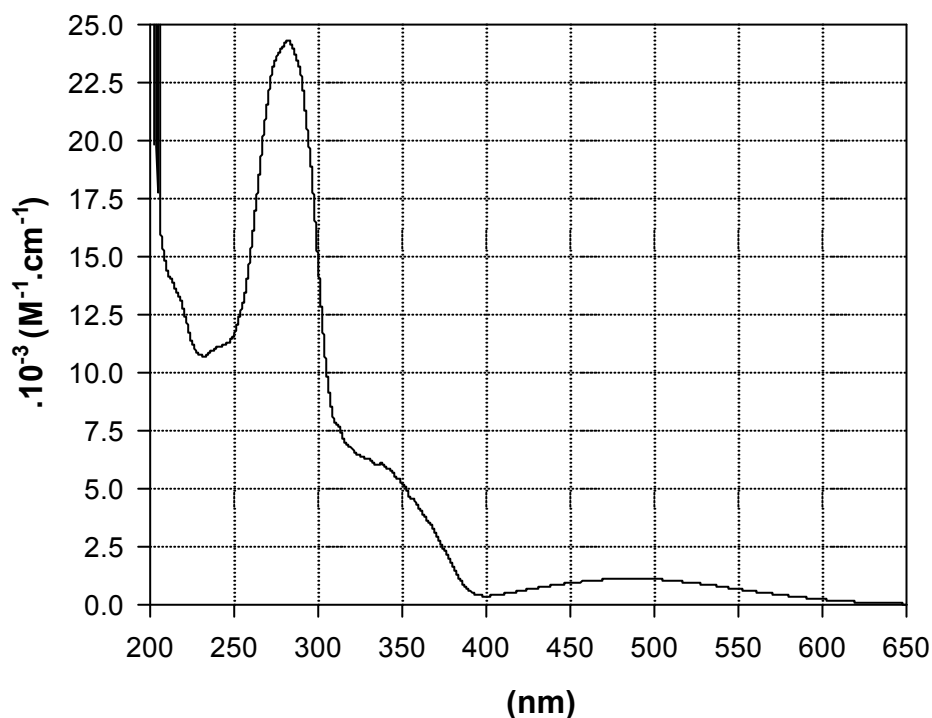


Figura 11.17. Espectro del "compuesto rojo" obtenido según se explica en el texto.

11.4. Estudio de fotólisis de flash.

Se realizaron experimentos de fotólisis de flash empleando la técnica descrita en la sección 8.1 sobre soluciones ligeramente ácidas de 6-formilpterina en presencia de O₂.

Variando la concentración del reactivo y la longitud de onda de análisis se buscaron las condiciones experimentales óptimas. De esta manera, se emplearon soluciones de concentración comprendidas entre 25 y 100 μM y longitudes de onda comprendidas entre 390 y 550 nm. A longitudes de onda superiores no se observan cambios espectrales. Por otro lado, los altos coeficientes de extinción molar de la 6-formilpterina, junto con el relativamente bajo rendimiento cuántico de los procesos observados, evitaron que se pudieran apreciar señales por debajo del mencionado rango espectral.

Las trazas obtenidas son compatibles con la formación de un intermediario que absorbe más luz que la 6-formilpterina a longitudes de onda superiores a 420 nm y que se genera, mayoritariamente, dentro del período de tiempo que dura el flash de luz. Este intermediario se transforma, posteriormente, en un producto estable. La cinética de esta última reacción puede ser analizada debido a que la misma ocurre en el rango de los milisegundos. Se encontró que la amplitud de las señales es máxima a 480 nm; en la figura 11.18 se observa una señal obtenida a dicha longitud de onda.

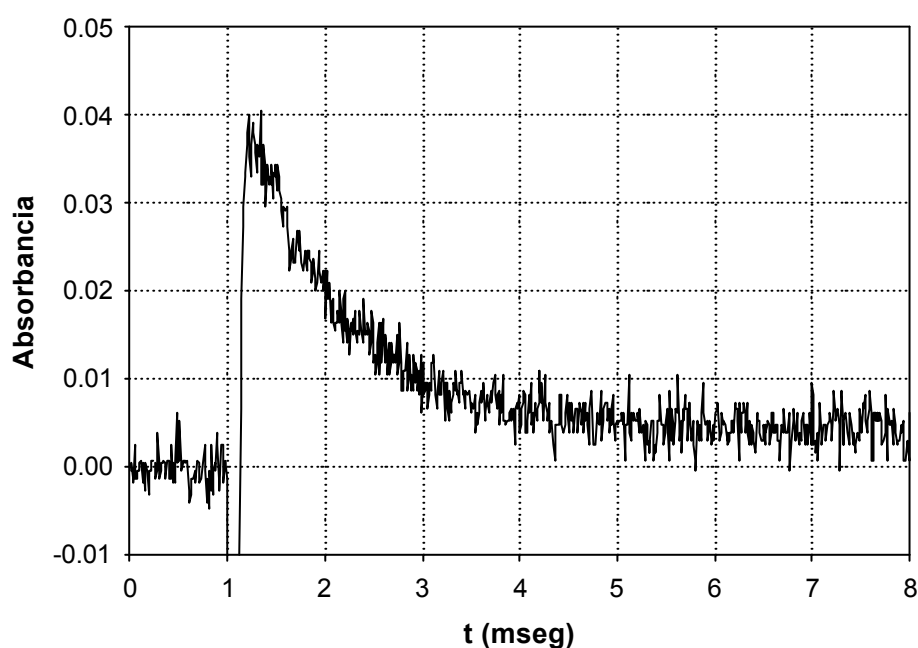


Figura 11.18. Experimento de fotólisis de flash realizado sobre una solución de 6-formilpterina (50 μM , pH= 5,9), en presencia de O_2 .

Se encontró que el proceso observado se ajusta a una cinética de primer orden y que la constante cinética aparente obtenida a partir de las distintas señales es independiente de la longitud de onda. En la figura 11.19 se muestra una de las señales estudiadas. El análisis de

quince señales obtenidas en el rango de longitudes de onda comprendido entre 470 y 490 nm, arrojó un valor de $0,95 \pm 0,09 \text{ mseg}^{-1}$ para la constante cinética aparente (k_{ap}).

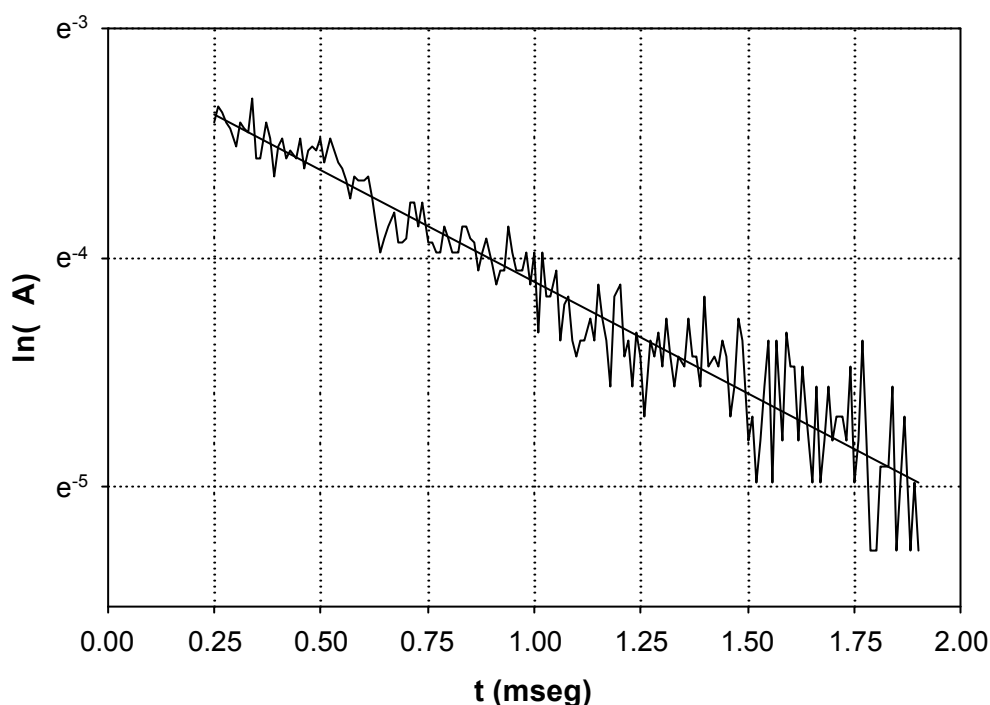


Figura 11.19. Regresión lineal sobre una gráfica en escala logarítmica que muestra el comportamiento cinético de primer orden del proceso analizado.

Como fue demostrado anteriormente, el compuesto rojo es estable en ausencia de O_2 , lo cual implica que, en estas condiciones, el valor de k_{ap} es 0. Puede suponerse que la ecuación de velocidad de la reacción entre el mencionado intermediario y el O_2 es la siguiente:

$$-d[CR]/dt = k \cdot [CR] \cdot [O_2]$$

donde CR es el compuesto rojo y k es la constante de velocidad bimolecular de la reacción.

Por lo tanto, la constante k_{ap} obtenida puede escribirse como:

$$k_{ap} = k \cdot [O_2]$$

Los experimentos de fotólisis de flash fueron realizados con soluciones saturadas en aire y la concentración en agua del O_2 en estas condiciones es $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Con este valor y el obtenido experimentalmente para k_{ap} puede determinarse k. Este cálculo arroja un valor de $3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En la figura 11.20 se muestra un espectro diferencia normalizado obtenido en esta serie de experimentos. El mismo fue construido a partir de la diferencia, a distintas longitudes

de onda, entre la absorbancia un milisegundo después del flash y la absorbancia antes del mismo. En dicha figura se muestra también, con fines comparativos, un espectro DEN obtenido en una fotólisis estacionaria llevada a cabo en ausencia de oxígeno, tal como se detalló en la sección anterior. Puede apreciarse que los puntos correspondientes a los experimentos de fotólisis de flash, si bien presentan una dispersión considerable, son compatibles con el espectro DEN que se obtiene en los experimentos donde se genera el “compuesto rojo” descrito anteriormente.

Estas consideraciones permiten proponer que el intermediario detectado con la técnica de fotólisis de flash es el “compuesto rojo” y que la reacción cuya cinética se ha analizado es la reacción entre dicho intermediario y el O_2 presente en el seno de la solución.

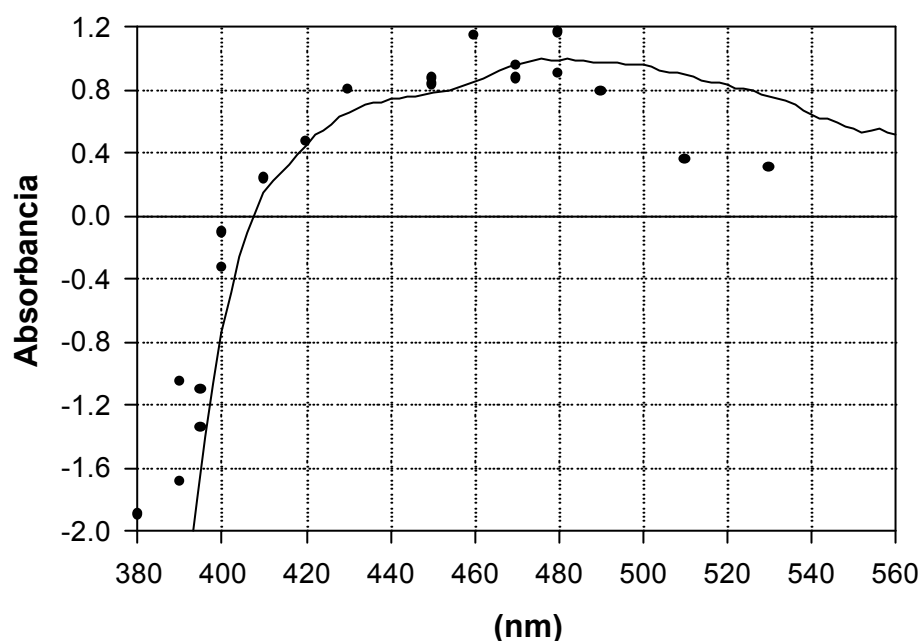


Figura 11.20. La línea corresponde a un espectro DEN obtenido luego de 6 minutos de irradiación en la fotólisis estacionaria descrita en la figura 11.10. Los puntos representan el espectro DEN obtenido en los experimentos de fotólisis de flash 1 milisegundo después del flash.

11.5. Conclusiones

La fotooxidación de la 6-formilpterina a 6-carboxipterina ocurre a través de un proceso que puede ser dividido en dos etapas. En la primera, la excitación de la molécula conduce a la formación de un “compuesto rojo” con características espectrales muy

6-acil-5,8-dihidropterinas se oxidan rápidamente en presencia de O₂, no se realizó un estudio cinético sobre estas reacciones. Es más, no fueron encontrados en literatura reportes de constantes de velocidad de reacciones de este tipo.

Capítulo 12.

Fotólisis de 6-carboxipterina y pterina.

Tanto en el capítulo 10 como en el capítulo 11 se mostraron resultados que sugieren que la 6-carboxipterina también se degrada fotoquímicamente, aunque es menos fotosensible que el ácido fólico y la 6-formilpterina. En este capítulo se presentan los resultados de los experimentos realizados irradiando soluciones ligeramente ácidas de 6-carboxipterina en presencia y en ausencia de O_2 . Al igual que en las fotólisis explicadas en los capítulos anteriores, esta diferencia en las condiciones experimentales conduce a resultados distintos. Asimismo se llevaron a cabo experimentos tendientes a identificar a los productos de reacción y se calcularon los correspondientes rendimientos cuánticos. Sobre el final del capítulo se exponen los resultados obtenidos en experimentos realizados sobre soluciones de pterina.

12.1. Fotólisis de 6-carboxipterina en presencia de O_2 .

Cuando se irradia una solución acuosa de 6-carboxipterina con pH en el rango comprendido entre 4 y 7, se observan profundos cambios en su espectro de absorción. En la figura 12.1a se muestran estos cambios, en la figura 12.1b se observan los correspondientes espectros diferencia.

Se realizaron experimentos similares al mostrado en la figura 12.1 en los cuales se fue variando el pH en el rango comprendido ente 4 y 7. En todos los casos, los cambios espectrales fueron similares. Por otra parte, la velocidad de estos cambios fue igual en todos los experimentos.

Los experimentos de TLC, realizados sobre muestras de una solución de 6-carboxipterina irradiada, permiten separar dos fracciones. Una proviene de la porción de

reactivo no fotolizado; la otra, presenta valores de R_f similares a los del patrón de pterina para los dos sistemas de solvente de corrida ensayados. En la figura 12.2 pueden observarse estos resultados, los cuales sugieren fuertemente que la 6-carboxipterina se descarboxila para dar pterina.

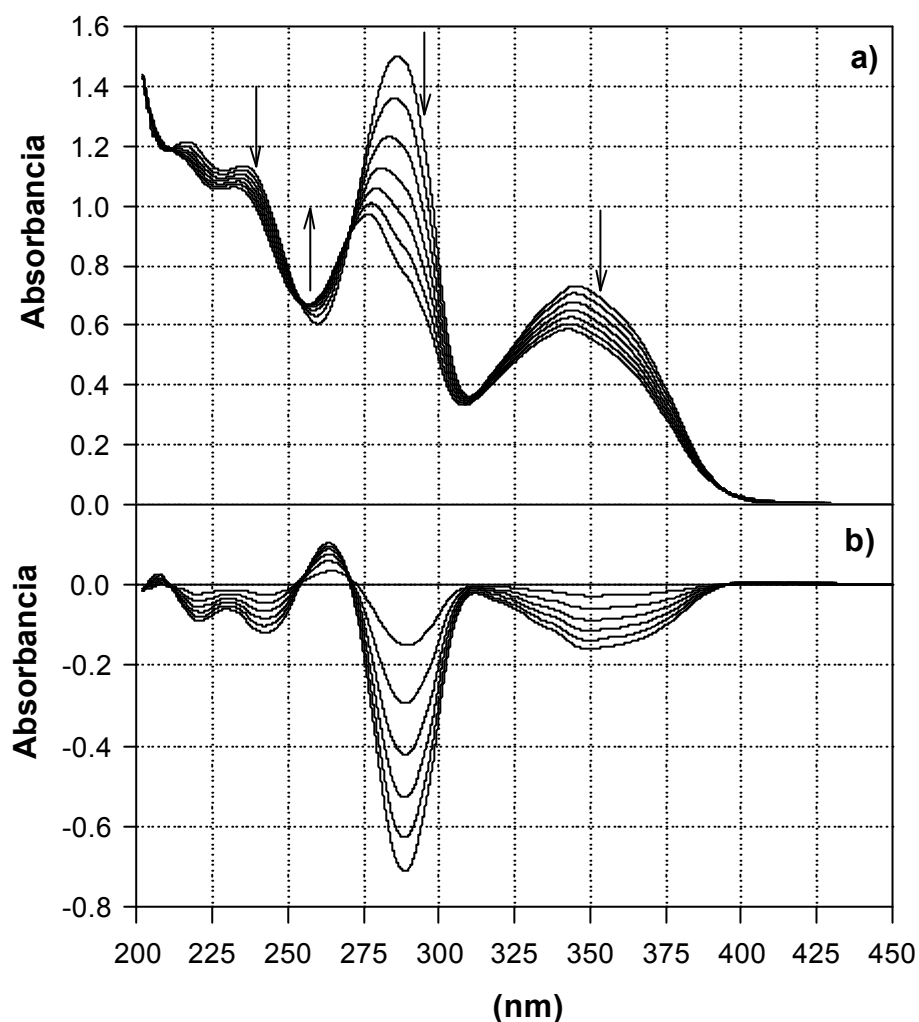


Figura 12.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 6,0) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 10 min, durante 60 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.

Los cambios espectrales mostrados anteriormente son compatibles con la producción de pterina. En efecto, el espectro DEN obtenido durante la fotólisis presenta marcadas similitudes con el espectro DTN que se obtiene a partir de los espectros de las correspondientes soluciones patrón de 6-carboxipterina y pterina. En la figura 12.3 se

muestran comparativamente ambos espectros.

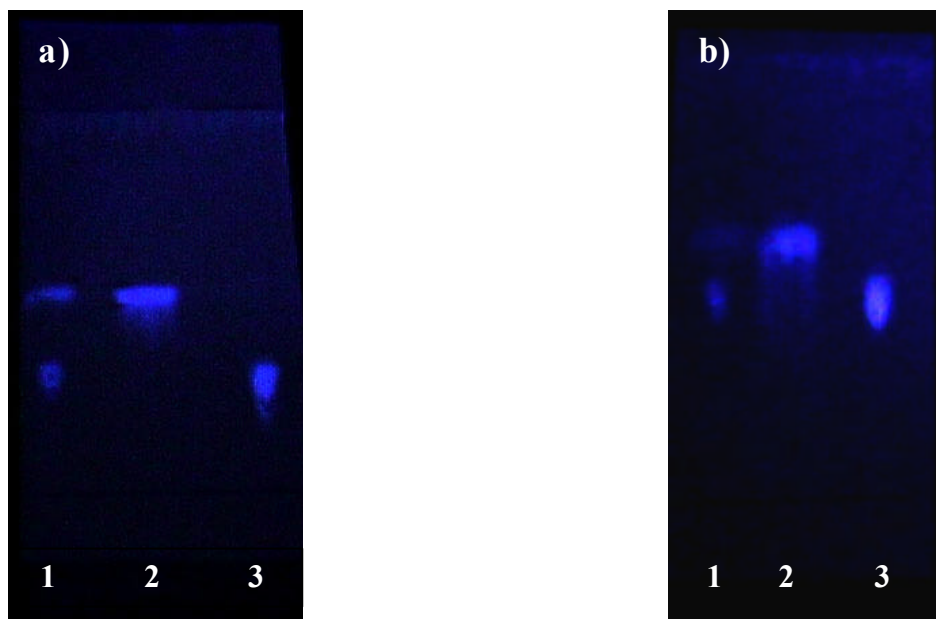


Figura 12.2. Corridas de TLC. a) Solvente de corrida: mezcla de 1-butanol, ácido acético y agua (4:1:2); b) Solvente de corrida: NH_4Cl 3%(p/v). Calles: 1, solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 6,0) irradiada 60 min con luz de 350 nm; 2, solución patrón de pterina (100 M); 3, solución patrón de 6-carboxipterina (100 M).

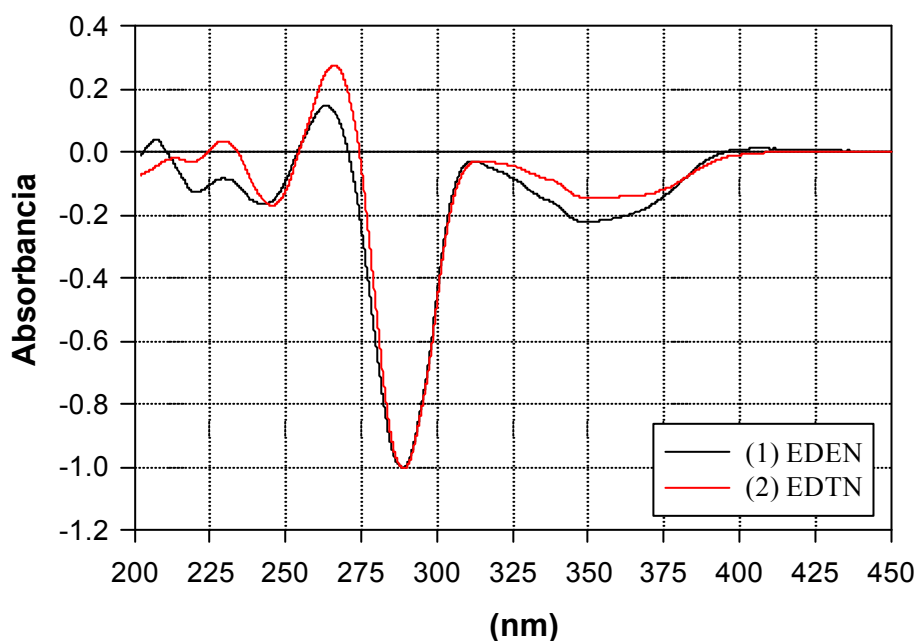


Figura 12.3. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 60 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución de pterina 100 M y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración.

Mediante la técnica de HPLC se logró separar y cuantificar las dos sustancias identificadas por TLC. En la figura 12.4 pueden observarse los cromatogramas correspondientes a ambas sustancias empleando el sistema cromatográfico especificado en la sección 7.4 como sistema de corrida II. Cuando se inyecta en el equipo una muestra de solución de 6-carboxipterina irradiada puede observarse la aparición de un pico correspondiente a la pterina (figura 12.4c). Si se inyectan muestras a distintos tiempos de irradiación es posible apreciar una disminución gradual en el área del pico correspondiente a la 6-carboxipterina, acompañado por un aumento en el correspondiente a la pterina. Este efecto puede observarse en la figura 12.5.

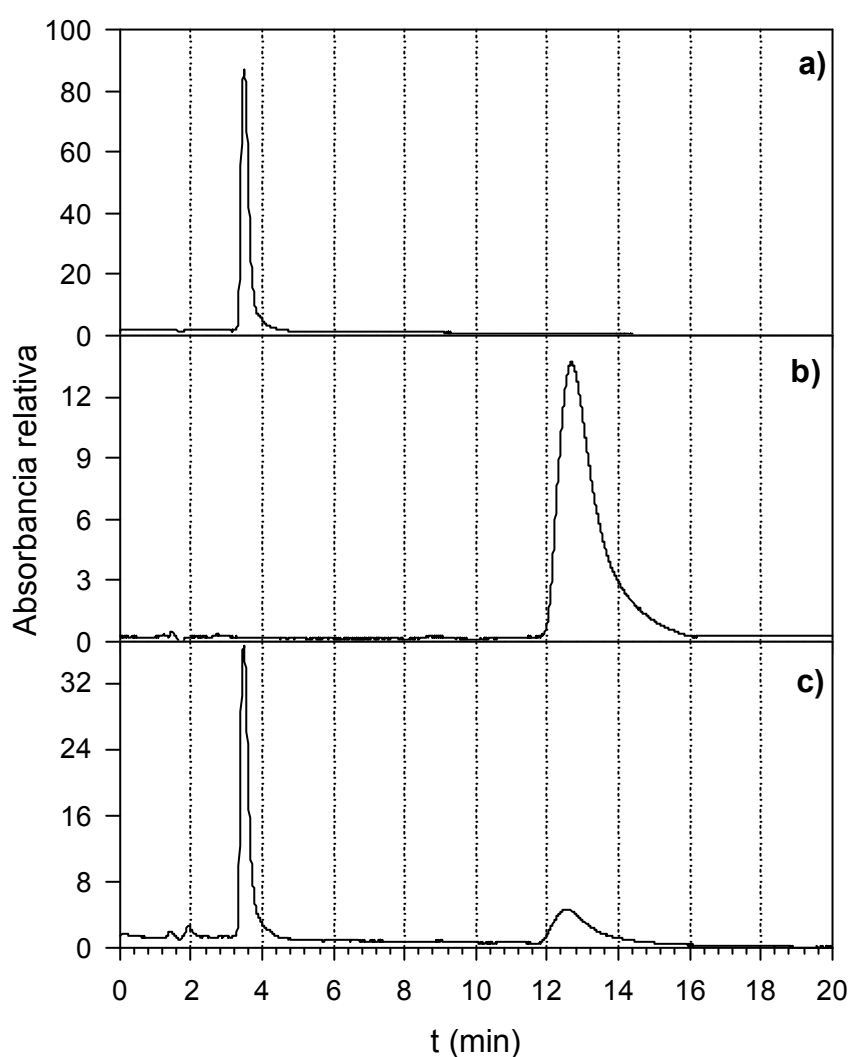


Figura 12.4. Cromatogramas. a) Solución de 6-carboxipterina 200 M. b) Solución de pterina 200 M. c) Solución de 6-carboxipterina 200 M irradiada 90 min con luz UV-A de $\lambda = 350$ nm. Para los tres cromatogramas la λ de análisis fue 340 nm.

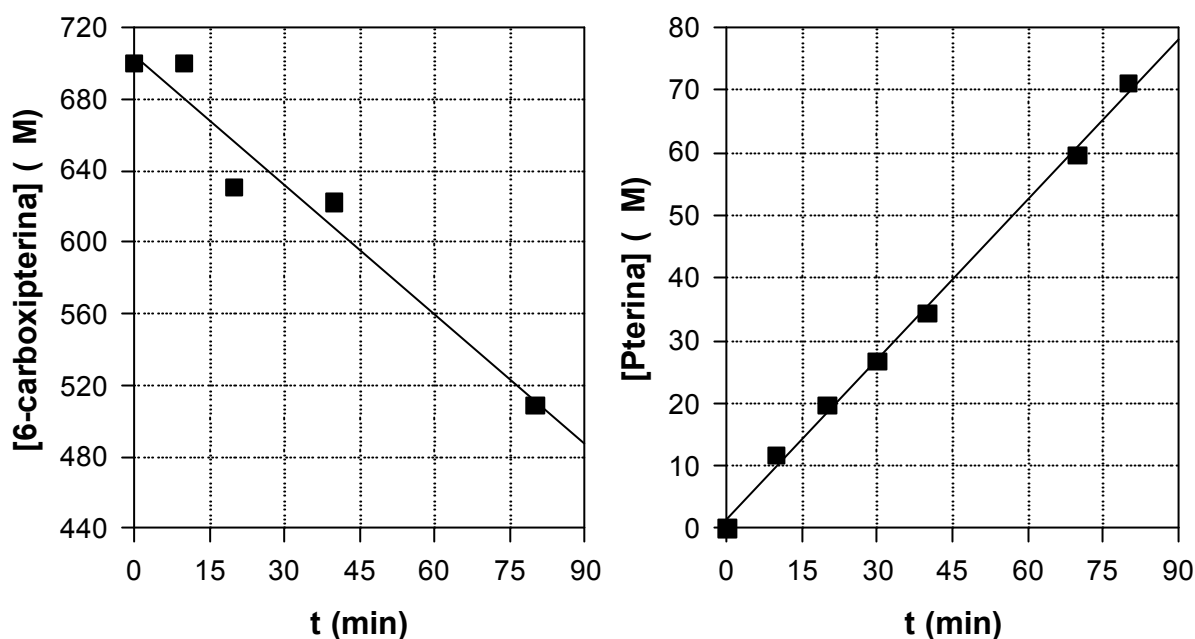


Figura 12.5. Evolución de las concentraciones de 6-carboxipterina y pterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 700 M y pH= 6,0.

Se obtuvieron valores de $-2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}/\text{min}$ y $0,85 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$ para las velocidades de consumo de 6-carboxipterina y de formación de pterina, respectivamente. El cálculo del rendimiento cuántico de formación de pterina arrojó un valor de $1,9 \times 10^{-3}$. Sin embargo, el rendimiento cuántico de consumo de 6-carboxipterina es superior ($5,1 \times 10^{-3}$). De estos resultados, se desprende que sólo el 37 % del reactivo fotolizado se descarboxila para formar pterina; debiendo existir, por ende, otra vía de fotodescomposición.

Esta segunda vía debe dar como producto una o más sustancias no detectables con las técnicas de TLC y HPLC, utilizadas en las condiciones experimentales descritas. Es decir, que este producto podría ser un compuesto de naturaleza no pteridínica y, por ello, no presentar la típica emisión de luz azul, ni tener la banda de absorción en la zona del espectro comprendida entre 320 y 400 nm.

Este resultado, además, puede justificar las diferencias en los espectros DTN y DEN observadas en la figura 12.3. Si bien, como se mencionó, estos espectros son parecidos entre sí, presentan algunas variaciones que no pueden ser ignoradas, principalmente en la zona comprendida entre 200 y 250 nm.

Las medidas de concentración de O_2 disuelto, realizadas durante la irradiación, muestran un consumo significativo del O_2 al avanzar la fotólisis (figura 12.6). La conversión

de 6-carboxipterina en pterina no implica una oxidación del reactivo, por lo cual no justifica el consumo de O_2 . Sin embargo, la segunda vía de descomposición del reactivo, sugerida por las diferencias en las velocidades de descomposición de 6-carboxipterina y de formación de pterina podría justificar estos resultados. Esta segunda reacción correspondería, por lo tanto, a una fotooxidación.

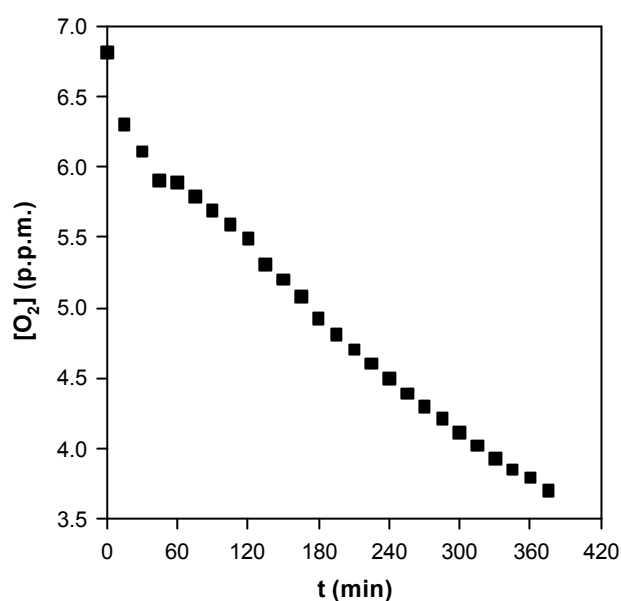


Figura 12.6. Disminución en la concentración de O_2 disuelto durante la fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 200 μ M (pH= 6,0).

Se realizaron medidas de pH durante la irradiación, en las cuales pudo detectarse una disminución del mismo al avanzar la fotólisis. De esta manera, en un experimento en el que se partió de una solución de 6-carboxipterina (200 μ M), el pH descendió desde un valor inicial de 6,43 a uno final de 6,00 luego de 120 min de exposición a la luz. El aumento en la concentración de CO_2 disuelto como consecuencia de su producción en la reacción estudiada podría justificar esta observación.

12.2. Fotólisis de 6-carboxipterina en ausencia de O_2 .

Como muestra la figura 12.7, los cambios espectrales que se producen durante la irradiación de soluciones burbujeadas con N_2 son parecidos a los observados en las soluciones

aireadas, pero presentan algunas diferencias significativas. El espectro DEN de este proceso se correlaciona mucho mejor con el espectro DTN que se obtiene de los espectros de las soluciones patrón de pterina y 6-carboxipterina (figura 12.8) que el espectro DEN obtenido en la fotólisis en presencia de O₂. Esto sugiere que, en condiciones anaeróbicas, la descarboxilación para rendir pterina constituye la principal vía de destrucción del reactivo o, al menos, tiene una importancia relativa mayor que en condiciones aeróbicas.

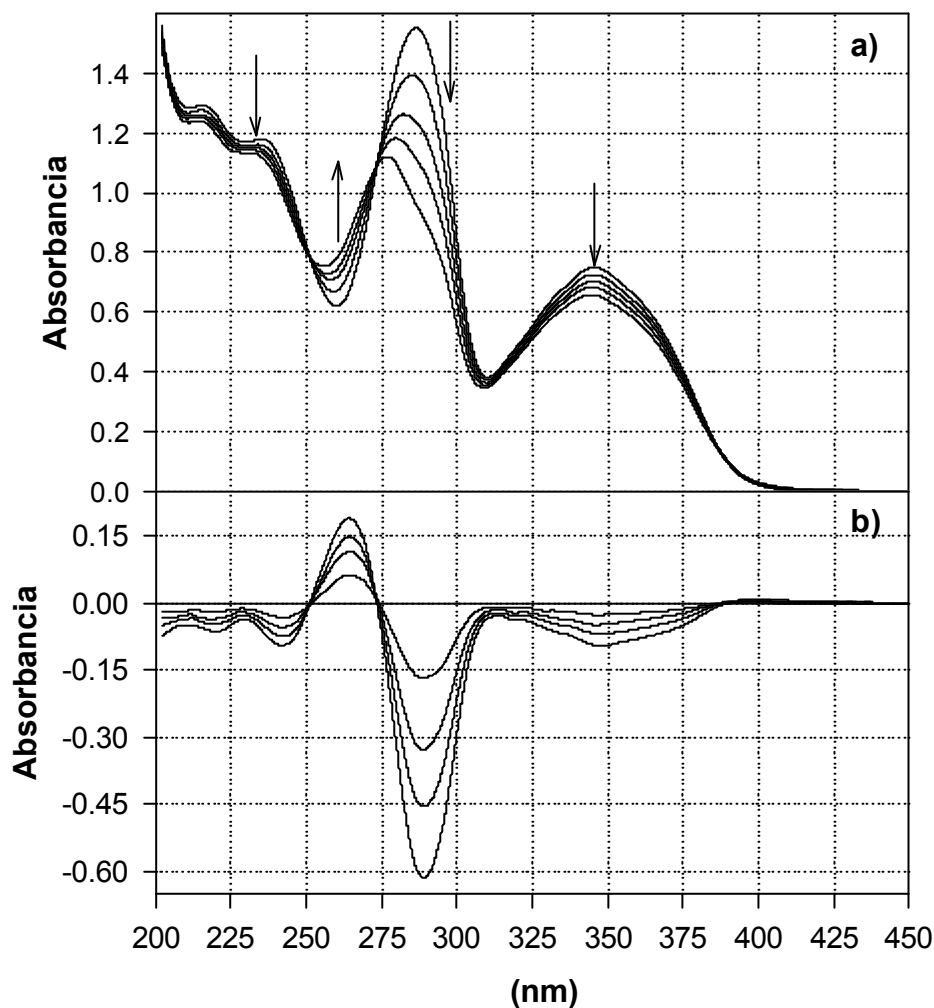


Figura 12.7. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 6,0) al ser irradiada en ausencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 15 min y las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

Los experimentos de TLC muestran la separación de las mismas fracciones que se observan en las soluciones irradiadas en presencia de O₂, corroborando la presencia de pterina en las soluciones irradiadas (figura 12.9). Además, estos resultados confirman que la

descarboxilación fotoquímica de la 6-carboxipterina es independiente de la presencia de O_2 en el medio.

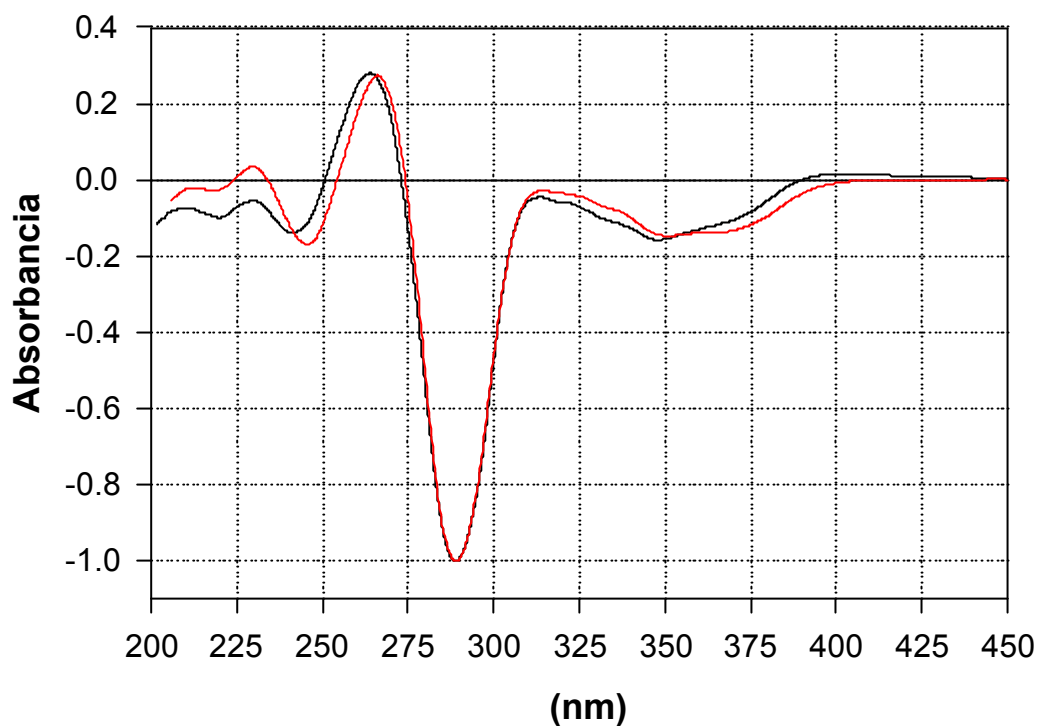


Figura 12.8. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 110 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución de pterina 100 M y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración.

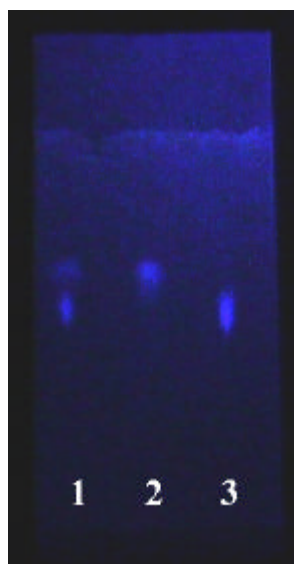


Figura 12.9. Carridas de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 200 M (pH= 6,0) irradiada 90 min con luz de 350 nm; 2, solución patrón de pterina 100 M; 3, solución patrón de 6-carboxipterina 200 M.

Los resultados de los experimentos de HPLC muestran un comportamiento similar al observado anteriormente. En efecto, como puede apreciarse en la figura 12.10, en las soluciones irradiadas se observa la aparición de un pico correspondiente a la pterina. El área de este pico aumenta con el tiempo de irradiación, a la vez que se observa una disminución en el área correspondiente al pico de la 6-carboxipterina.

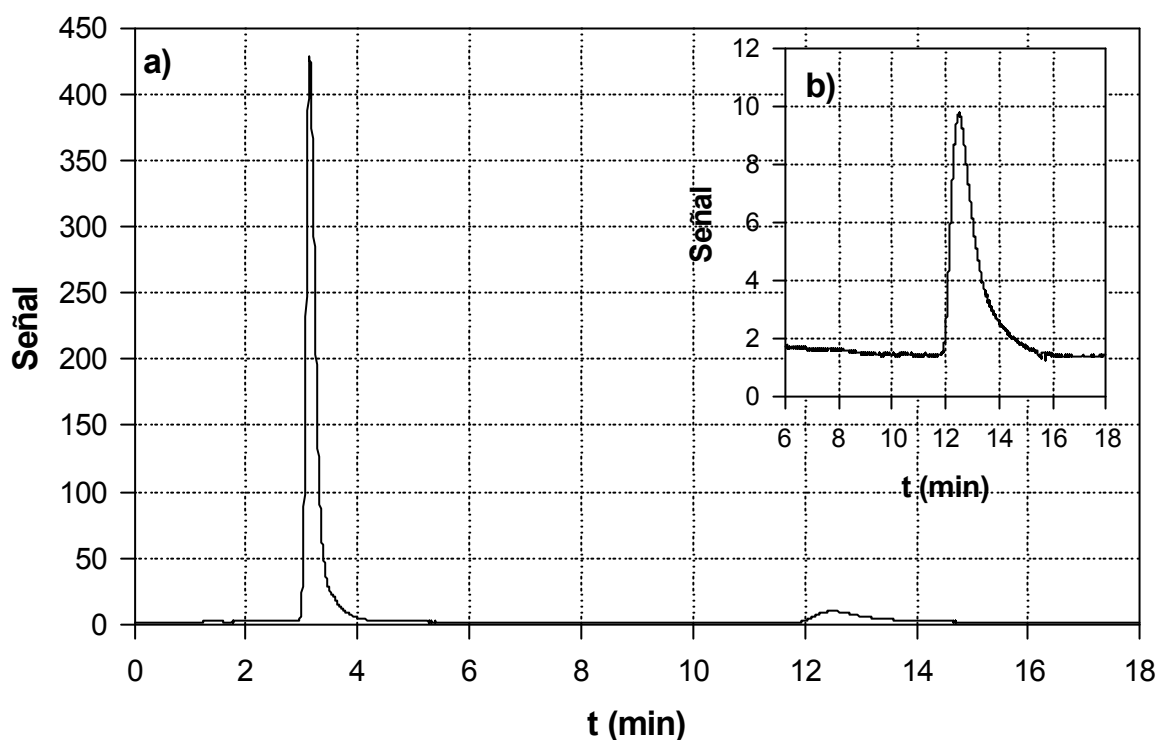


Figura 12.10. Cromatogramas. a) Solución de 6-carboxipterina 200 M, burbujeada con N₂ e irradiada 45 min con luz UV-A de $\lambda = 350$ nm. de análisis 270 nm. b) Detalle del pico correspondiente a pterina.

En la figura 12.11 se muestra la evolución de la concentración de los dos compuestos. La velocidad de consumo de reactivo, en este caso, es menor a la determinada en los experimentos en presencia de O₂. De esta manera, el cálculo del correspondiente rendimiento cuántico arroja un valor de $3,1 \times 10^{-3}$ que es sensiblemente menor al calculado para la fotólisis en presencia de O₂ ($5,1 \times 10^{-3}$). Esta diferencia se debe, seguramente, a la ausencia de la vía oxidativa en la fotólisis de las soluciones burbujeadas con N₂. La determinación del rendimiento cuántico para la formación de pterina arrojó un valor de $2,4 \times 10^{-3}$. Este valor es comparable con el correspondiente obtenido en presencia de O₂ ($1,9 \times 10^{-3}$), indicando que la velocidad de descarboxilación no es afectada de manera importante por dicho gas

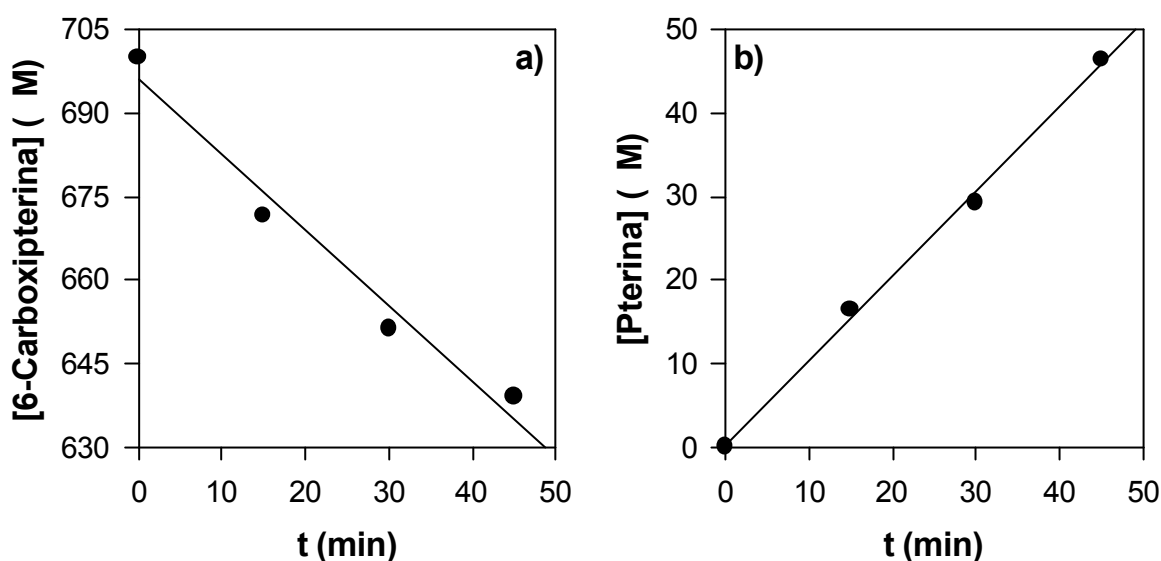


Figura 12.11. Evolución de las concentraciones de 6-carboxipterina y pterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución, burbujeada con N_2 , de 6-carboxipterina 700 M y pH= 6,0.

12.3. Fotólisis de pterina.

Se realizaron fotólisis de soluciones ligeramente ácidas de pterina. La figura 12.12 muestra los cambios espectrales observados en un experimento realizado en presencia de O_2 . Nótese que los tiempos de irradiación son relativamente elevados. El espectro DEN se mantiene invariante durante todo el experimento indicando la existencia de un único proceso fotoquímico. Por otra parte, este espectro no pudo correlacionarse con ninguno de los espectros DTN obtenidos a partir de la combinación de espectros de soluciones patrón.

Las soluciones irradiadas fueron analizadas por TLC de reparto y HPLC con longitud de onda de análisis 340 nm. Con ninguna de las dos técnicas pudieron detectarse productos. Esto sugiere que la descomposición fotoquímica de la pterina genera uno o más productos que no absorben luz a 340 nm y que no son fluorescentes.

Los resultados de los experimentos realizados en ausencia de O_2 muestran que la pterina es fotoestable en estas condiciones. En efecto, las soluciones irradiadas no muestran cambios espectrales y no pudieron detectarse en las mismas fotoproductos empleando las técnicas de TLC y HPLC.

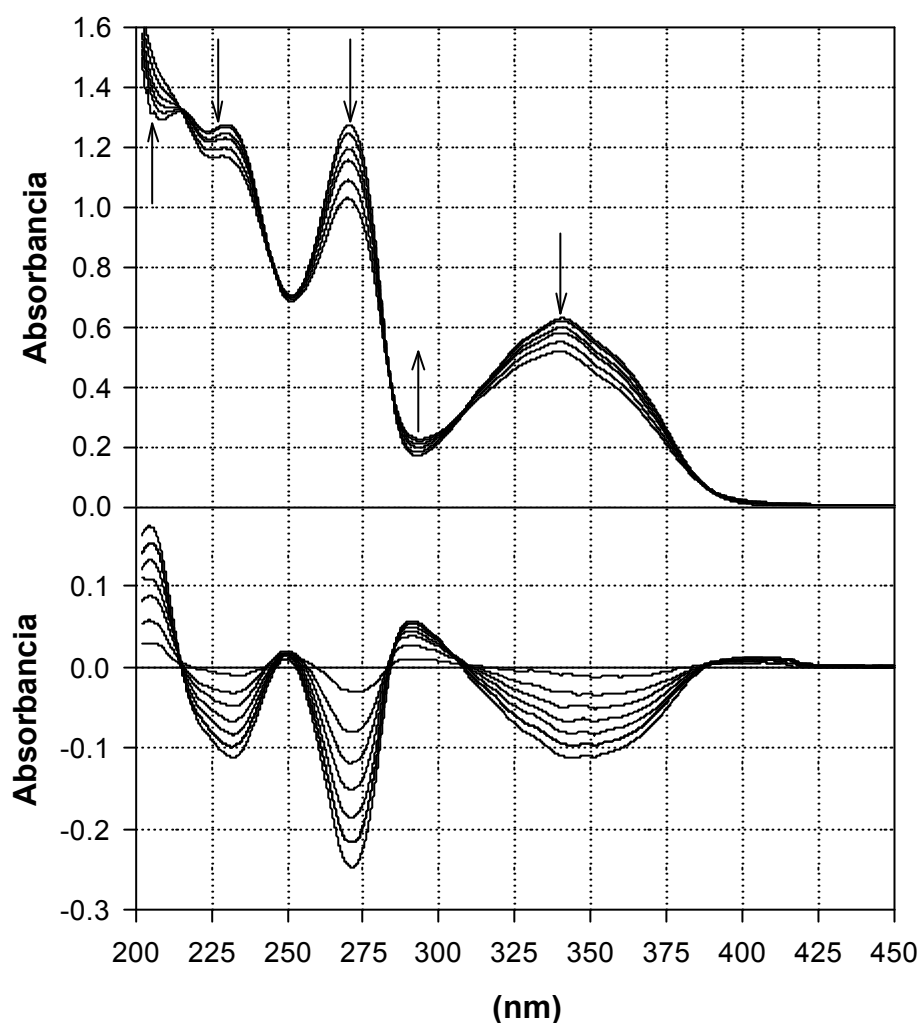


Figura 12.12. Evolución del espectro de absorción de una solución de pterina (100 M , $\text{pH}=5,6$) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 20 min durante 140 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación.

El análisis de estos resultados sugiere que la pterina sufre una reacción de fotooxidación lenta, en la cual el O_2 del medio participa generando productos que no poseen las características propiedades espectroscópicas de las pterinas, lo cual permite suponer que los mismos han sufrido profundas modificaciones en su estructura química.

12.4. Conclusiones.

Los resultados expuestos en este capítulo se encuentran resumidos en el esquema de la figura 12.13. La 6-carboxipterina se degrada fotoquímicamente a través de, al menos, dos vías. En una de ellas se transforma en pterina, siendo esta reacción independiente de la presencia de O_2 y con un rendimiento cuántico de aproximadamente 2×10^{-3} . La otra vía involucra una fotooxidación en la cual participa el O_2 disuelto en el medio y cuando éste es eliminado la reacción no ocurre. El rendimiento cuántico de este último proceso puede estimarse, suponiendo que existen sólo dos vías de reacción, a partir de la diferencia de los correspondientes al consumo de reactivo y formación de pterina. Este cálculo arroja un valor cercano a 3×10^{-3} . Estos rendimientos cuánticos son mucho menores que los medidos en las fotólisis de ácido fólico y 6-formilpterina (todos mayores a 10^{-2}). Este hecho explica la acumulación de 6-carboxipterina en dichas fotólisis y su relativa fotoestabilidad.

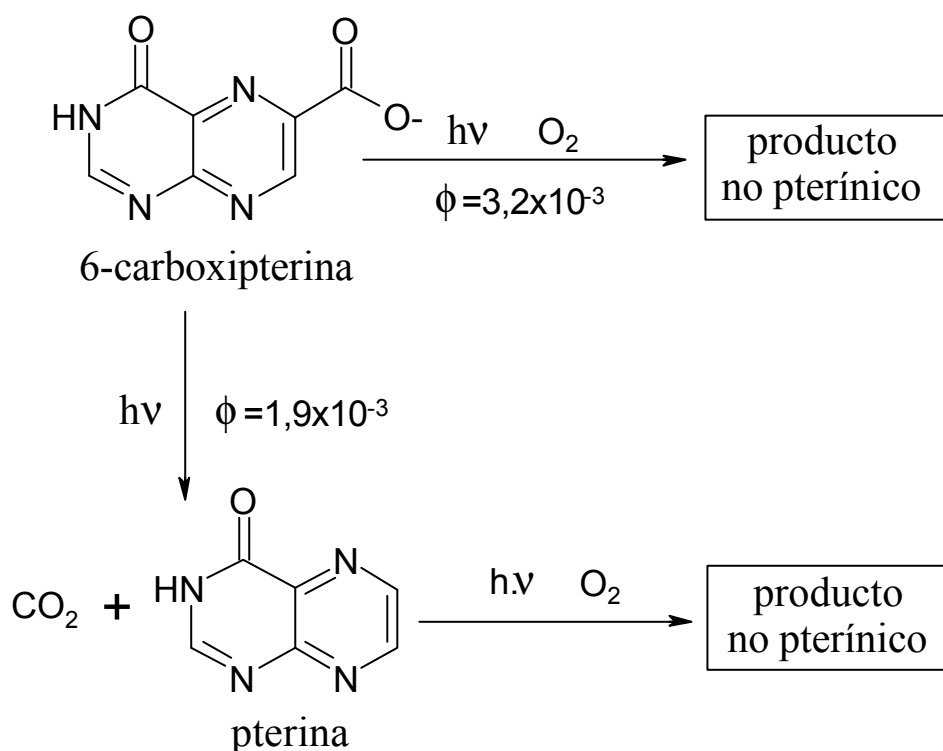


Figura 12.13. Fotólisis de 6-formilpterina y pterina.

Con respecto a la vía oxidativa, ésta rinde fotoproductos que no son derivados pterínicos. Por lo tanto, puede deducirse que esta reacción involucra un ataque del O_2 al doble anillo pterínico, lo cual no fue observado en ninguna de las reacciones estudiadas en los

capítulos anteriores.

Los experimentos realizados sobre soluciones de pterina muestran resultados parecidos a lo hallados para la vía fotooxidativa de la 6-carboxipterina. Es decir una fotodescomposición lenta en la cual los productos parecen ser compuestos que no presentan el doble anillo pterínico.

Puede generalizarse el comportamiento observado para la serie de compuestos analizados. En primer lugar, los derivados con sustituyentes en la posición 6 son susceptibles a sufrir fotooxidaciones en dicho sustituyente. Por otro lado el anillo pterínico, si bien también es oxidado fotoquímicamente, esto ocurre con rendimientos cuánticos mucho menores. Por lo tanto debe admitirse que estos últimos procesos podrían estar presentes en las fotólisis de ácido fólico y 6-formilpterina y no haber sido detectados debido a sus eficiencias bajas.

PARTE IV
FOTÓLISIS DE SOLUCIONES ALCALINAS

Capítulo 13.

Fotólisis de ácido fólico.

Este capítulo está dedicado al estudio de la fotólisis del ácido fólico en soluciones alcalinas. Los experimentos fueron diseñados de manera similar a los presentados en el capítulo 10 (irradiación de soluciones ácidas). Sin embargo, los resultados obtenidos para ambas condiciones de pH difieren bastante entre sí. Como se mostrará a continuación la irradiación de ácido fólico en medio básico provoca, al igual que en medio ácido, su transformación en 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Sin embargo, en estas condiciones, existe otra vía de descomposición fotoquímica cuantitativamente importante. Esta segunda reacción, de la cual no existen referencias en la literatura, provocó que el análisis de los resultados fuera mucho más complicado que para los experimentos realizados en medio ácido.

13.1. Fotólisis de ácido fólico en presencia de O₂.

Como puede observarse en la figura 13.1, el espectro de absorción de una solución alcalina de ácido fólico cambia significativamente al ser irradiada con luz UV-A. Puede observarse un punto isobéptico bien definido en 310 nm y otros dos cerca de los 230 nm. Estos puntos isobépticos, al igual que el espectro DEN, permanecen sin cambios significativos durante los primeros 60 minutos de irradiación; luego de lo cual se observan modificaciones indicando la aparición de nuevos procesos químicos. Es interesante remarcar que el período durante el cual prevalece la fotólisis primaria es mucho mayor en estas condiciones que en medio ácido (10 minutos).

El incremento en la absorbancia de las soluciones irradiadas indica la formación de alguna sustancia con una importante absorción en el visible; la 6-formilpterina no presenta esta característica espectroscópica. Más aún, la figura 13.2 muestra que el espectro DEN es muy diferente al espectro DTN obtenido planteando como únicos productos de reacción a la 6-formilpterina y al ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Este resultado no descarta la posibilidad de que dichas sustancias sean fotoproductos, pero sí descarta la posibilidad de que sean los únicos.

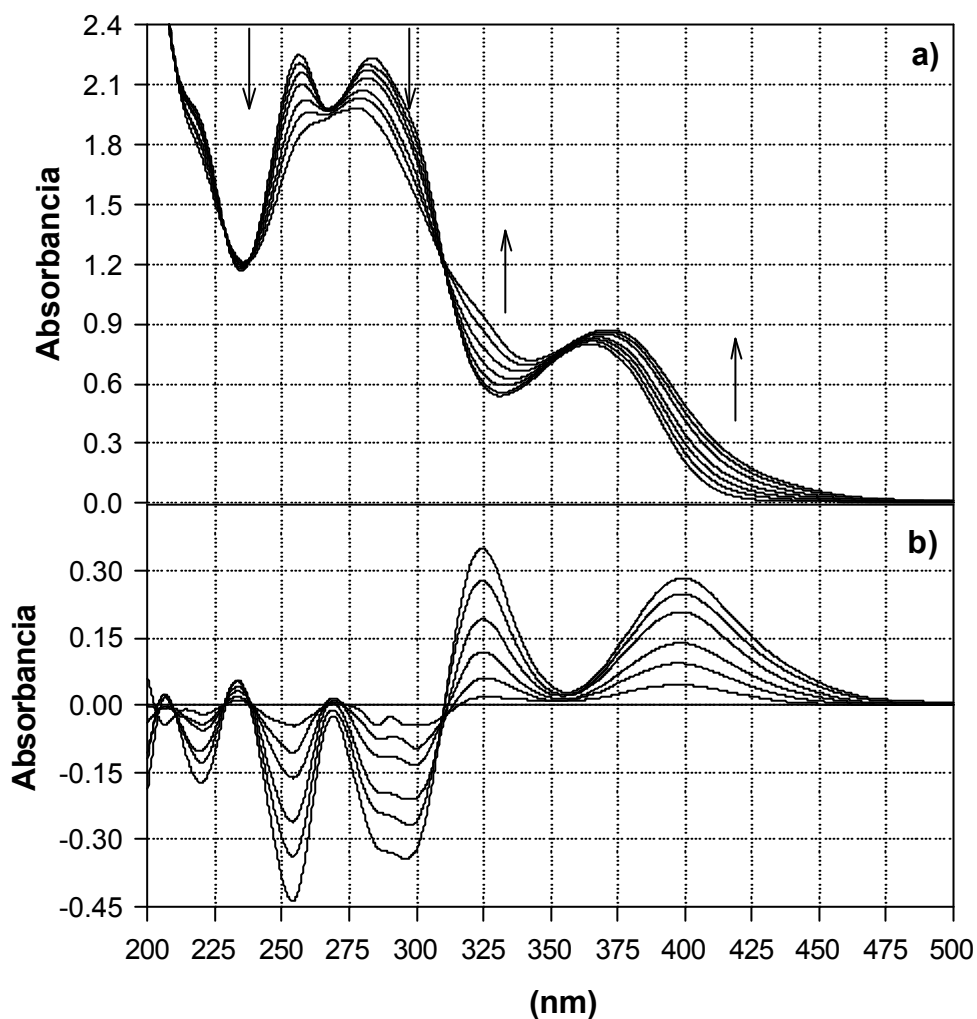


Figura 13.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 10) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 10 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes.

Las gráficas de absorbancia en función del tiempo de irradiación para distintas

longitudes de onda, mostradas en la figura 13.3, sugieren que se produce una aceleración del proceso a partir de los 20 minutos aproximadamente. La velocidad de este proceso disminuye cerca de los 60 minutos y luego de los 80 se nota claramente la presencia de otros procesos.

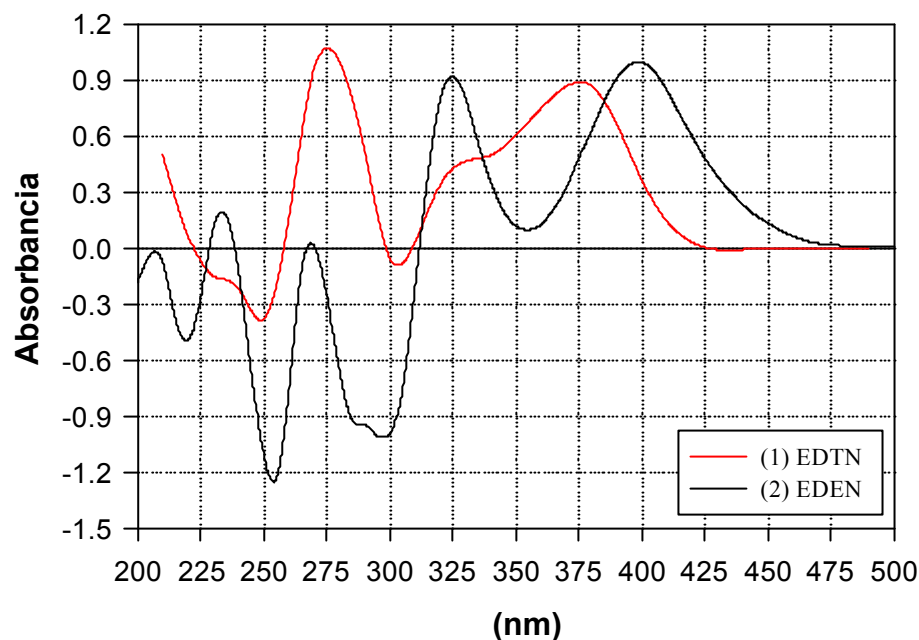


Figura 13.2. Comparación de espectros diferencia normalizados (1) Espectro DTN obtenido sumando los espectros de sendas soluciones conteniendo 6-formilpterina 100 M y ácido *p*-aminobenzoilglutámico 100 M y luego restando el de otra solución de ácido fólico de la misma concentración. (2) Espectro DEN obtenido a los 40 minutos de irradiación.

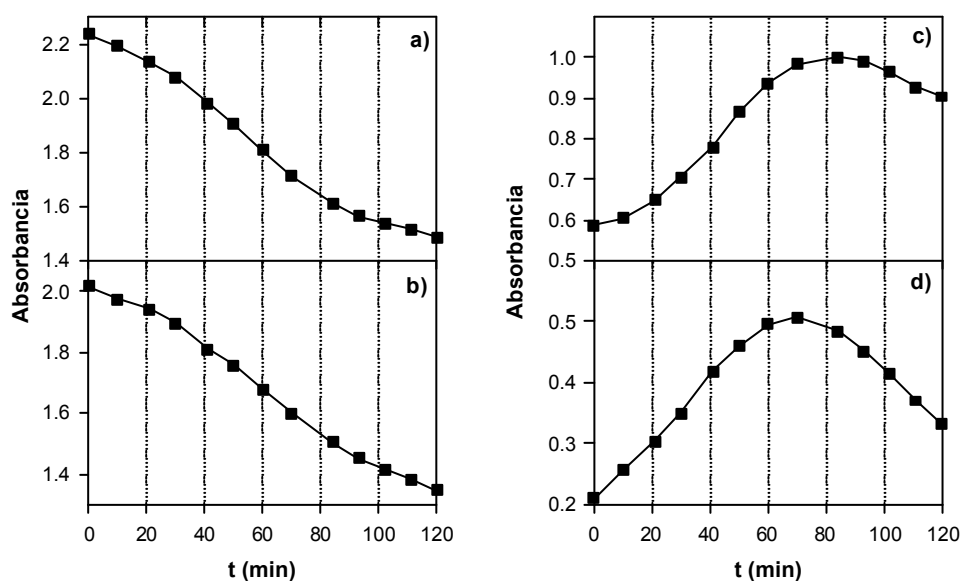


Figura 13.3. Absorbancia en función del tiempo de fotólisis. Concentración= 450 M , pH=11, camino óptico 0,2 cm. a) 255 nm. b) 295 nm. c) 325 nm. d) 400 nm.

En estos experimentos se observaron cambios espectrales que duraban varias horas luego de interrumpir la irradiación de la muestra. La evolución en la oscuridad del espectro de absorción de una solución irradiada de ácido fólico se muestra en la figura 13.4. Luego de varias horas los cambios espectrales cesan. Esto indica, obviamente, que alguno de los fotoproductos sufre una transformación térmica.

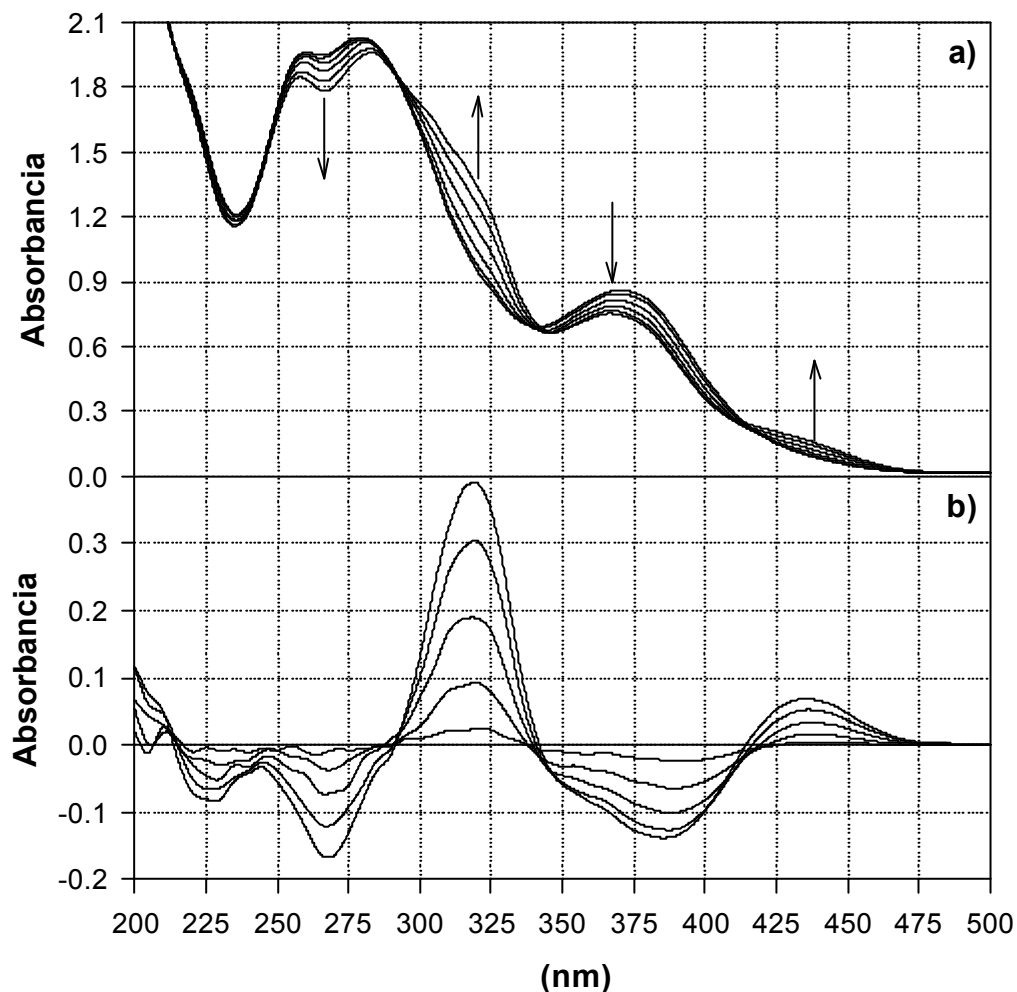


Figura 13.4. a) Evolución en la oscuridad del espectro de absorción de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 11) irradiada en presencia de O₂ durante 50 minutos. Los tiempos, a partir del instante en que se apagó la lámpara, a los cuales se tomaron los espectros son 0, 12, 30, 60, 105 y 150 min. Las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. b) Espectros DE correspondientes.

Experimentos realizados en distintas condiciones de pH mostraron una fuerte dependencia de la velocidad de este proceso térmico con el mismo. En efecto, al aumentar el pH de la solución irradiada se detectó un aumento en la velocidad de los cambios espectrales. En soluciones de pH 12 o mayor los cambios espectrales duran menos de un minuto o, apenas, unos pocos minutos. A partir de estas observaciones se decidió emprender el estudio cinético de este proceso. Sin embargo, los resultados de tal estudio no serán presentados en este capítulo, sino en el 15.

Los resultados de los experimentos de TLC realizados empleando NH_4Cl 0,3% (p/v) como solvente de corrida se muestran en la figura 13.5.a. Como se desprende de la observación de las calles 4 y 5, la 6-formilpterina y la 6-carboxipterina están presentes en las soluciones irradiadas de ácido fólico. Incluso, puede suponerse, un comportamiento similar al observado en las fotólisis realizadas en medio ácido, respecto a que el segundo de los compuestos mencionados se forma en una etapa posterior al primero, de lo cual puede inferirse que es un producto de fotólisis secundaria.

Por otro lado, se detectó la presencia de otros dos productos. Uno de ellos, al cual denominaremos arbitrariamente sustancia **B**, se presenta como una mancha de intensidad fluorescente moderada, queda prácticamente en el punto de siembra y se solapa con el ácido fólico, cuya mancha se observa oscura y con un R_f muy próximo a 0. El otro, al cual se hará referencia como sustancia **A**, se detecta como una mancha fluorescente muy intensa que se ubica entre la del ácido fólico y la de la 6-carboxipterina.

En la calle 6 se sembró la misma solución que en la calle 5, pero realizándole el siguiente tratamiento previo: a la solución fotolizada 60 minutos se le agregó una pequeña cantidad de solución de NaOH 0,5 M hasta llevarla a pH 12; luego se la dejó en la oscuridad unos 20 minutos y, por último, se la volvió a llevar a pH 10,5 mediante el agregado de una solución de HCl 0,5 M. Con este procedimiento se buscó acelerar el proceso térmico detectado en el análisis espectral. Puede observarse en la calle 6 que la denominada sustancia **A** desapareció luego del citado tratamiento, mientras que la mancha correspondiente a la sustancia **B** se intensificó. Estos resultados sugieren que el proceso térmico sería la transformación de la sustancia **A** en la **B**.

En busca de nueva evidencia se realizaron experimentos de TLC empleando otros solventes de corrida. Son interesantes los resultados mostrados en la figura 13.5.b, obtenidos con NH_4Cl 3,0 % (p/v). En estas condiciones el ácido fólico y la sustancia **B** se separan. La

sustancia **A**, por su parte, presenta una movilidad superior a todas las demás sustancias presentes en la solución irradiada. Finalmente, estas condiciones no son buenas para evaluar a la 6-formilpterina y a la 6-carboxipterina, las cuales presentan valores de Rf similares. En estos experimentos se observa una clara disminución de la concentración del ácido fólico, al punto de que en la calle 5 (60 minutos de fotólisis) no se detecta. En la calle 6, en la cual se sembró una solución de ácido fólico tratada de la misma manera que la de la calle 6 de la figura 13.5.a, puede observarse que, en efecto, la sustancia **A** ha desaparecido, a la vez que la mancha de la sustancia **B** se ha intensificado.

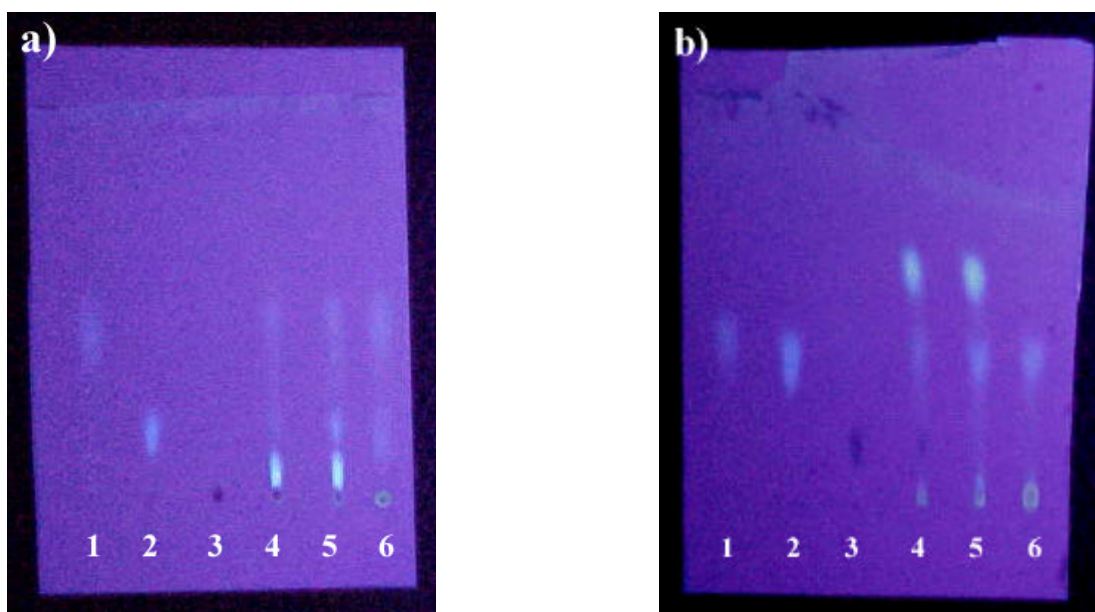


Figura 13.5. Corridas de TLC. a) Solvente de corrida NH_4Cl 0,3%(p/v); b) Solvente de corrida NH_4Cl 3,0%(P/V). Calles: 1, solución de 6-formilpterina 150 M; 2, solución de 6-carboxipterina 150 M; 3, solución de ácido fólico 450 M; 4, solución de ácido fólico 450 M (pH=10,5) irradiada durante 30 min con luz UV-A; 5, solución de ácido fólico 450 M (pH=10,5) irradiada durante 60 min con luz UV-A; 6, solución de ácido fólico 450 M (pH=10,5) irradiada durante 60 min con luz UV-A, que luego fue alcalinizada hasta pH 12, se dejó reposar durante 20 minutos en la oscuridad y finalmente se volvió a ajustar el pH en 10,5.

Puede concluirse que esta evidencia experimental sugiere que bajo estas condiciones de irradiación, el ácido fólico se fotoliza a través de dos vías distintas. Una es similar a la estudiada para la fotólisis en medio ácido, es decir, se oxida dando 6-formilpterina la cual a su vez se transforma posteriormente en 6-carboxipterina. La otra es una vía de reacción que sólo

existe en estas condiciones, en la cual el ácido fólico se transforma en un fotoproducto (sustancia **A**) que sufre una reacción térmica transformándose en otro (sustancia **B**). Este proceso térmico se acelera al alcalinizar el medio.

Para determinar la presencia de ácido *p*-aminobenzoilglutámico en las soluciones de ácido fólico irradiadas se procedió en forma similar a lo expuesto en el capítulo 10; es decir, empleando placas de celulosa con indicador fluorescente y NH_4Cl 3%(p/v) como fase móvil. Análogamente, se encontró en las soluciones sometidas a irradiación una sustancia que, al igual que el patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico corría con el frente del solvente.

Además se realizó un experimento en el cual se sembró en banda una solución de ácido fólico iluminada con luz UV-A y posteriormente concentrada por evaporación a baja presión. Se extrajo la sustancia que se sospechaba que correspondía al ácido *p*-aminobenzoilglutámico con solución de fase móvil (ver detalles experimentales en sección 7.4.2). Se tomó el espectro de la solución resultante, el cual revela la presencia de una cantidad relativamente importante de material disperso. No obstante, este espectro se normalizó y se comparó con el de una solución patrón. Estos resultados se muestran en la figura 13.6. La coincidencia de los máximos de absorción de ambos espectros es una fuerte evidencia a favor de la hipótesis analizada. El ensanchamiento que se observa en la banda de la solución extraída de la placa puede adjudicarse a la dispersión de la luz proveniente del material sólido.

Se realizaron muchos ensayos de HPLC, variando las condiciones de corrida, sobre las soluciones irradiadas de ácido fólico. Fue detectada la presencia de seis sustancias distintas en las mismas; estando este número de acuerdo con los resultados del análisis por TLC. No pudo encontrarse ninguna condición de corrida en la cual pudieran resolverse las seis sustancias en un mismo cromatograma. Por esta razón se realizaron análisis parciales en distintos grupos de experimentos.

Para evaluar la evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina se procedió en forma similar a la expuesta en el capítulo 10 (sistema de corrida III, ver capítulo 7). El detector se ajustó en 340 nm con lo cual el ácido *p*-aminobenzoilglutámico no se detecta. Por otro lado, las fotólisis fueron realizadas sobre soluciones de pH= 11,5 y, luego de cada irradiación, se dejó la correspondiente solución unos minutos en la oscuridad. En estas condiciones la reacción térmica subsiguiente a la fotólisis se completa antes de la inyección en el cromatógrafo, eliminándose, por ende, la sustancia **A**.

Como puede observarse en la figura 13.7, en estas condiciones se observan cuatro picos en los cromatogramas de las soluciones irradiadas de ácido fólico. Los tres primeros coinciden en forma y t_R a 6-carboxipterina, 6-formilpterina y ácido fólico. Además, aparece un cuarto pico, con un tiempo de retención mucho mayor que corresponde a la sustancia **B**.

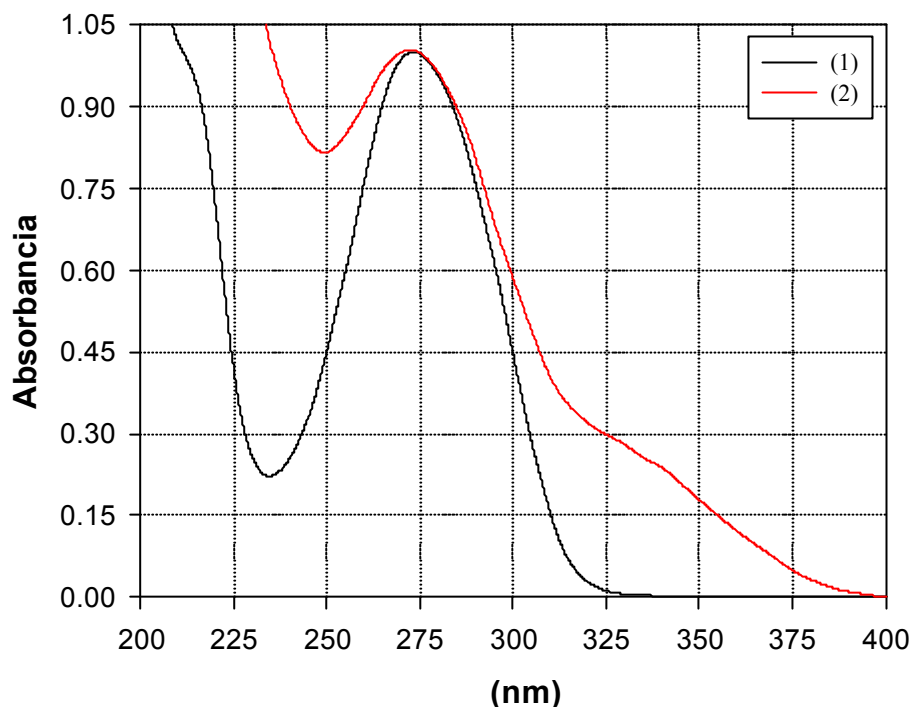


Figura 13.6. Espectros normalizados. (1) Solución patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. (2) Sustancia extraída de la capa delgada.

A partir de la integración de los picos de los cromatogramas obtenidos para distintos tiempos de irradiación y las correspondientes curvas de calibración se construyeron los perfiles de concentración para ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. Como muestra la figura 13.8, para los dos primeros compuestos se observa un comportamiento lineal durante los 20 primeros minutos de fotólisis. De las pendientes obtenidas a partir de las correspondientes regresiones lineales se obtuvieron las velocidades de consumo de ácido fólico ($2,21 \pm 0,09 \mu\text{M}/\text{min}$) y de producción de 6-formilpterina ($1,25 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$). Asumiendo que la totalidad de la luz incidente es absorbida por el ácido fólico, se calcularon los rendimientos cuánticos, obteniéndose valores de $5,1 \times 10^{-3}$ y $2,9 \times 10^{-3}$, respectivamente. En este período no se observa un incremento significativo de la concentración de 6-carboxipterina. Pueden realizarse varias consideraciones a partir de estos resultados. En

primer lugar, el ácido fólico es notablemente menos fotosensible en soluciones alcalinas que en soluciones ácidas. En segundo lugar, la velocidad de formación de 6-formilpterina es mucho menor que la de desaparición de reactivo, lo cual puede atribuirse a la otra vía de descomposición fotoquímica que rinde como producto final a la sustancia **B**.

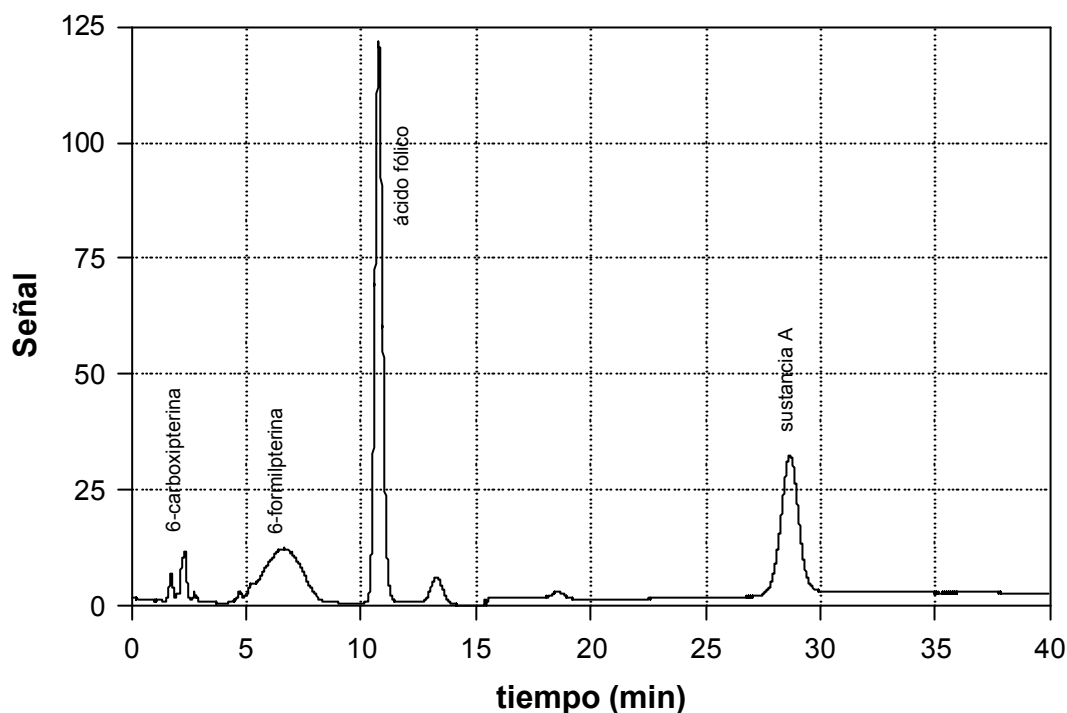


Figura 13.7. Cromatograma de una solución de ácido fólico (600 μ M, pH=11,5) irradiada durante 60 minutos con luz UV-A de 350 nm. de análisis 340 nm.

Puede apreciarse en la figura 13.8 que luego de los 20 minutos de irradiación la reacción parece acelerarse. Para averiguar si el efecto de aceleración observado en las fotólisis llevadas a cabo en medio ácido está presente también en estas condiciones, se analizaron los perfiles de concentración en fotólisis más largas. La figura 13.9 muestra los resultados de uno de estos experimentos. La velocidad inicial de consumo de ácido fólico coincide con la medida en el experimento de la figura 13.8 (línea); sin embargo, luego de unos 20 minutos de irradiación se observa un significativo aumento de tal velocidad. Un análisis similar puede efectuarse para la formación de 6-formilpterina. Por otro lado, cabe mencionar que se detecta un aumento en la concentración de 6-carboxipterina luego de los 20 minutos de irradiación, evidenciando que el inicio de la aceleración de la reacción de transformación de ácido fólico a 6-formilpterina coincide temporalmente con el inicio de la absorción de luz en forma

apreciable por parte de este último compuesto. Este análisis sugiere que, en efecto, en estas condiciones existe un mecanismo de reacción similar al observado en medio ácido.

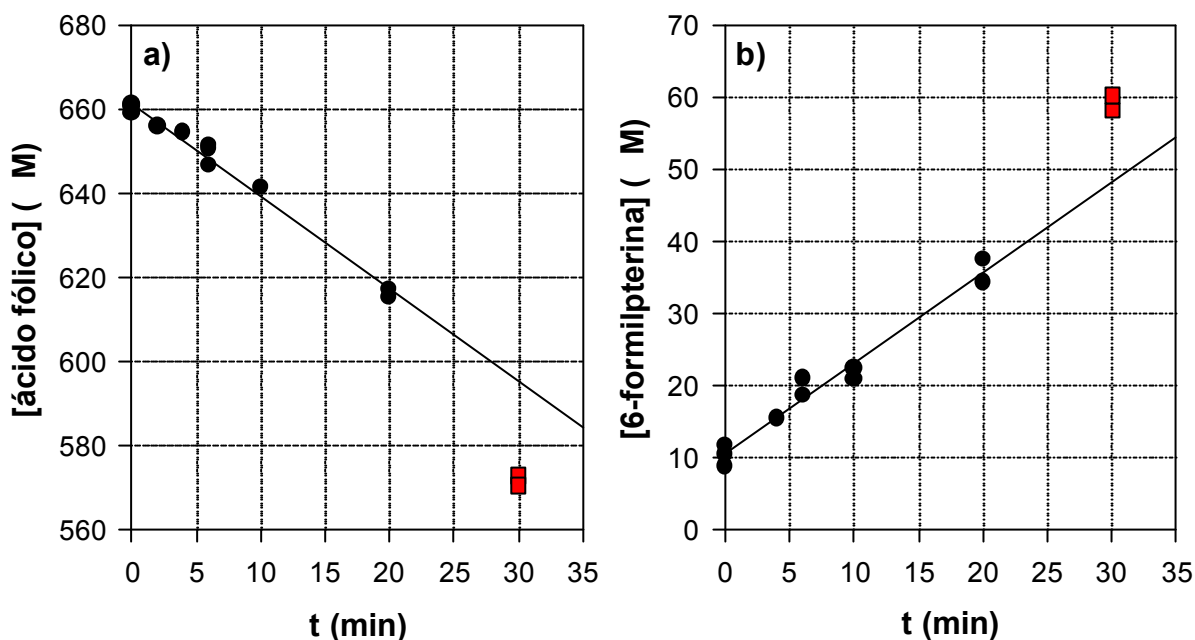


Figura 13.8. Evolución de las concentraciones de ácido fólico (a) y 6-formilpterina (b), determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de ácido fólico 650 M y pH= 11,5.

Otro resultado importante del experimento de la figura 13.9 es que la suma de las concentraciones de las tres sustancias analizadas no permanece constante, sino que, por el contrario, disminuye significativamente. Esta es otra evidencia a favor de la hipótesis de que el ácido fólico se descompone fotoquímicamente a través de dos vías diferentes. Además merece destacarse que la suma de las concentraciones también aumenta su velocidad de disminución luego de los 20 minutos, sugiriendo que la otra vía, la que da como productos a las sustancias **A** y **B**, también se acelera.

En la figura 13.10 se muestra el experimento de la figura 13.9 completo. Puede observarse que la velocidad de consumo del ácido fólico disminuye luego de los 70 minutos de irradiación. Por otro lado, si bien la concentración de 6-formilpterina no alcanza un máximo, se observa una disminución en la velocidad de su producción llegando prácticamente a una meseta a los 100 minutos.

La figura 13.11 muestra la variación del área del pico de la sustancia **B** con el tiempo de irradiación. Puede observarse un aumento en la velocidad de formación luego de los primeros 20 minutos. Si bien en este caso, este efecto no es tan marcado como para la

6-formilpterina, estaría indicando un comportamiento similar al de la misma.

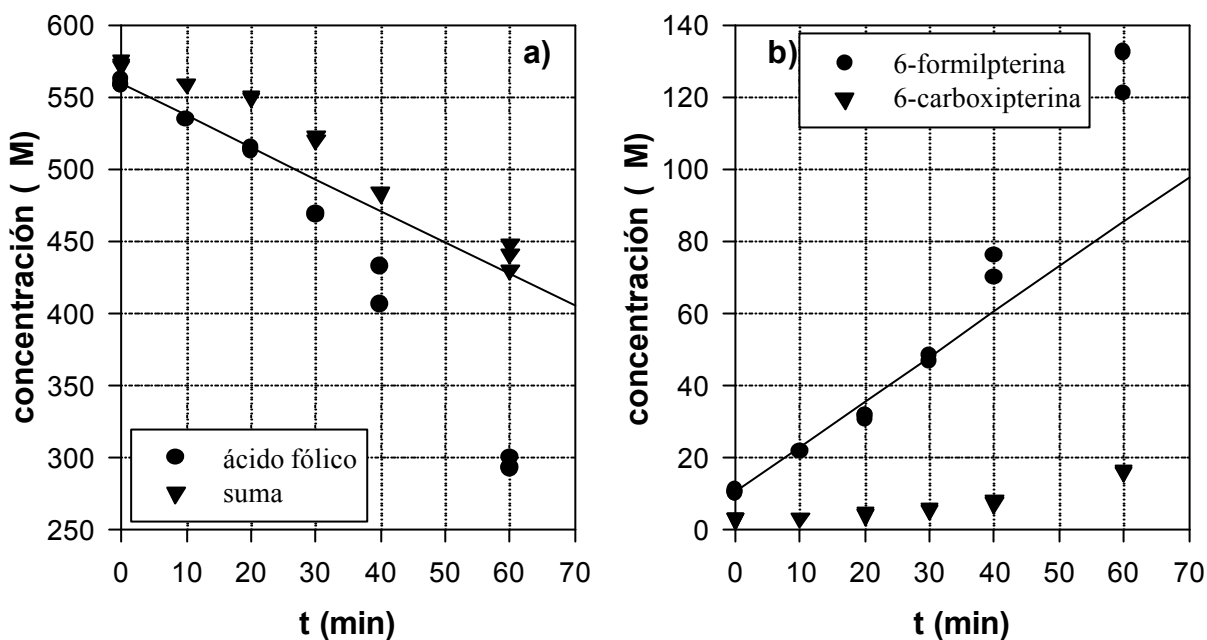


Figura 13.9. a) Evolución con el tiempo de irradiación de la concentración de ácido fólico y de la suma de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 13.8.a. b) Evolución con el tiempo de irradiación de las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 13.8.b.

Se analizó la presencia de ácido *p*-aminobenzoilglutámico en forma análoga a lo realizado en las fotólisis en medio ácido, es decir empleando el sistema I de corrida (ver capítulo 7). En los cromatogramas de soluciones alcalinas de ácido fólico irradiadas se pudo observar un pico que coincidió en t_R con el del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Además, tal como puede apreciarse en la figura 13.12, este pico se observa claramente empleando luz de análisis de 280 nm, pero no se detecta a 340 nm, lo cual concuerda con el hecho de que esta sustancia no absorbe luz a esta longitud de onda.

Por otro lado, la solución obtenida con la técnica TLC preparativa mencionada anteriormente, es decir, la solución resultante de extraer la sustancia que corre con el frente del solvente, fue analizada por HPLC, empleando también el sistema I de corrida. El correspondiente cromatograma presenta un solo pico con un t_R que coincide con el del patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Finalmente, se obtuvo, con el sistema de detección del equipo de HPLC, el espectro de absorción de la sustancia responsable de este pico. En la

figura 13.13 se muestra este espectro normalizado junto con el correspondiente al del segundo pico del cromatograma de una solución de ácido fólico fotolizada. Además puede observarse el espectro normalizado de una solución patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, obtenido con el espectrofotómetro Cary3. Los tres espectros son muy similares, de lo cual puede desprenderse que, tanto la sustancia extraída en los experimentos de TLC como la sustancia responsable del segundo pico en los cromatogramas de las soluciones irradiadas de ácido fólico son, en efecto, ácido *p*-aminobenzoilglutámico.

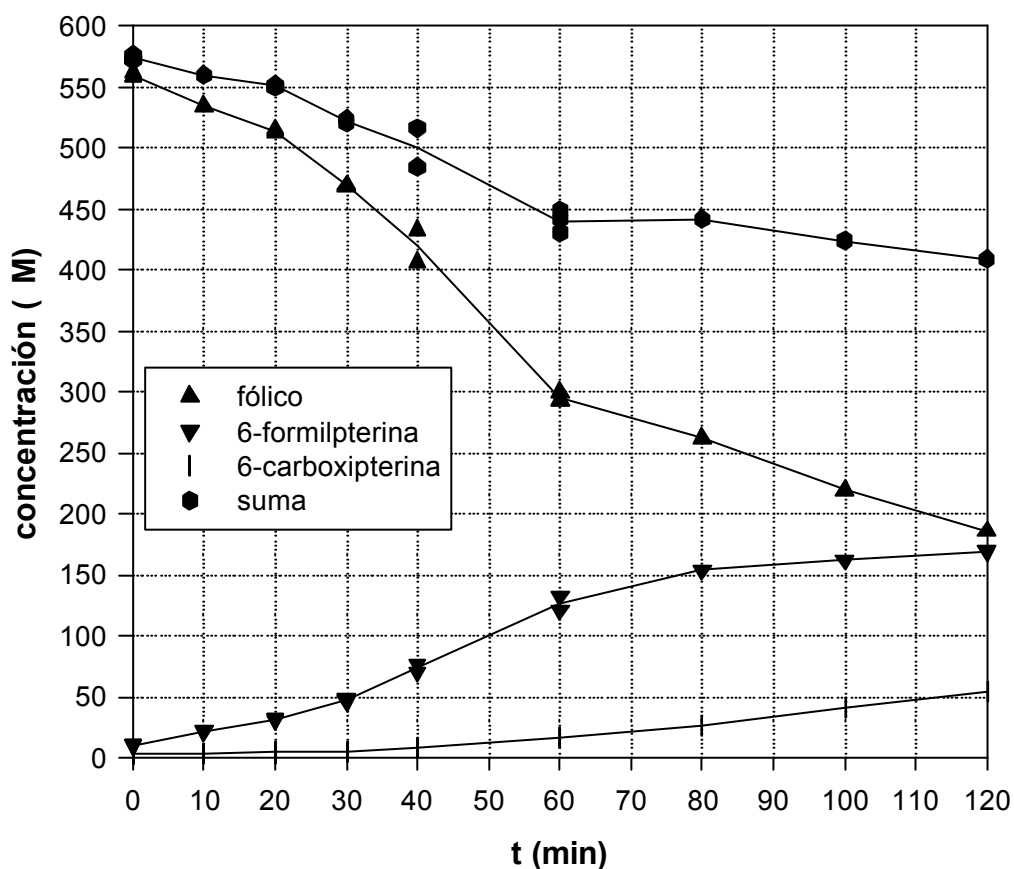


Figura 13.10. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC, durante 2 horas de fotólisis de una solución de ácido fólico 560 M y pH= 11,5.

En otro experimento se irradió una solución de ácido fólico y se obtuvieron los cromatogramas a distintos tiempos de irradiación empleando las mismas condiciones de corrida que las de la figura 13.12. La figura 13.14 muestra la evolución del área del pico correspondiente al ácido *p*-aminobenzoilglutámico con el tiempo de fotólisis. Puede observarse un aumento lineal en la concentración de este compuesto en los primeros 20

minutos, luego la velocidad de aparición aumenta y finalmente la concentración parece estabilizarse luego de los 60 minutos de irradiación. Este comportamiento es el esperado teniendo en cuenta el perfil de concentración de la 6-formilpterina analizado anteriormente. Sin embargo, estos resultados no pueden compararse cuantitativamente con los mostrados en las figuras 13.8, 13.9 y 13.10 debido a que este experimento fue realizado en otras condiciones experimentales (geometría y concentración inicial de reactivo). Por tal motivo, no se muestra la correspondiente curva de concentración en función del tiempo de fotólisis.

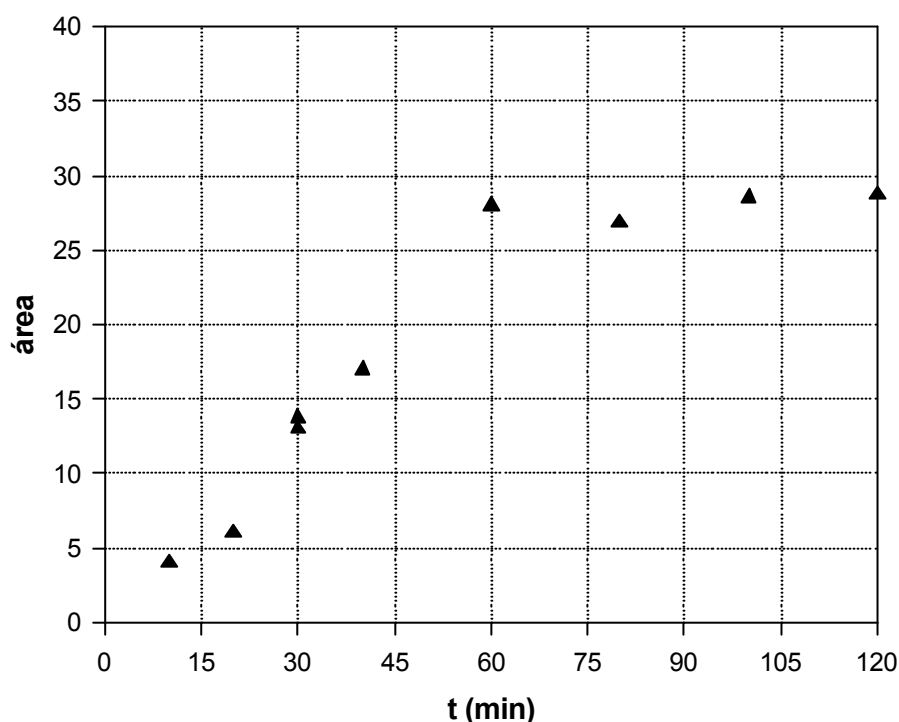


Figura 13.11. Evolución del área del pico correspondiente a la sustancia B con el tiempo de irradiación.

Los resultados expuestos hasta ahora indican que, ni la 6-carboxipterina, ni el ácido *p*-aminobenzoilglutámico participan en la reacción térmica que se detectó en las soluciones de ácido fólico irradiadas en medio alcalino. Con el fin de afianzar esta hipótesis, se realizaron experimentos de control del tipo del que se detalla a continuación. Se irradió una solución de ácido fólico (pH=11, 450 μ M) durante 45 min, luego de lo cual se apagó la lámpara y se inyectó inmediatamente en el equipo una muestra de la solución. El resto de la misma se mantuvo en la oscuridad y, a distintos tiempos, se tomaron sucesivas muestras y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas. Ninguno de las dos sustancias analizadas mostró

variaciones significativas en el área de sus respectivos picos en más de 2 horas de monitoreo. Como se mostrará más adelante, al valor de pH al cual se realizó este experimento, la vida media de la reacción térmica es de aproximadamente 10 minutos, por lo cual si alguna de las dos sustancias analizadas estuviera involucrada en dicha reacción, se deberían observar cambios en el área de los correspondientes picos cromatográficos.

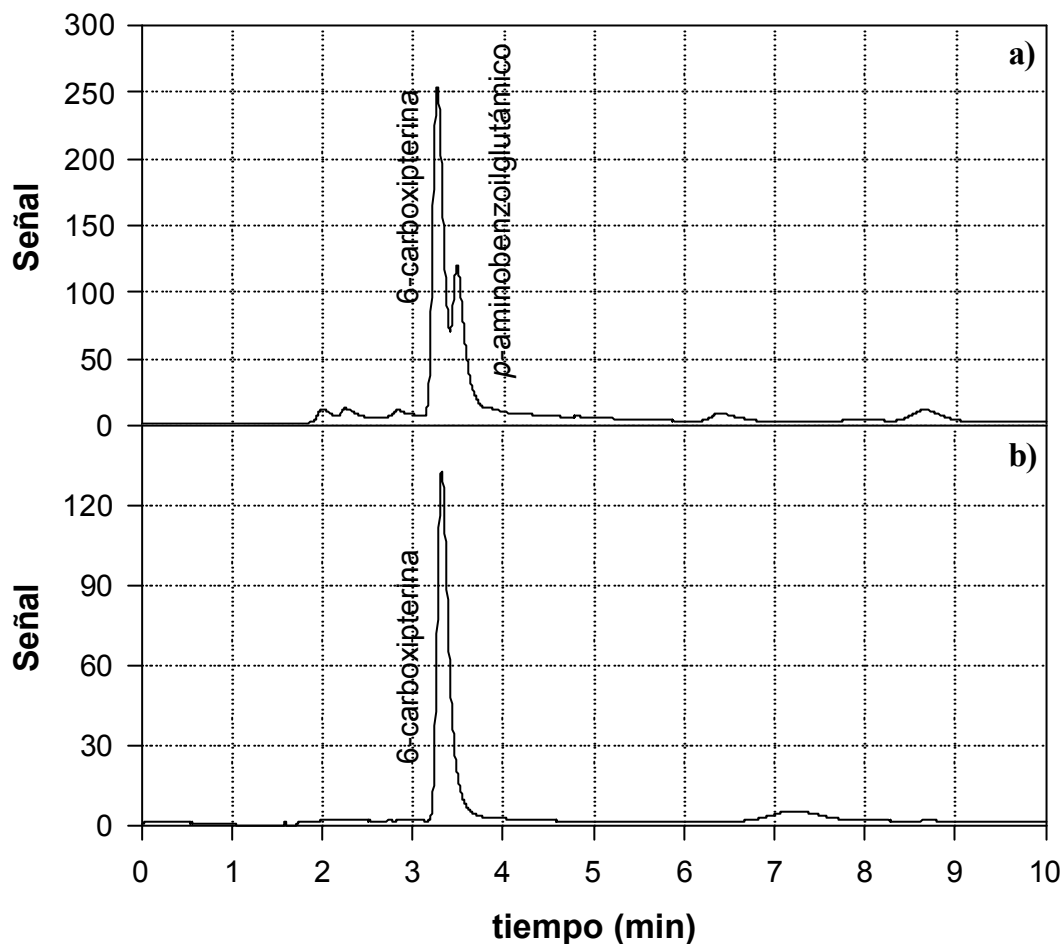


Figura 13.12. Cromatogramas obtenidos al inyectar en el equipo de HPLC una solución de ácido fólico (450 μ M, pH= 11,0) irradiada durante 100 min. a) de análisis= 280 nm. b) de análisis 340 nm.

Como ya fue mencionado anteriormente, el proceso térmico se acelera al aumentar el pH. Teniendo en cuenta esto, se llevó a cabo otro control en el mismo sentido. Se fotolizó durante 50 minutos una solución de ácido fólico (450 μ M, pH=11,0). Inmediatamente después de interrumpir la irradiación se separó una alícuota de la muestra irradiada a la cual se le agregó un volumen de solución de NaOH 0,5 M, adecuado como para producir un incremento de pH de por lo menos una unidad. Por último, se compararon las áreas de los picos en sendos

cromatogramas obtenidos a partir de la muestra con y sin el agregado del álcali. Tanto para la 6-carboxipterina como para el ácido *p*-aminobenzoilglutámico no se detectaron variaciones en las áreas de sus picos, corroborando que no participan en la reacción térmica.

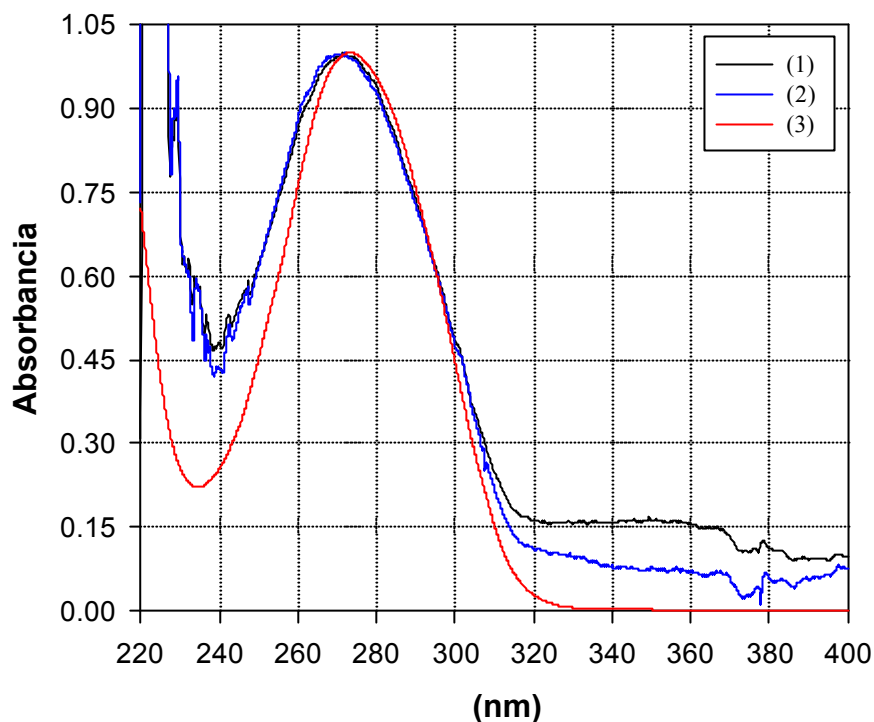


Figura 13.13. Espectros normalizados. (1) Sustancia responsable del segundo pico observado en los cromatogramas de soluciones irradiadas de ácido fólico, el espectro fue obtenido con el sistema de detección del equipo de HPLC. (2) Sustancia separada en los experimentos de TLC, el espectro fue obtenido con el sistema de detección del equipo de HPLC. (3) Solución patrón de ácido *p*-aminobenzoilglutámico, el espectro fue obtenido con el espectrofotómetro Cary3.

En las condiciones de corrida en las cuales se obtuvieron los resultados que sirvieron para analizar el comportamiento de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina (sistema de corrida III) se detecta la presencia de un pico que aparece superpuesto al de la 6-formilpterina. Este pico desaparece si se deja la solución irradiada suficiente tiempo en la oscuridad o si se la alcaliniza. Este comportamiento sugiere que este compuesto es la denominada sustancia A.

Ante estos resultados se buscaron condiciones que permitieran separar este pico de los demás. Ensayando el sistema de corrida IV sobre soluciones irradiadas de ácido fólico, efectivamente este pico ($t_R=3,15$ minutos) aparece separado del de la 6-formilpterina; sin embargo, este último se solapa completamente con el del ácido fólico. Además, existe un pico

que coincide en t_R (2,3 minutos) con el de una solución patrón de 6-carboxipterina. Por último, con un t_R de aproximadamente 8,8 minutos existe otro pico que, como se verá más adelante, puede asignarse a la sustancia **B**. La figura 13.15 muestra un cromatograma típico realizado bajo estas condiciones de corrida.

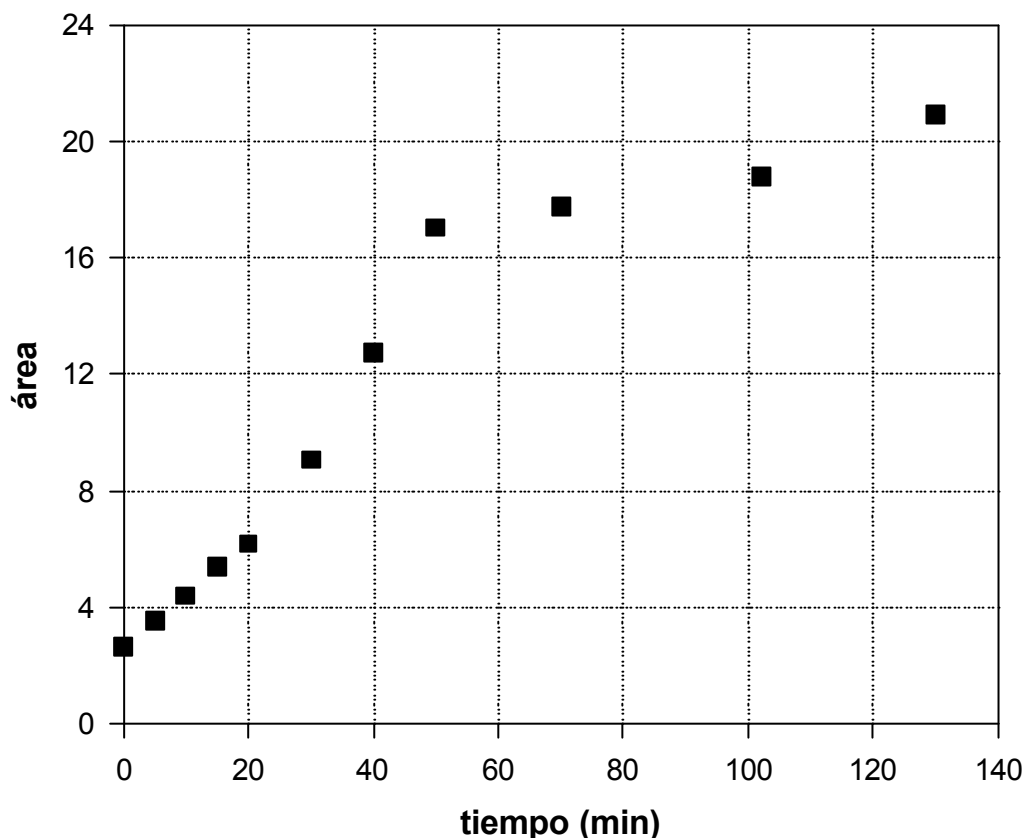


Figura 13.14. Evolución del área del pico del ácido *p*-aminobenzoilglutámico con el tiempo de irradiación.

Se realizó una serie de experimentos para evaluar el comportamiento de estos dos picos que no pudieron identificarse con las soluciones patrones y que se sospechaba pertenecían a las sustancias **B** y **A**. En la figura 13.16 se muestra la variación de las áreas de estos picos, durante la fotólisis de una solución de ácido fólico (450 μM , $\text{pH}=11$). Nótese que el comportamiento de ambas sustancias es diferente. El área del pico de $t_R=3,15$ min (sustancia **A**) crece mucho en los primeros 30 minutos de fotólisis, alcanza un máximo y luego podría tender a disminuir. El área del pico de $t_R=8,7$ min (sustancia **B**) crece poco en los primeros 20 minutos, resultando más importante su aumento luego de este período de tiempo.

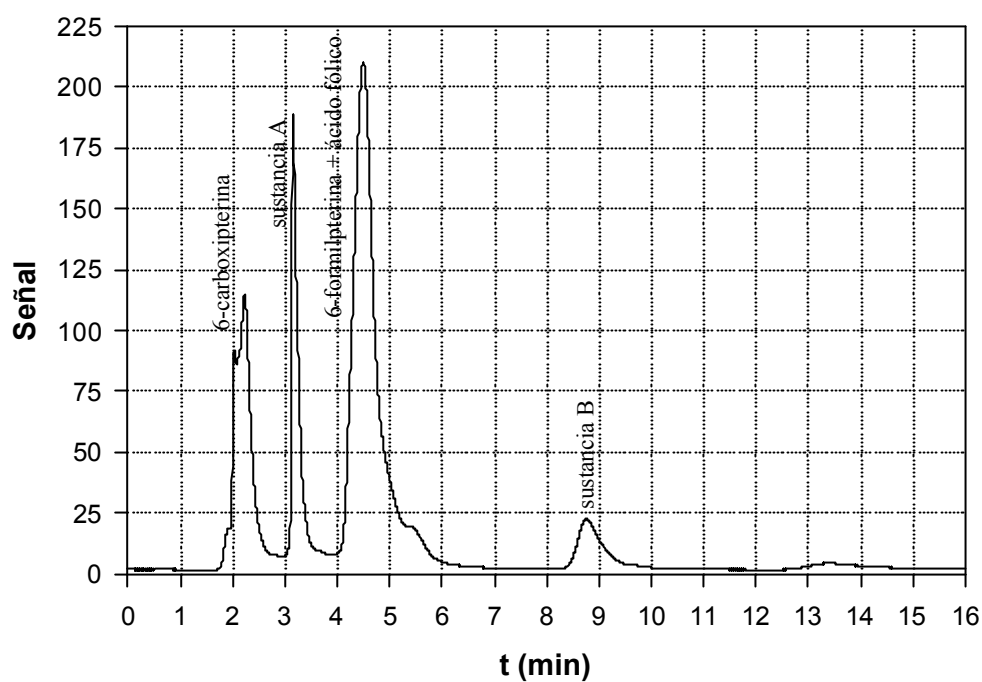


Figura 13.15. Cromatograma de una solución de ácido fólico (450 M, pH=11) irradiada durante 60 min. Sistema de corrida IV, de análisis 340 nm.

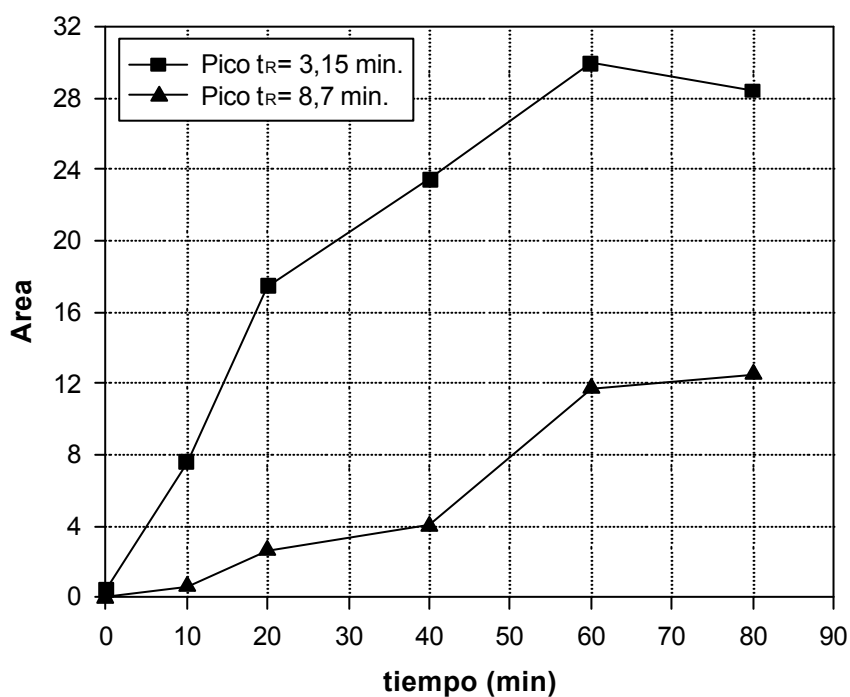


Figura 13.16. Variación del área de los picos de t_R 3,15 (sustancia A) y 8,7 min (sustancia B).

Para corroborar que las sustancias responsables de estos dos picos participan en la

reacción térmica, se realizó otro experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 50 min. Una vez interrumpida la iluminación, la solución se dejó en la oscuridad. Posteriormente, se obtuvieron los correspondientes cromatogramas y se realizaron gráficas de área en función del tiempo, contado a partir de la interrupción de la irradiación de la solución. Estos resultados se muestran en la figura 13.17. Puede observarse claramente que mientras el área del pico de $t_R=3,15$ min disminuye con el tiempo, el pico de $t_R=8,7$ aumenta su área. Estos resultados sugieren fuertemente que la sustancia resuelta en el primer pico se trata de la sustancia **A**, mientras que el segundo se trata de la sustancia **B**. Se observa también que el área correspondiente al pico que incluye al ácido fólico y a la 6-formilpterina permanece constante durante el período abarcado por este estudio. Este hecho es una evidencia más a favor de la hipótesis de que estos dos últimos compuestos no participan en ningún proceso térmico luego de la irradiación.

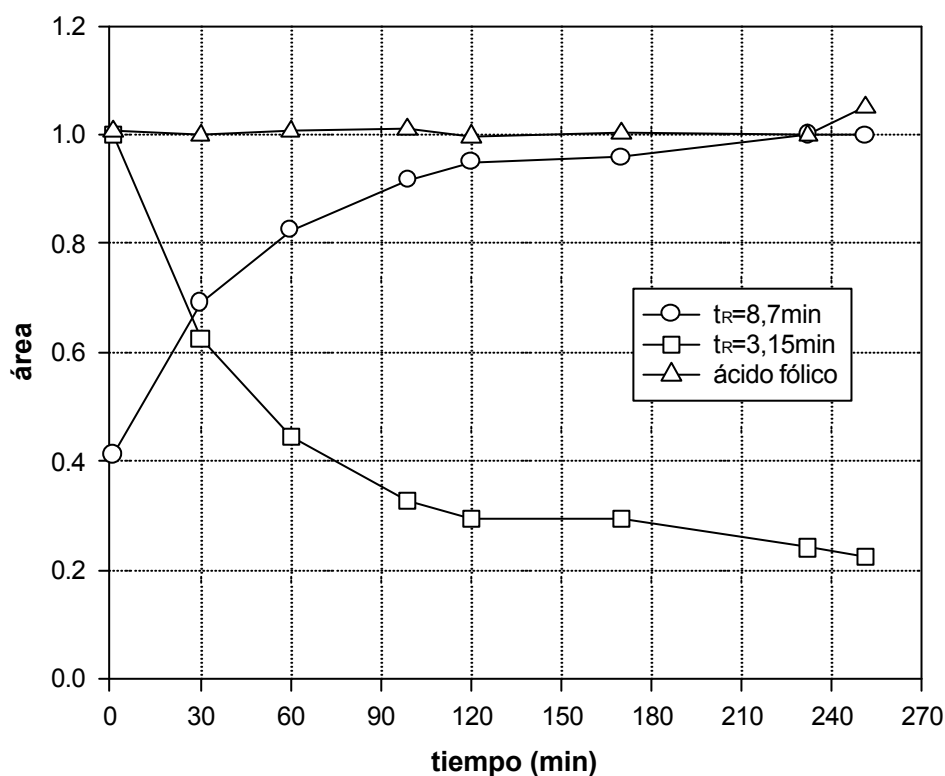


Figura 13.17. Variación de los tres picos resueltos en las condiciones de corrida mencionadas en el texto. Para facilitar la comparación de los resultados las áreas están normalizadas. Sistema de corrida IV, de análisis 340 nm.

Los resultados de los experimentos de HPLC mostrados hasta aquí han permitido evaluar la evolución de la concentración de las distintas sustancias involucradas en los

procesos estudiados, tanto durante la irradiación como en el proceso térmico subsecuente a la misma. Ahora se analizarán los resultados de un experimento realizado para corroborar que el fenómeno de aumento de la velocidad de descomposición del ácido fólico requiere la absorción de luz por parte de la 6-formilpterina. Este experimento es análogo al mostrado en el capítulo 10 (figura 10.14), en el cual se partió de una mezcla de ambas sustancias. En este caso, se irradió una solución que contenía 65 μM de ácido fólico y 150 μM de 6-formilpterina. La evolución de la concentración de las sustancias analizadas se muestra en la figura 13.18. Puede observarse que se produce una notable disminución en la concentración de ácido fólico en los primeros 10 minutos de fotólisis. La concentración de 6-formilpterina no muestra, como lo hacía en el experimento de la figura 10.14, un aumento inicial. Esto puede deberse a que en este experimento la relación de concentraciones iniciales ha cambiado; por lo cual, la cantidad de 6-formilpterina que se forma en los primeros minutos de fotólisis proveniente del ácido fólico es menor que la cantidad que se consume.

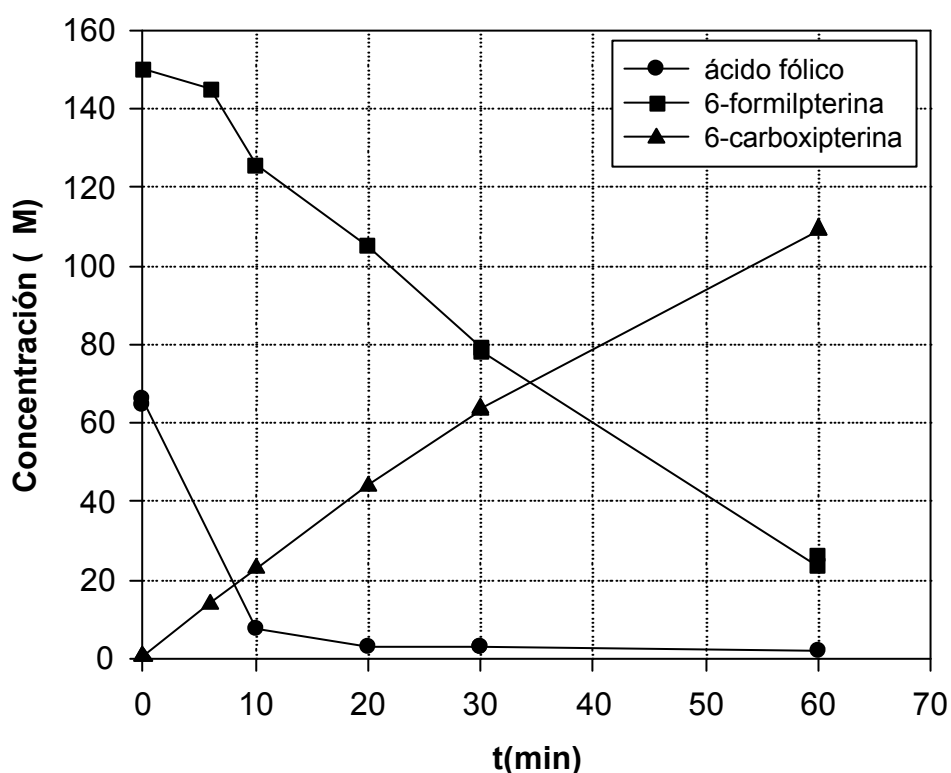


Figura 13.18. Evolución de las concentraciones de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina, determinadas por HPLC. Experimento realizado partiendo de una solución mezcla (pH= 11,0) que contenía 65 μM de ácido fólico y 150 μM de 6-formilpterina.

Se calculó la cantidad de luz incidente que absorbe cada compuesto inicialmente

teniendo en cuenta los respectivos coeficientes de extinción molar a 350 nm, las concentraciones y la cantidad total de luz incidente (para un mayor detalle de este análisis véase sección 10.3).

Considerando despreciable la luz absorbida inicialmente por la 6-carboxipterina, se pueden plantear las siguientes relaciones.

$$A^{AF} = \epsilon_{350}^{AF} \cdot l \cdot [AF] = 6.757 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 6,50 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} = 0,439$$

$$A^{FPT} = \epsilon_{350}^{FPT} \cdot l \cdot [FPT] = 9.779 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 1,50 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} = 1,47$$

La absorbancia total de la solución (A^T) será:

$$A^T = A^{AF} + A^{FPT} = 0.439 + 1,47 = 1,91$$

Con este dato y conociendo la intensidad de luz incidente (I_0) puede calcularse la intensidad de luz absorbida total mediante la siguiente relación.

$$I_a = I_0^v \cdot (1 - 10^{-A^T}) = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min} \cdot (1 - 10^{-1,906}) = 4,3 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

Con este valor, que es prácticamente igual a I_0^v , se pueden calcular la intensidad de luz inicial absorbida por el ácido fólico y por la 6-formilpterina (I_a^{AF} y I_a^{FPT} , respectivamente), es decir en el momento de iniciar la irradiación, a partir de las ecuaciones (1) y (2) planteadas en la sección 10.3.

$$I_a^{AF} = 9,8 \times 10^{-5} \text{ M/min} \quad I_a^{FPT} = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M/min}$$

En este experimento, entonces, el ácido fólico absorbe sólo un 23% de la luz incidente; la 6-formilpterina, por su parte, absorbe un 77%. De esta manera, se parte de una situación en la cual ambas sustancias son excitadas por la irradiación, pero el ácido fólico recibe sólo una pequeña proporción de la misma. Puede calcularse la velocidad inicial de conversión de ácido fólico a 6-formilpterina ($v_0^{AF \rightarrow FPT}$) esperada en estas condiciones, teniendo en cuenta el valor de I_a^{AF} y el correspondiente rendimiento cuántico (Φ_{AF}), calculado anteriormente.

$$v_0^{AF \rightarrow FPT} = \Phi_{AF} \cdot I_a^{AF} = 5,14 \times 10^{-3} \cdot 9,8 \times 10^{-5} \text{ M/min} = 0,50 \text{ } \mu\text{M/min.}$$

Es necesario aclarar que si el mecanismo de estas reacciones involucra al $^1\text{O}_2$ como intermediario, tal como será demostrado en la sección siguiente, Φ_{AF} será dependiente de la concentración del ácido fólico y, por ende, la velocidad inicial que le correspondería sería aún menor a este valor calculado.

Sin embargo, se midió una velocidad global en los 10 primeros minutos de fotólisis para el consumo de ácido fólico de 5,89 $\mu\text{M/min}$. Puede apreciarse que este valor es un orden de magnitud mayor que el esperado. Estos resultados muestran que la velocidad de

fotodescomposición del ácido fólico se ve sensiblemente aumentada en presencia de 6-formilpterina.

Para finalizar esta sección, se comentarán los resultados de los experimentos en los cuales se realizó la reacción colorimétrica de la 2,4-dinitrofenilhidrazina sobre soluciones irradiadas durante distintos períodos de tiempo. Como se explicó anteriormente este ensayo permite monitorear la formación de derivados aldehídicos (sección 7.6.1). En la figura 13.19 se aprecian los resultados de uno de estos experimentos. Si bien esta fotólisis no está realizada en las mismas condiciones que las llevadas a cabo para los análisis por HPLC, puede observarse en ella el mismo comportamiento global que ya ha sido analizado. Es decir, un período inicial de unos 20 minutos en el cual se produce un aumento prácticamente lineal de la concentración de aldehídos. Luego se aprecia un aumento en la velocidad de formación de tales compuestos y, finalmente, se llega a una meseta cerca de los 80 minutos de fotólisis.

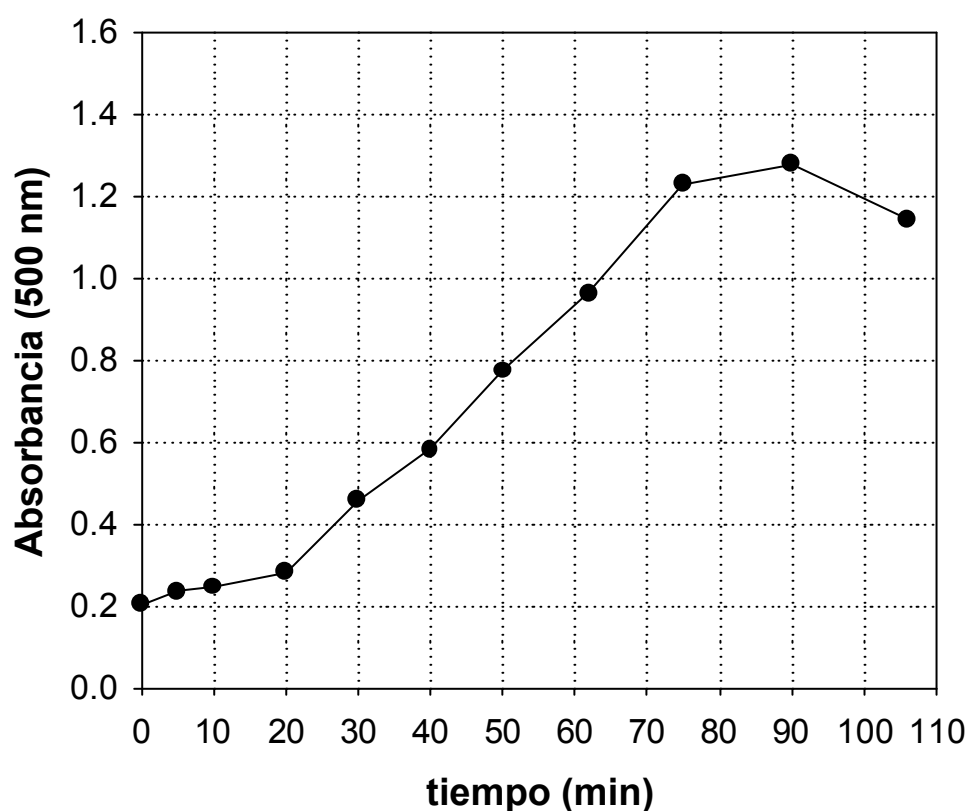


Figura 13.19. Determinación de aldehídos en una solución de ácido fólico (450 M, pH=12,0) contenida en un tubo de ensayo e irradiada con luz UV-A. La concentración de aldehídos es proporcional a la absorbancia de la solución a 500 nm, luego de la reacción colorimétrica con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

13.2. Papel del O₂ en la fotólisis del ácido fólico.

Se midió la concentración de O₂ disuelto en soluciones de ácido fólico durante la irradiación con el dispositivo electroquímico especificado en la parte experimental. Puede observarse en la figura 13.20 que existe un importante consumo de O₂ durante la fotólisis.

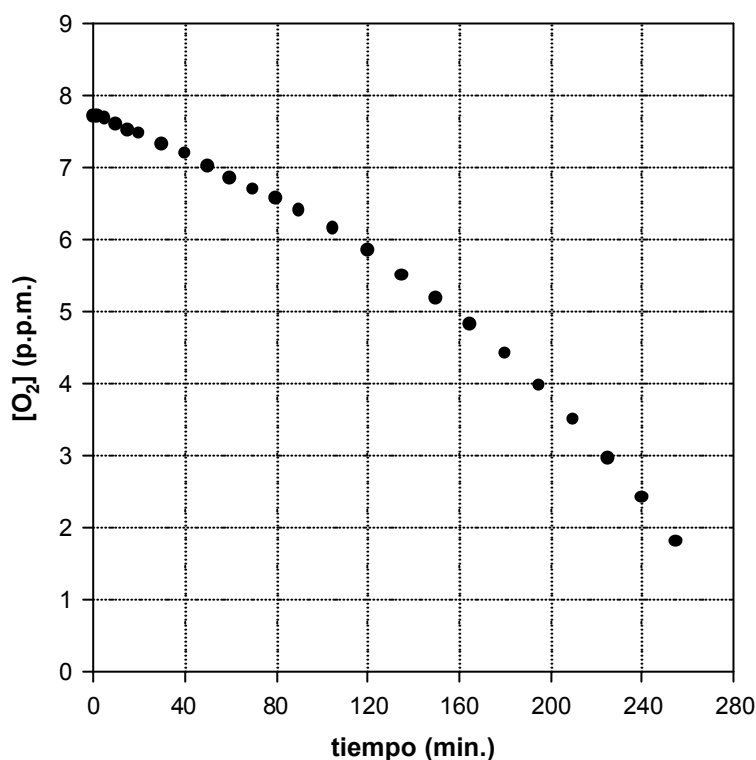


Figura 13.20. Evolución de la concentración de O₂ durante la fotólisis de una solución de ácido fólico (450 M, pH=11,0).

Para investigar la participación del ¹O₂ en las reacciones de fotodescomposición del ácido fólico, se realizaron experimentos de fotólisis en presencia de alcohol furfurílico. Las soluciones irradiadas en estas condiciones experimentales fueron analizadas por HPLC, empleando el sistema III de corrida. Los resultados se muestran en la figura 13.21, junto con los resultados obtenidos en un experimento similar pero realizado en ausencia del secuestrador (datos mostrados en la figura 13.10). Si bien se observa una disminución en la concentración del ácido fólico, la misma es muy pequeña en comparación con la observada en los experimentos realizados en ausencia de alcohol furfurílico. En este experimento no se detectaron aumentos en las concentraciones de 6-formilpterina y 6-carboxipterina, en las

primeras 2 horas de irradiación. Asimismo, no se detectaron los picos de la sustancias **A** y **B** en ninguno de los cromatogramas de las muestras irradiadas analizadas. Estos resultados sugieren que el $^1\text{O}_2$ es un intermediario fundamental para las dos vías de degradación fotoquímica del ácido fólico. Sin embargo, es necesario mencionar que la disminución de la concentración del ácido fólico podría deberse a la existencia de alguna otra vía de fotodescomposición independiente del $^1\text{O}_2$ y cuantitativamente poco importante.

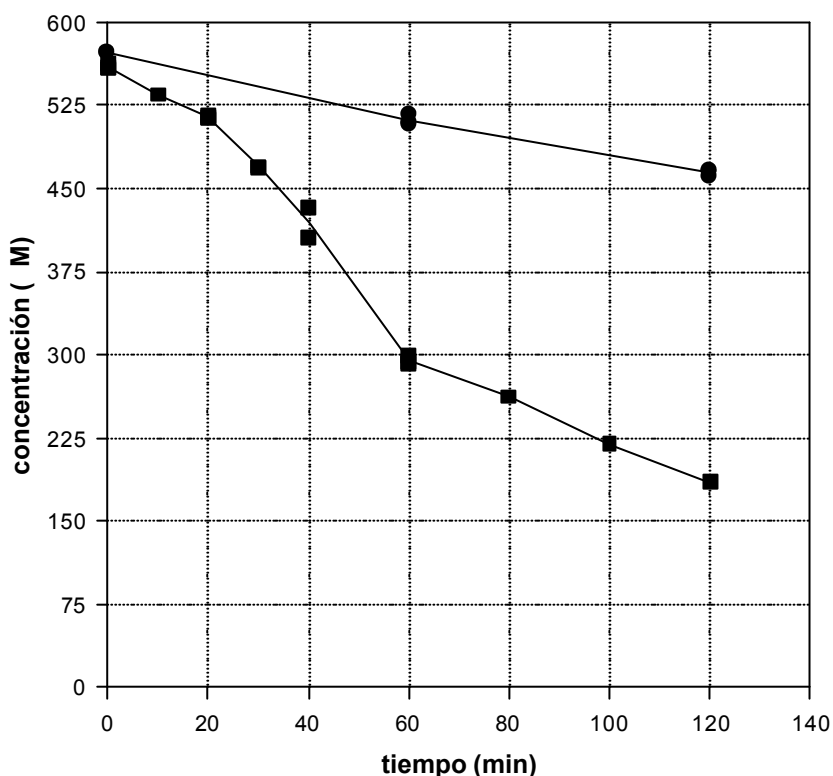


Figura 13.21. Evolución de la concentración del ácido fólico con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis de una solución de ácido fólico 570 M (pH=11,0) en presencia de alcohol furfurílico 10 mM. (■) Fotólisis de una solución de ácido fólico 560 M (pH=11,5).

En otra serie de experimentos se analizaron comparativamente los espectros de absorción de soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia y en ausencia de alcohol furfurílico. Estos experimentos fueron realizados a pH=11,8 y luego de las correspondientes irradiaciones se esperó unos minutos antes de tomar los espectros para que la reacción térmica se completara. En la figura 13.22 pueden observarse estos resultados. Es evidente que, si bien en presencia del secuestrador selectivo se producen cambios espectrales, éstos son de

magnitud mucho menor a los observados en su ausencia. En este caso se analizó sólo la porción del espectros comprendida entre 280 y 500 porque a longitudes de onda menores el alcohol furfurílico presenta absorción muy intensa y no permite obtener los correspondientes espectros DE.

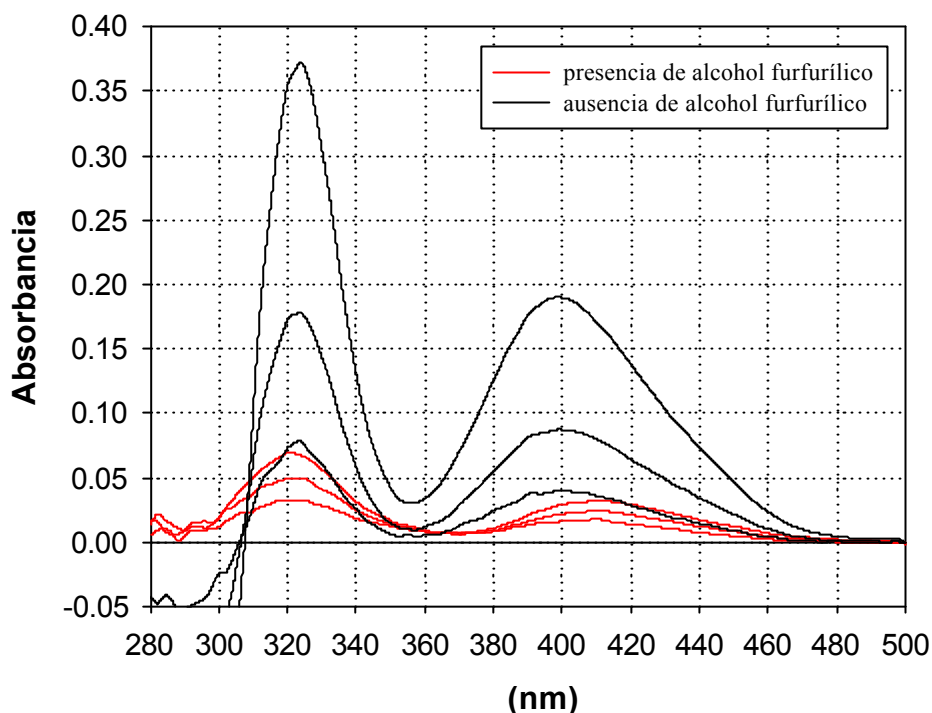


Figura 13.22. Espectros DE obtenidos durante sendas fotólisis de una solución de ácido fólico (450 M, pH=11,8). Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. Los espectros mostrados corresponden a 20, 40 y 60 minutos.

Una muestra de una solución de ácido fólico y alcohol furfurílico irradiada durante 80 minutos en las mismas condiciones del experimento que se acaba de describir, fue sembrada y corrida en una placa de TLC junto con una muestra sin irradiar del reactivo. En la figura 13.23 se muestra una fotografía de la mencionada placa. Puede observarse que en la calle correspondiente a la solución irradiada durante 80 minutos no se observa la aparición de 6-formilpterina ni 6-carboxipterina. Puede apreciarse una mancha muy tenue que pertenece a un compuesto que por su t_R podría ser la sustancia **B**. Teniendo en cuenta la intensidad de esta mancha puede concluirse que la sustancia **B**, si está presente, lo está en concentración muy baja respecto a experimentos similares realizados en ausencia de alcohol furfurílico (figura 13.5).

El análisis espectrofotométrico y por TLC de las soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia del secuestrador selectivo refuerzan la hipótesis planteada: el $^1\text{O}_2$ participa en ambas vías de fotodescomposición del reactivo, tanto a la que rinde 6-formilpterina como fotoproducto, como la que rinde sustancia A.



Figura 13.23. Corrida de TLC de solución de ácido fólico (450 μM) y alcohol furfurílico (10 mM). Solvente de corrida NH_4Cl 3,0%(p/v). Calles: 1, solución no irradiada; 2, solución irradiada durante 80 min.

Por otro lado, se realizaron medidas de $^1\text{O}_2$ en soluciones de ácido fólico y 6-formilpterina disueltos en D_2O (sección 8.3). Para el primer compuesto no pudo detectarse la emisión del $^1\text{O}_2$ en determinaciones realizadas a valores de pD de 9,04 y 11,40. Estos resultados implican que el rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) es menor al límite de detección del método (aproximadamente 0,03). Esto podría contribuir al menor rendimiento cuántico de fotodescomposición del ácido fólico observado en medio alcalino respecto al medido en medio ácido.

Por el contrario, la 6-formilpterina genera, en medio alcalino, cantidades considerables de $^1\text{O}_2$. En efecto, se obtuvo un valor para Φ_Δ igual a 0,31, a pD= 11,40. Este valor es muy próximo al correspondiente a soluciones ácidas (0,33). En la figura 13.24 se muestran las señales obtenidas con una solución de 6-formilpterina en D_2O y las de su correspondiente referencia.

Estos resultados permiten postular una hipótesis sobre el mecanismo de la reacción de transformación de ácido fólico en 6-formilpterina y ácido p-aminobenzoilglutámico, como así también sobre la aceleración que sufre la misma luego de los 20 minutos de irradiación. Esta hipótesis es similar a la propuesta para la reacción en medio ácido. Es decir, cuando la cantidad de luz absorbida por la 6-formilpterina deja de ser despreciable, este compuesto se transforma en otra fuente de $^1\text{O}_2$ y, una vez acumulada suficiente cantidad del mencionado compuesto, esta segunda fuente se transforma en la principal. En este caso, no se pudo estimar el valor de la constante cinética bimolecular de la reacción entre el ácido fólico y el $^1\text{O}_2$ debido a que no se pudo obtener el valor de Φ_{Δ} del ácido fólico en estas condiciones.

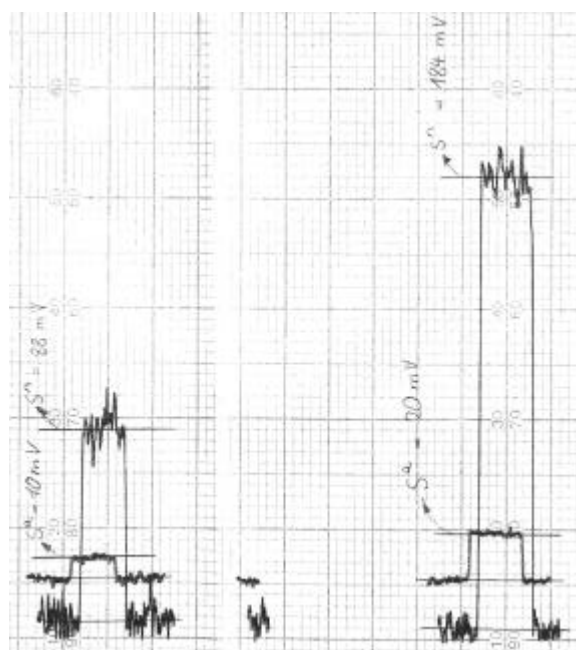


Figura 13.24. Determinación del Φ_{Δ} de la 6-formilpterina. Experimento realizado en D_2O (pD= 11,40). Las señales de la izquierda corresponden a una solución de 6-formilpterina, mientras que las de la derecha corresponden a una solución de rosa de bengala (referencia).

13.3. Fotólisis de ácido fólico en ausencia de O_2 .

Se realizaron experimentos en los cuales se irradiaron soluciones de ácido fólico previamente burbujeadas con N_2 para eliminar el O_2 . Estas soluciones fueron analizadas con el objeto de investigar la existencia de reacciones fotoquímicas en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, al igual que en medio ácido, tales reacciones no fueron detectadas.

La figura 13.25 muestra los espectros de absorción de una solución de ácido fólico irradiada en ausencia de O_2 . Puede observarse que los cambios espectrales son despreciables respecto a experimentos similares realizados en presencia de O_2 .

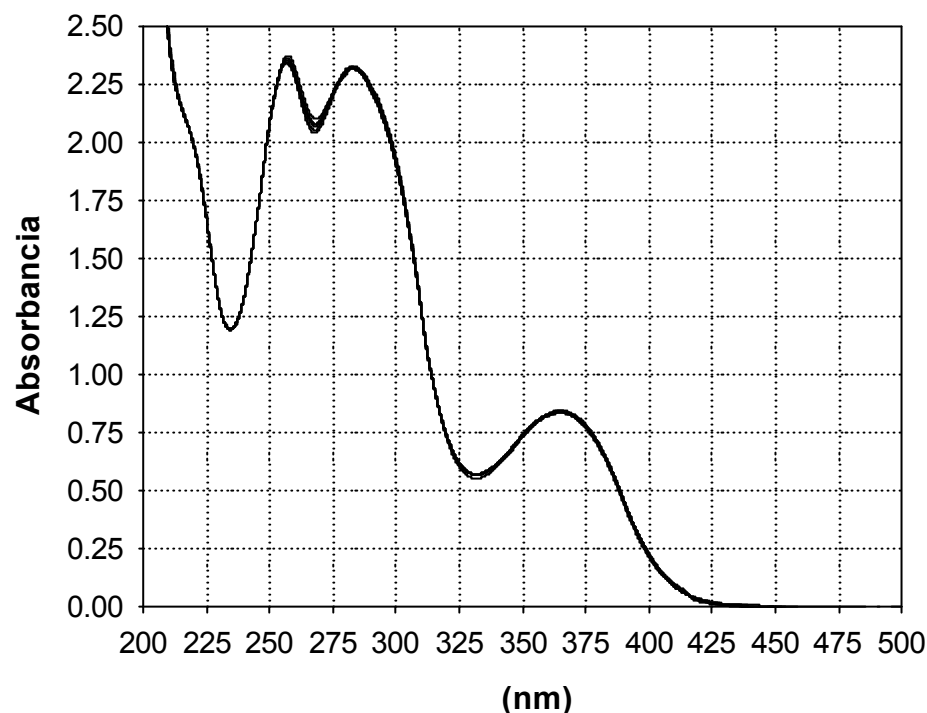


Figura 13.25. a) Irradiación de una solución de ácido fólico (450 M, pH= 11,0) en ausencia de O_2 . Caminos ópticos de 1 y 0,2 cm para la irradiación y la observación, respectivamente. Los espectros de absorción fueron tomados cada 15 min durante 60 min.

Soluciones irradiadas en ausencia de O_2 fueron analizadas por TLC. En estos experimentos no se detectó la presencia de 6-formilpterina, ni de 6-carboxipterina. Una sustancia que por su movilidad podría ser la sustancia **B** pudo ser detectada. Sin embargo, la intensidad de las correspondientes manchas es despreciable en comparación con las manchas observadas en experimentos realizados en presencia de O_2 . En la figura 13.26 se muestran fotografías de placas de TLC realizadas en diferentes condiciones.

El análisis por HPLC realizado sobre soluciones irradiadas de ácido fólico muestran que la concentración de este compuesto disminuye muy poco con el tiempo de irradiación (9% en 2 horas) en comparación con el consumo observado en experimentos similares realizados en presencia de O_2 (67% en 2 horas). En la figura 13.26 se presentan los resultados de un experimento en el cual se irradió una solución de ácido fólico durante 120 min. Se muestra, además, comparativamente la evolución de la concentración de ácido fólico en el

experimento expuesto en la figura 13.10. Además los picos correspondientes a la 6-formilpterina y a la 6-carboxipterina no crecen con el tiempo de exposición a la luz UV. Tampoco se detectó la aparición de otros picos.

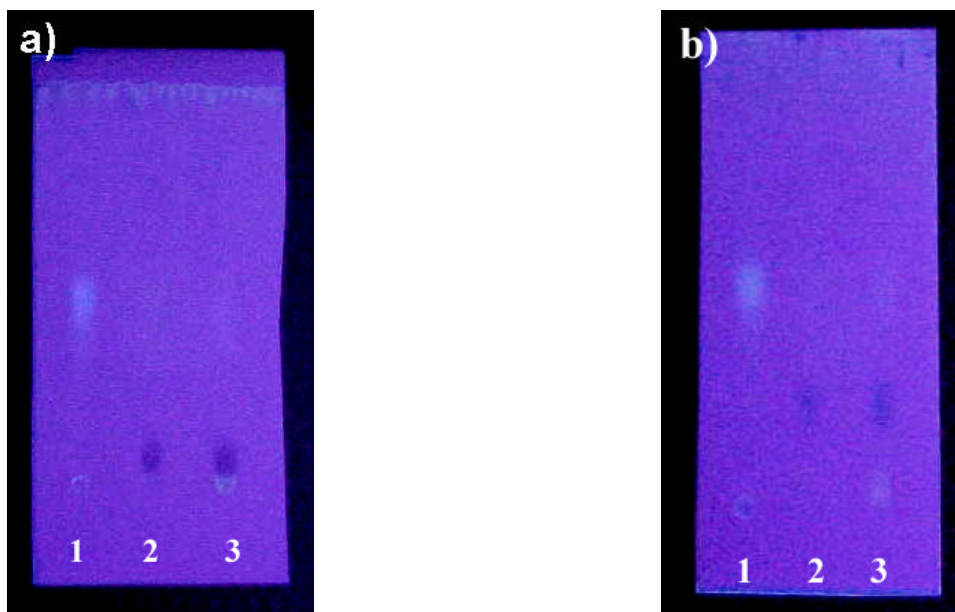


Figura 13.26. Corridas de TLC. a) Solvente de corrida NH_4Cl 0,3%(P/V); b) Solvente de corrida NH_4Cl 3,0%(P/V). Calles: 1, solución de 6-formilpterina 150 M; 2, solución de ácido fólico 450 M; 3, solución de ácido fólico 450 M (pH=11,8) irradiada durante 60 min con luz UV-A.

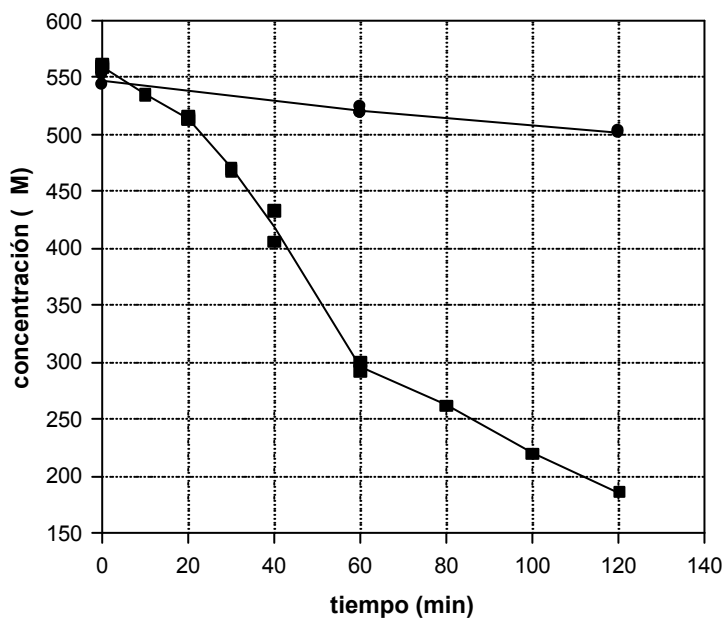


Figura 13.26. (●) Fotólisis de una solución de ácido fólico 550 M (pH=11,0) en ausencia de O_2 . (□) Fotólisis de una solución aireada de ácido fólico (560 M, pH=11,5).

13.4. Conclusiones.

Los resultados expuestos en este capítulo permitieron demostrar que la fotoquímica del ácido fólico en soluciones acuosas alcalinas presenta similitudes y diferencias respecto a aquella estudiada en medio ácido. Tanto la 6-formilpterina como el ácido *p*-aminobenzoilglutámico son los productos de la fotooxidación del mencionado reactivo. El mecanismo de esta reacción involucra al $^1\text{O}_2$ como intermediario reactivo, siendo este generado por el propio ácido fólico. Hasta aquí, el comportamiento es análogo al observado en medio ácido; sin embargo, el análisis de los rendimientos cuánticos de consumo de reactivo y formación de productos muestra que, en primer lugar, el ácido fólico, en iguales condiciones de concentración (600 μM), es menos fotosensible en soluciones básicas ($\Phi_{\text{AF}}=5,1 \times 10^{-3}$) que en soluciones ácidas ($\Phi_{\text{AF}}=2,5 \times 10^{-2}$). En segundo lugar, no todo el reactivo consumido se transforma en 6-formilpterina, siendo el rendimiento cuántico de formación de este compuesto de sólo $2,9 \times 10^{-3}$ para las mencionadas condiciones de concentración.

Se detectó la presencia de dos productos de reacción adicionales en las soluciones irradiadas, los cuales no pudieron ser identificados directamente mediante el empleo de soluciones de compuestos patrón y a las que se denominó arbitrariamente sustancias **A** y **B**. La primera es un fotoproducto directo de la fotólisis del ácido fólico, siendo el mecanismo de la correspondiente reacción similar al de la formación de 6-formilpterina; es decir, se trata de una fotooxidación en la cual el $^1\text{O}_2$ es el intermediario reactivo. La sustancia **B**, por su parte, proviene de la descomposición de la sustancia **A**. Esta transformación es una reacción térmica lo suficientemente lenta como para que ambos compuestos puedan ser detectados, pero cuya velocidad es fuertemente dependiente del pH, acelerándose al aumentar el mismo.

En medio alcalino se observa un efecto de aceleración de la fotólisis cuando la misma avanza que puede ser explicado de la misma manera que en medio ácido. La 6-formilpterina genera, en estas condiciones, $^1\text{O}_2$, con una eficiencia ($\Phi_{\Delta}=0,31$) similar a la que muestra en soluciones de pH menor a 7 ($\Phi_{\Delta}=0,33$). El rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ del ácido fólico es, por su parte, muy pequeño. En consecuencia, cuando la concentración del citado fotoproducto es lo suficientemente alta como para que la luz absorbida por él no sea despreciable, la velocidad de formación de $^1\text{O}_2$ aumenta y, por ende, su concentración en el medio. Por esta razón, la velocidad de degradación del ácido fólico a través de las dos vías

aumenta al avanzar la fotólisis, en vez de disminuir por agotamiento del reactivo.

La figura 13.27 muestra las vías de la fotodescomposición del ácido fólico y el mecanismo que involucra al $^1\text{O}_2$ como especie activada del O_2 . Nótese que la diferencia fundamental con el esquema presentado en la figura 10.24, para la fotólisis en medio ácido, radica en que el ácido fólico reacciona por dos vías distintas con el $^1\text{O}_2$.

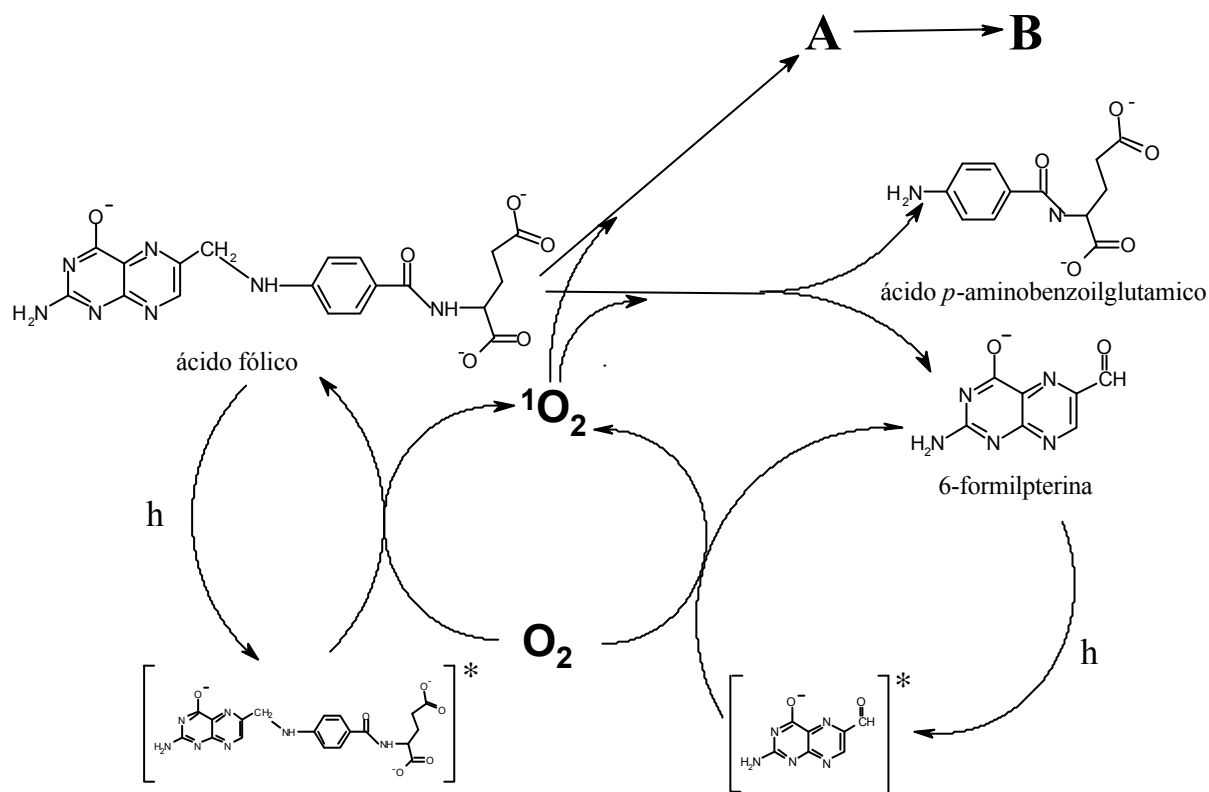


Figura 13.27. Esquema de reacciones desencadenadas por la irradiación de luz UV-A sobre una solución de ácido fólico.

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.

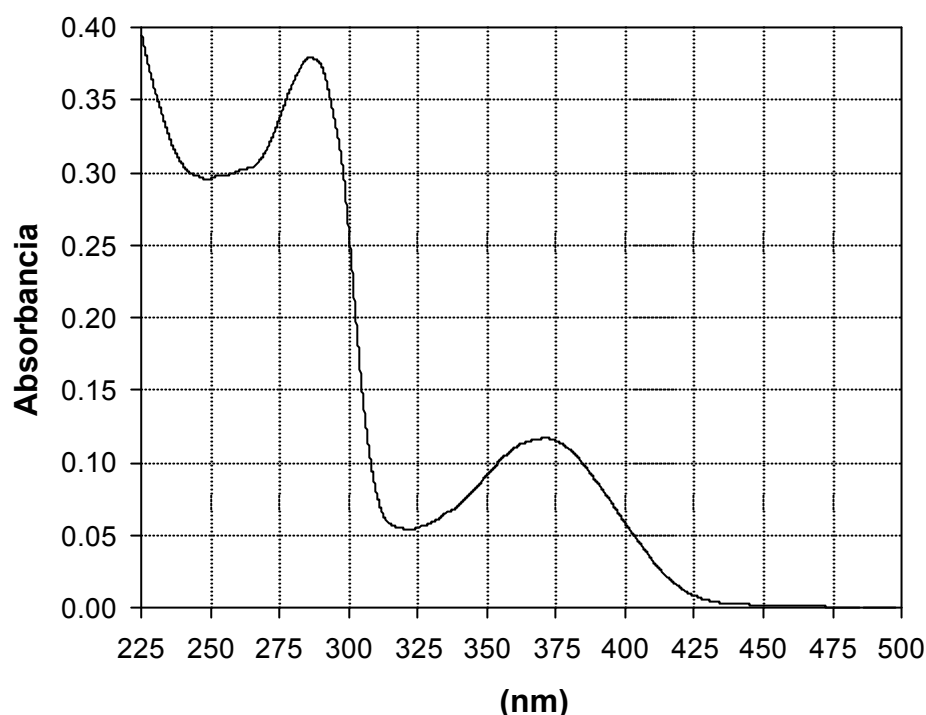


Figura 14.1. Espectro de absorción de una solución de la sustancia **A** en NH_4Cl 3%(p/v) (pH=5,5).

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.

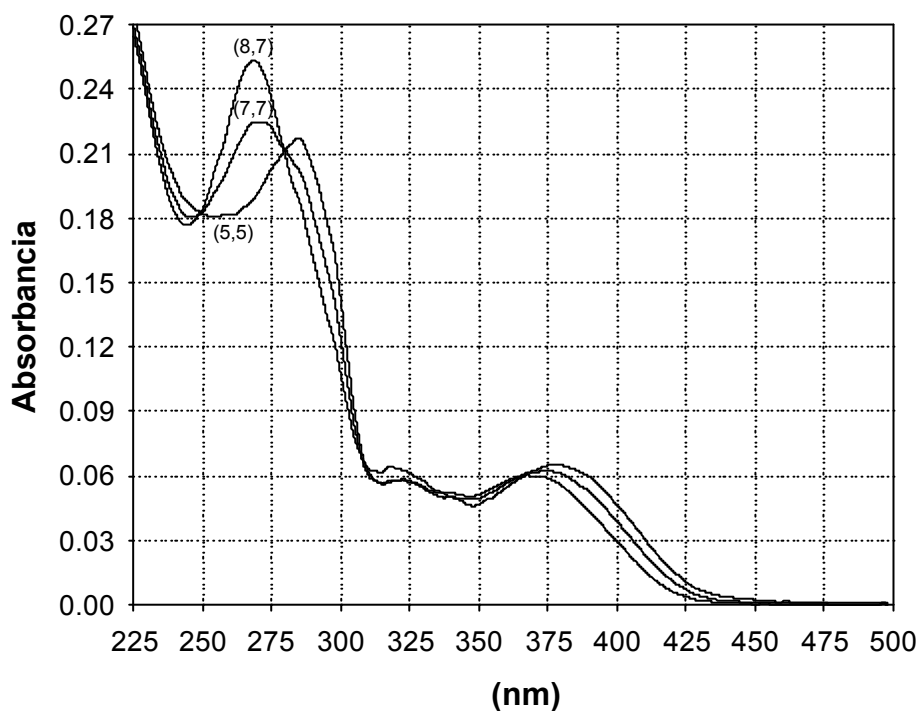


Figura 14.2. Espectros de soluciones de la sustancia A a distintos valores de pH, los cuales se especifican entre paréntesis.

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.

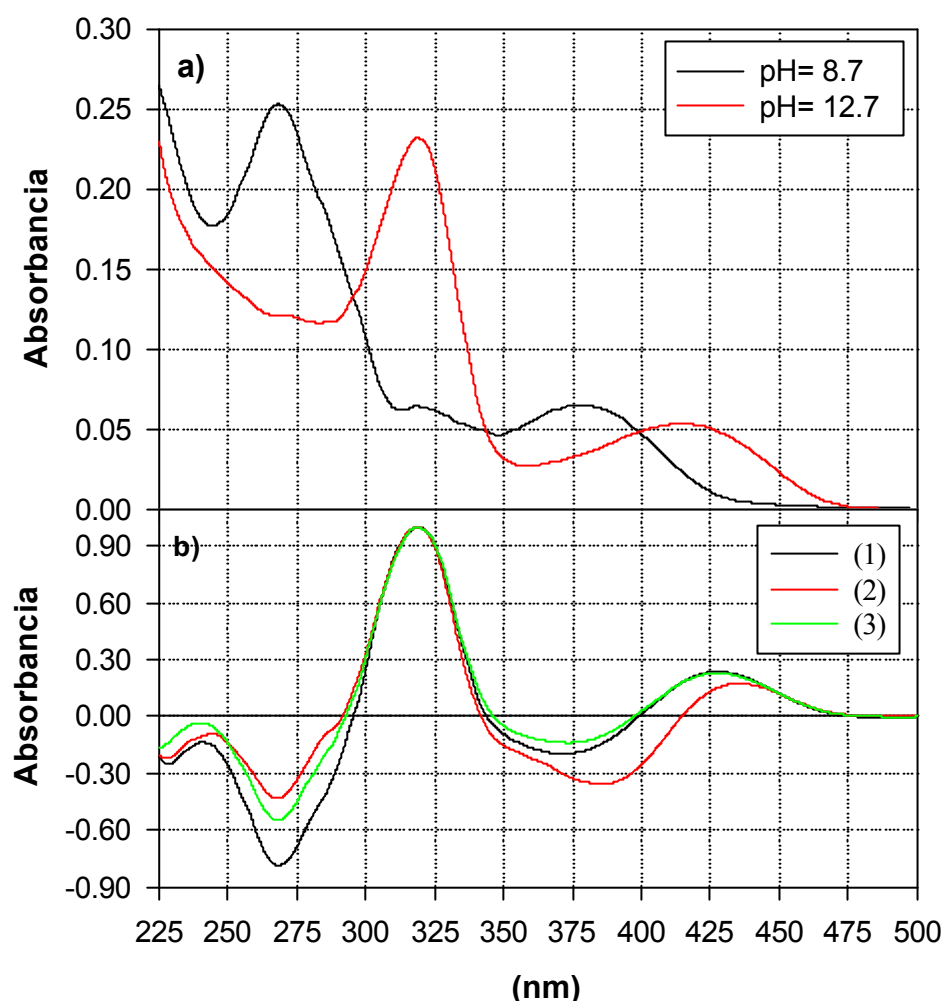


Figura 14.3. a) Espectros de absorción de una solución de la sustancia A obtenida mediante TLC preparativa y alcalinizada. b) Espectros DEN. (1) Obtenido de la diferencia entre los espectros de la figura a). (2) y (3) Obtenidos en experimentos de fotólisis de ácido fólico, luego de interrumpir la irradiación.

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.

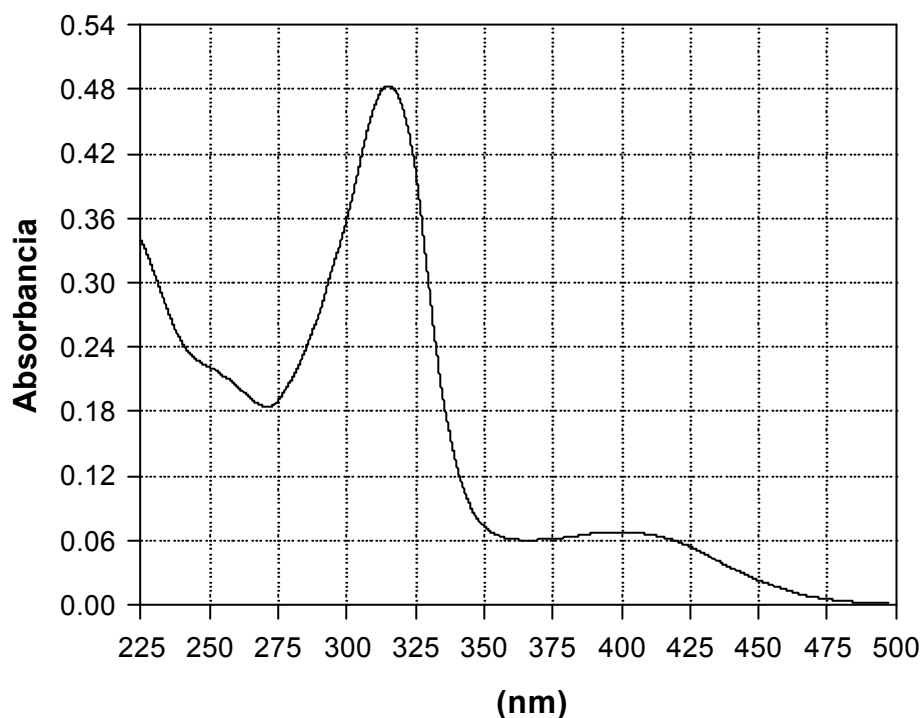


Figura 14.4. Espectro de una solución resultante de extraer la banda correspondiente a la fracción **B** con HCl 0,5 M.

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.

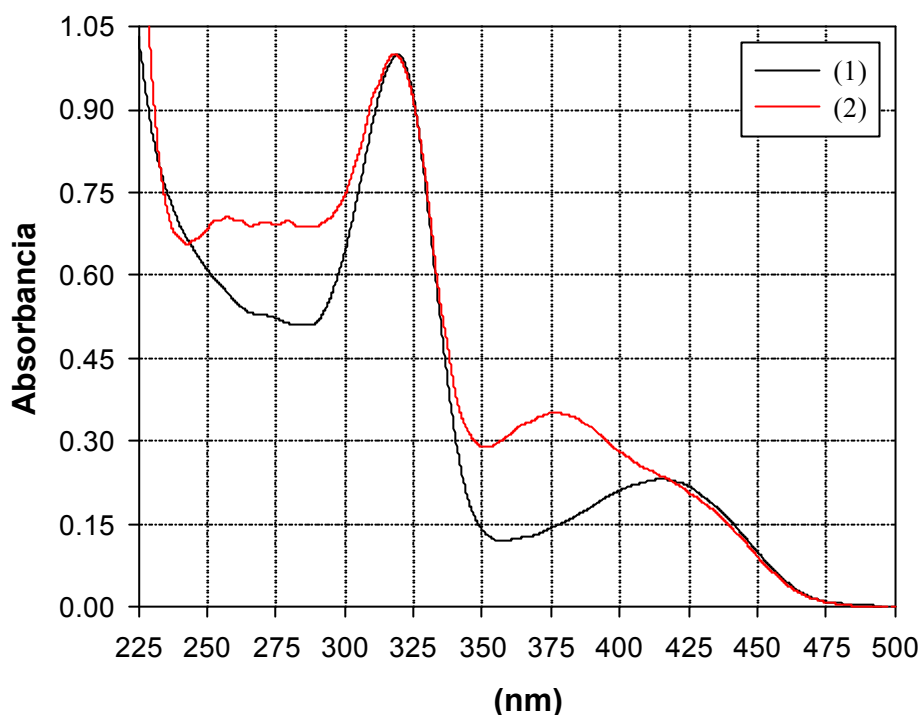


Figura 14.5. (1) espectro normalizado de una solución de sustancia A alcalinizada. (2) Espectro de una solución resultante de extraer la banda correspondiente a la fracción B (pH= 11).

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.

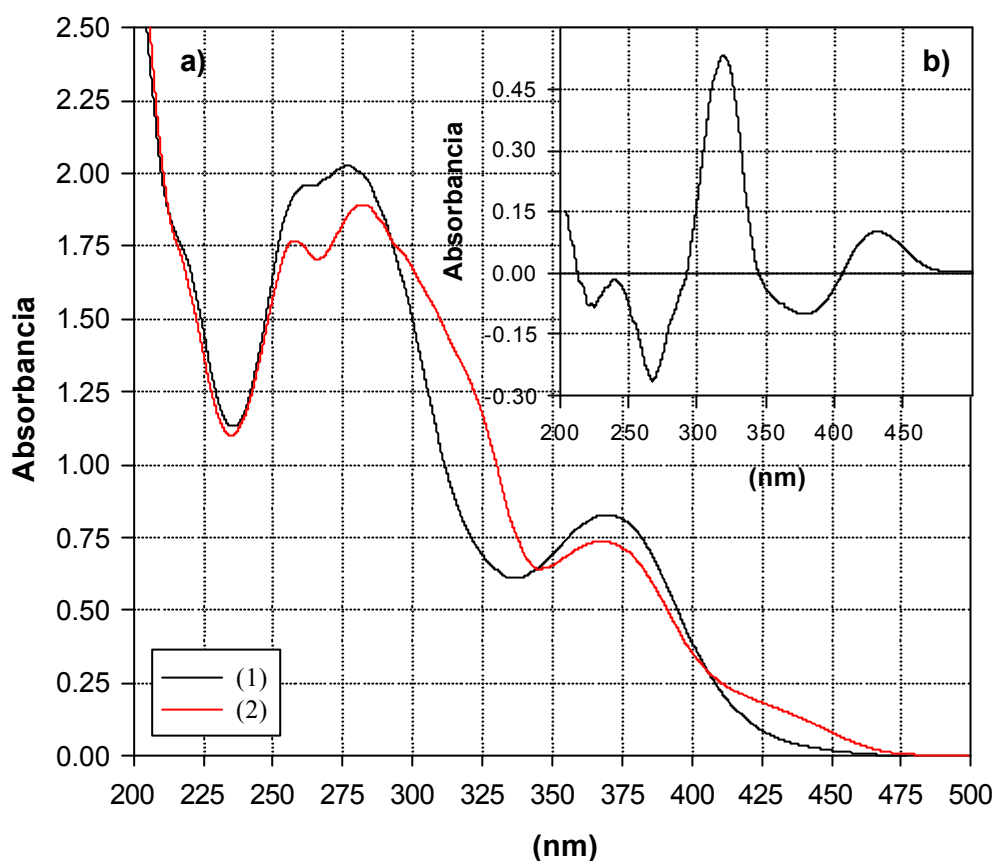


Figura 14.6. a) Evolución del espectro de absorción en una solución de ácido fólico fotolizada a pH=10,5 y luego burbujada con N₂. (1) Espectro tomado inmediatamente después de burbujear la solución. (2) Espectro tomado 72 hs después . b) Espectro DE correspondiente.

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.

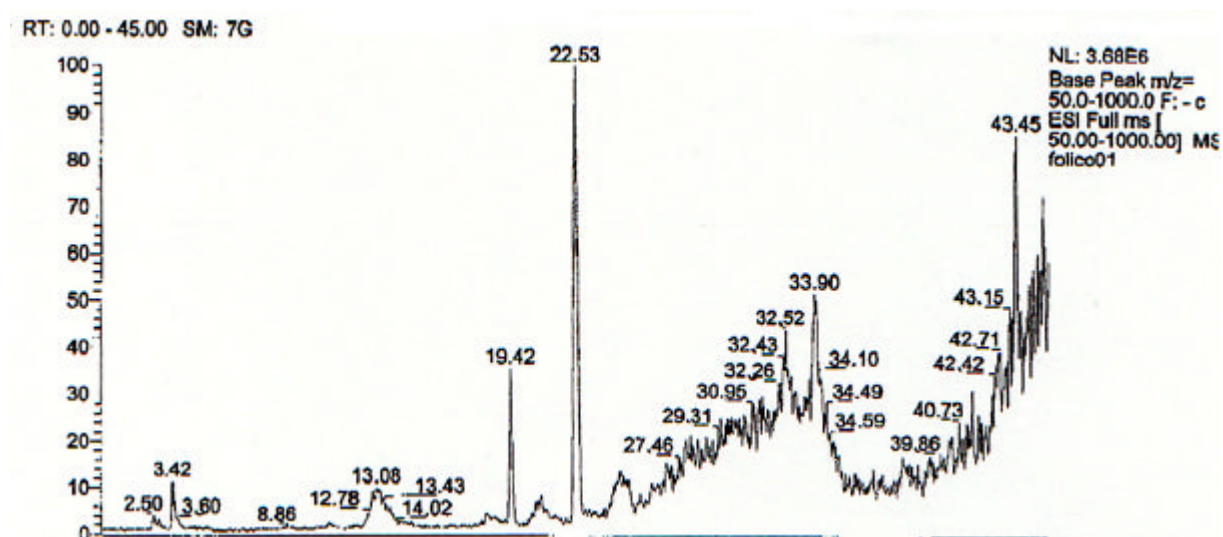


Figura 14.7. Cromatograma de una solución de sustancia **B** obtenida de la extracción de la correspondiente banda de una placa de TLC de celulosa (250 m).

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 las 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.

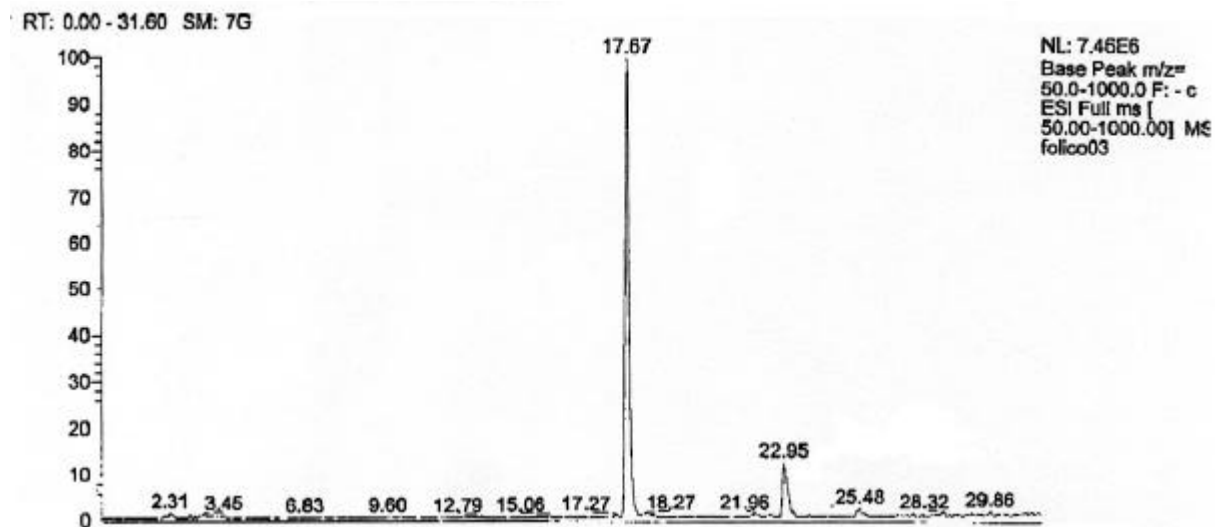


Figura 14.8. Cromatograma de una solución de sustancia A obtenida de la extracción de la correspondiente banda de una placa de TLC de celulosa (250 m).

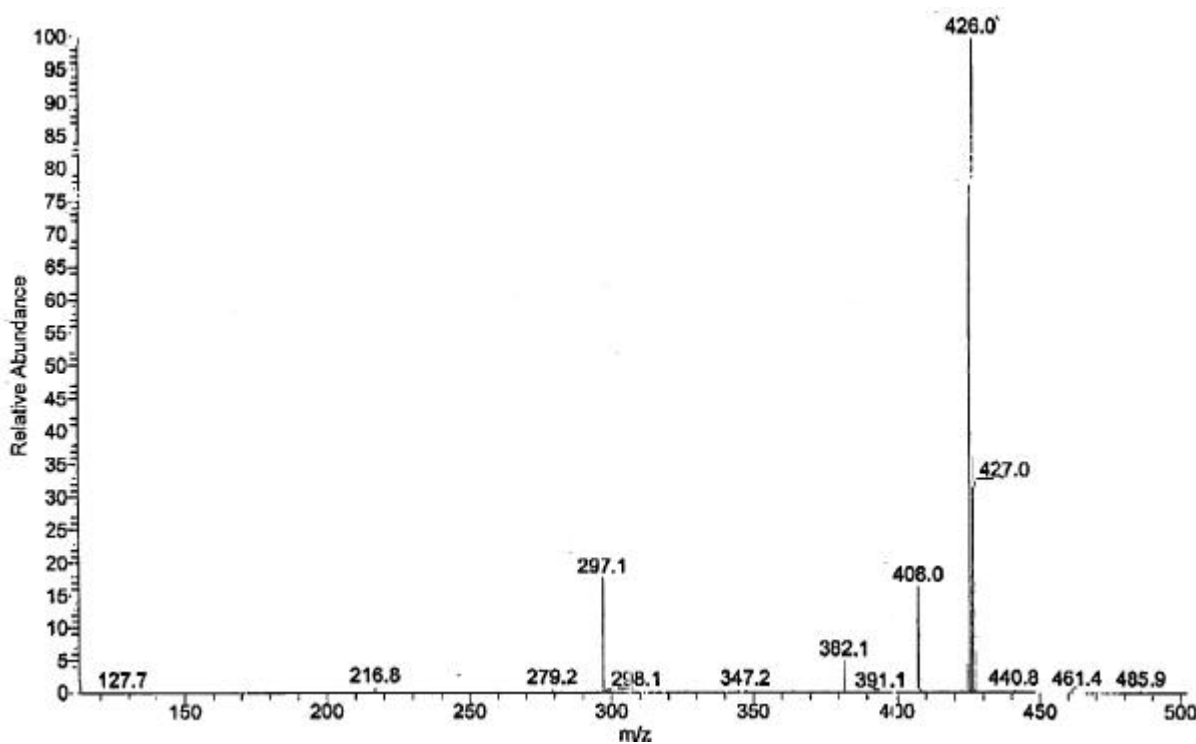


Figura 14.9. Espectro de masas de la sustancia B

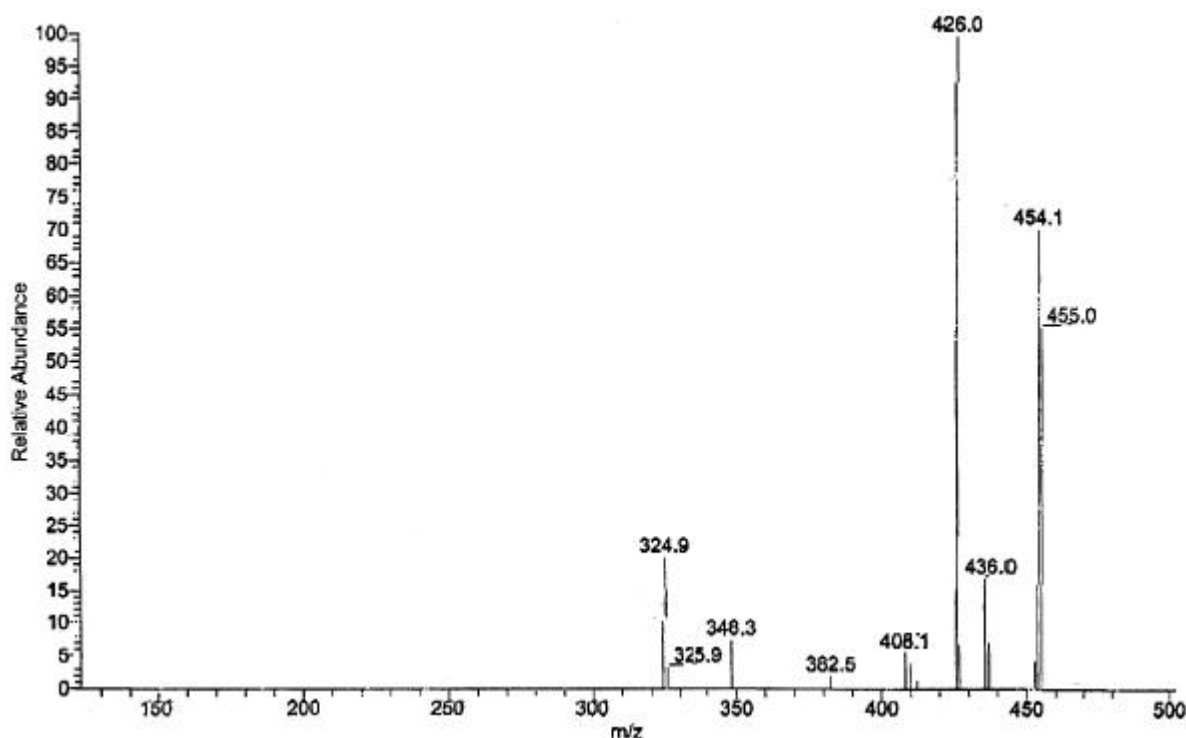


Figura 14.10. Espectro de masas de la sustancia A.

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.

Capítulo 15.

Estudio cinético de la reacción térmica presente en las soluciones irradiadas de ácido fólico.

Antes de iniciar este capítulo es conveniente hacer un breve repaso de algunos de los resultados presentados hasta aquí. El ácido fólico se degrada fotoquímicamente a través de, al menos, dos vías en soluciones alcalinas y en presencia de O_2 . Una de ellas es similar a la estudiada en medio ácido, la otra vía produce un compuesto **A** que se transforma, sin necesidad de iluminación, en otro compuesto **B**. Esta reacción térmica produce cambios espectrales en las soluciones irradiadas de ácido fólico, una vez que se ha interrumpido la iluminación. Además la velocidad de estos cambios espectrales aumenta drásticamente si se alcaliniza la solución con una base fuerte (NaOH, KOH). A partir de la sustancia **A**, aislada mediante TLC preparativa, se logró reproducir estas variaciones espectrales. En efecto, cuando una solución de sustancia **A**, extraída de una placa de TLC, se alcaliniza, se inicia una reacción térmica que presenta un espectro diferencia normalizado similar al observado en las soluciones irradiadas, luego de interrumpir la irradiación.

A partir de estos resultados preliminares se decidió encarar el estudio cinético de la reacción térmica de conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. Como objetivo principal de esta etapa se propuso encontrar una ley de velocidad para esta reacción, estudiando la dependencia de la velocidad de este proceso con el pH. En este capítulo se exponen los resultados de este estudio cinético.

La realización de los experimentos expuestos en este capítulo requirió el empleo de una metodología particular descrita en forma general en la sección 8.2. Sin embargo, algunos detalles experimentales no expuestos en dicha sección fueron incluidos en el desarrollo de este capítulo. Los experimentos que se presentarán a continuación fueron realizados

empleando dos tipos de soluciones distintas:

- soluciones de ácido fólico irradiadas en presencia de O_2 durante un tiempo suficientemente largo como para originar una cantidad adecuada de la sustancia **A**.
- soluciones de la sustancia **A** obtenidas aplicando la técnica TLC preparativa a soluciones irradiadas de ácido fólico.

Los resultados de ambos grupos de experimentos se presentan por separado.

15.1. Experimentos realizados con soluciones irradiadas de ácido fólico.

15.1.11 Metodología.

Para estos experimentos se emplearon soluciones de ácido fólico de concentración 450 μM y pH aproximadamente 10. En estas condiciones más del 99,9% de la luz es absorbida por el ácido fólico. Por otra parte, casi el 99% de la molécula está en su forma básica. Esta condición es necesaria ya que la forma protonada de la molécula no genera sustancia **A** al ser irradiada. Sin embargo, no se usaron soluciones de pH superior a 10 para no aumentar la velocidad de la reacción que se quiere estudiar. Se supo, sobre la base de experimentos preliminares, que a pH 10 la reacción térmica es relativamente lenta. En definitiva, se buscó una condición de pH tal que permitiera irradiar sólo a la forma alcalina, pero a la cual la velocidad de degradación de sustancia **A** fuera lo suficientemente lenta.

Luego de interrumpir la iluminación, las soluciones se mezclaron rápidamente con soluciones reguladoras con el objeto de fijar el pH de la solución a un valor adecuado. Inmediatamente después de realizar esta operación, se inició el seguimiento de las variaciones espectrales.

Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas en el equipo Cary3 (Varian), descrito en la parte experimental. Para estudiar la cinética de la reacción se registraron y almacenaron los espectros de las soluciones a distintos tiempos, y luego se analizaron las variaciones de la absorbancia como una función del tiempo para distintas longitudes de onda.

Las soluciones reguladoras usadas fueron soluciones de K_2HPO_4/K_3PO_4 0,025 M preparados según técnica descrita en literatura. La mezcla de las soluciones a estudiar con el buffer se realizó de dos maneras diferentes. En los casos en los que la reacción era lo suficientemente lenta, se llevó a cabo un mezclado manual, en el cual se agregaron 4 ml de

buffer a 1 ml de solución irradiada en el interior de una celda. Este procedimiento se realizó con soluciones reguladoras de distintos valores de pH. En todos los casos se disparó un cronómetro justo en el momento de la mezcla. Luego, se colocó la celda en el espectrofotómetro y se comenzaron a realizar las medidas.

Se realizaron experimentos de control para verificar si el pH de las soluciones se modificaba luego de realizar la mezcla. De esta manera, para diferentes soluciones reguladoras se midió el pH inmediatamente después de realizar la mezcla con la solución fotolizada y luego de finalizar la reacción térmica. En ninguna de las pruebas de control se observaron modificaciones en el pH.

En ciertas condiciones, que se detallarán más adelante, la reacción se vuelve tan rápida que ocurre parcialmente dentro del tiempo de mezclado manual (unos 20 segundos). En estos casos se recurrió a la utilización de un accesorio de flujo detenido (stopped flow) SFA-20 de Hi-Tech, especialmente diseñado para ser usado en los espectrofotómetros Cary, utilizando de ellos su sistema de detección óptica. Este accesorio, reduce el tiempo de mezclado a unos 10 milisegundos.

15.1.2. Análisis cinético de los resultados.

En la figura 15.1.a se muestran las variaciones espectrales observadas luego de alcalinizar una solución fotolizada en las condiciones experimentales detalladas en la sección anterior (pH=10,0). Estos cambios se deben, obviamente, al proceso térmico que se está analizando. En la figura 15.1.b se muestran los espectros DE para distintos tiempos luego de la mezcla con el buffer, los cuales fueron obtenidos restando el primer espectro tomado luego de la alcalinización a los restantes. Pueden apreciarse tres puntos isobéuticos bien definidos que se mantienen en todo el rango de tiempo analizado.

A partir de estos resultados se construyeron gráficas de la absorbancia en función del tiempo. En la figura 15.2 se muestran varias curvas obtenidas en distintas zonas del espectro. Este proceso se ajusta a una cinética de primer orden, es decir que puede representarse con la siguiente ecuación:

$$\ln(\Delta A) = -k' \cdot t + \text{cte} \quad \text{con } \Delta A = | A_t - A_\infty |$$

donde, A_t es la absorbancia al tiempo t , A_∞ es la absorbancia a tiempo infinito; k' es la constante cinética aparente de primer orden y t es el tiempo. En la figura 15.3 se muestran

representaciones de $\ln(\Delta A)$ como una función del tiempo. Se comprobó que las pendientes de estas representaciones no dependen de la longitud de onda de análisis.

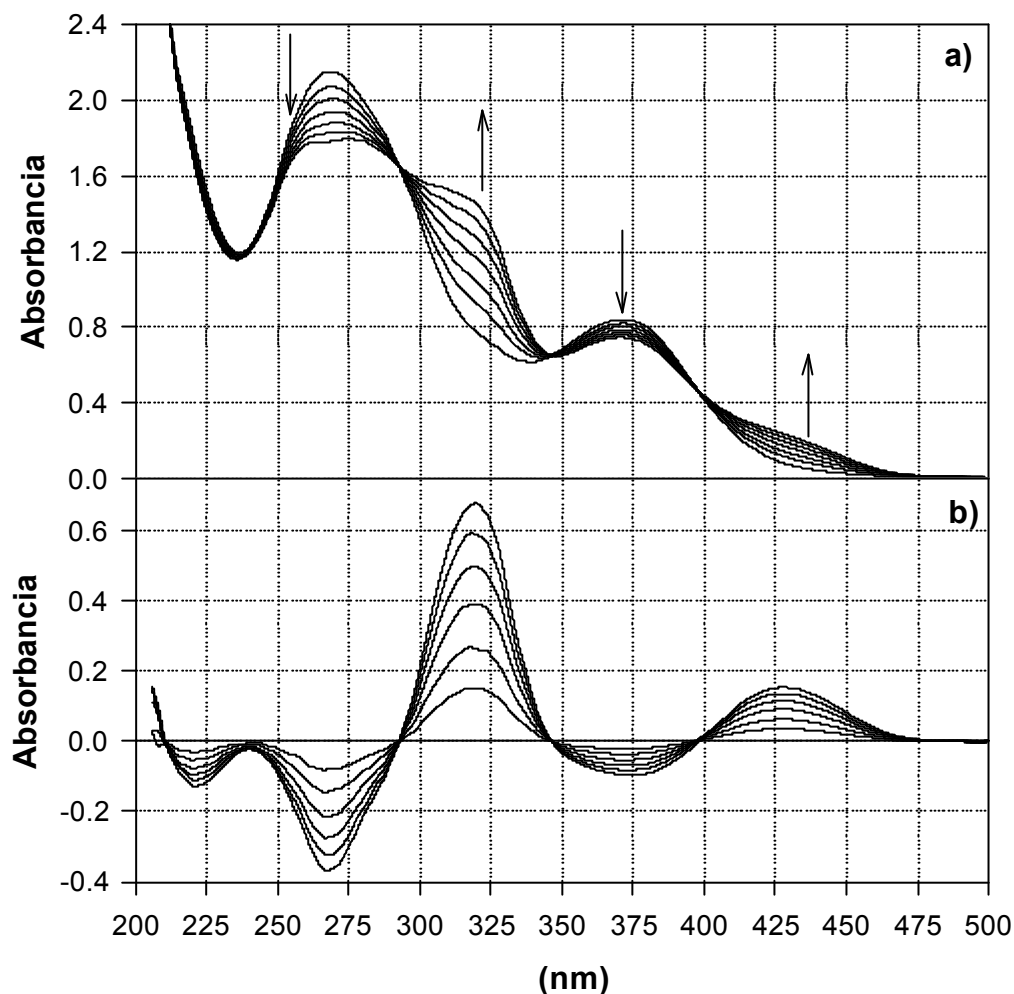


Figura 15.1. a) Evolución del espectro de una solución de ácido fólico fotolizada a pH 10 y luego alcalinizada a pH 10,5 con un buffer de fosfatos. El tiempo 0 corresponde al momento de la alcalinización. Los espectros mostrados corresponden a los siguientes tiempos: 0,5; 3,1; 5,7; 9,6; 14,8; 22,6 y 48,6 min. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

Este comportamiento muestra que la reacción estudiada es de primer orden respecto a la sustancia A. Puede por lo tanto proponerse la siguiente ecuación:

$$-d[A]/dt=k'.[A] \quad (1)$$

donde [A] representa la concentración de la sustancia A.

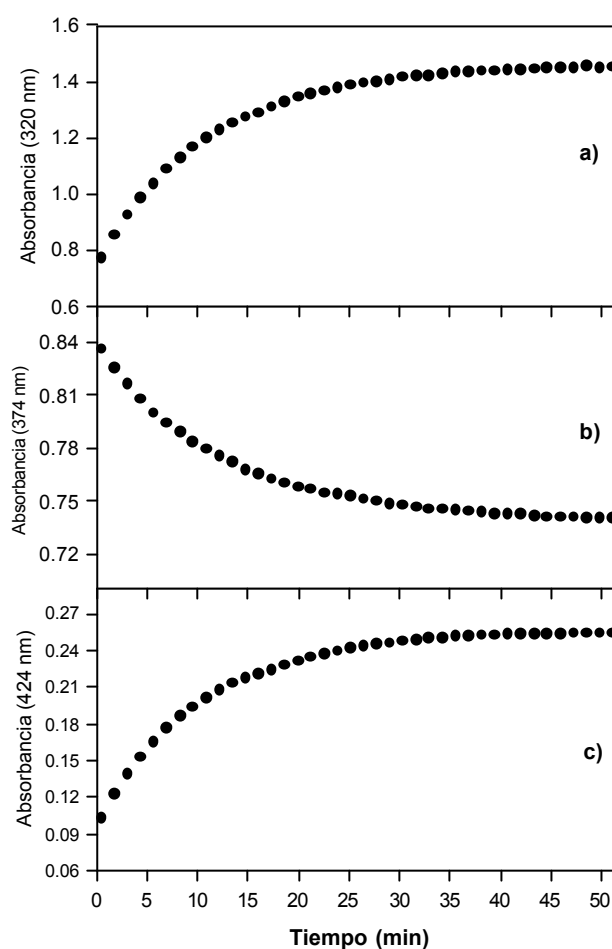


Figura 15.2. Evolución de la absorbancia en función del tiempo para distintas λ . Estos datos corresponden al experimento mostrado en la figura 15.1. a) 320 nm. b) 374 nm. c) 424 nm.

Se realizó una serie de experimentos similares al descrito empleando soluciones reguladoras de distinto pH. Para cada experimento se obtuvo la constante aparente k' . En todos los casos se observó un comportamiento cinético de primer orden y en ninguno se observó dependencia de dicha constante con la longitud de onda.

En la tabla 15.1 se muestran los promedios para cada uno de estos experimentos. Se observa una fuerte dependencia de k' con el pH. Si se grafican los valores de esta constante en función de la concentración de iones hidroxilo puede apreciarse una dependencia lineal. Este comportamiento se muestra en la figura 15.4.

Como puede observarse en la tabla 15.1 y en la figura 15.4, la reacción se acelera sensiblemente al aumentar el pH. En las últimas tres series de experimentos (pH=11,94; 12,10 y 12,75) la reacción se vuelve tan rápida que una porción importante de la misma transcurre

en el tiempo de mezcla. Para estos experimentos se recurrió al empleo de la técnica de flujo detenido.

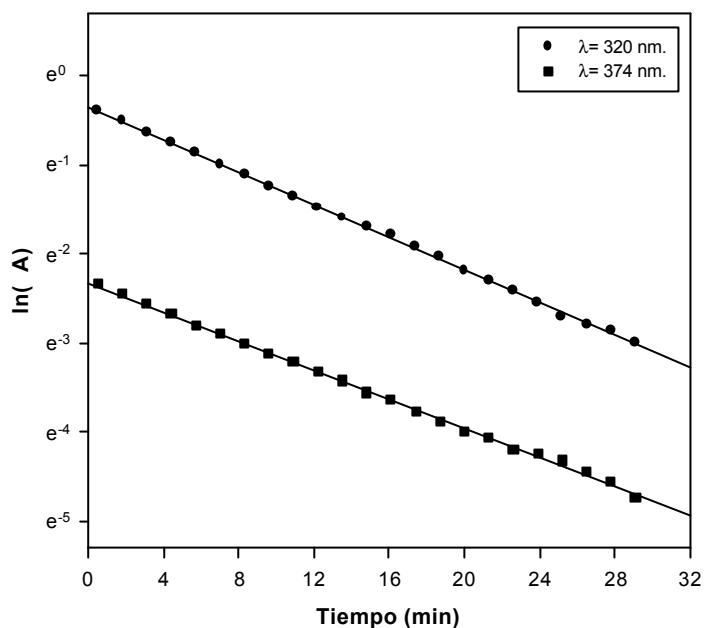


Figura 15.3. Comportamiento de primer orden para de las cinéticas representadas en la figura 15.2. Las rectas corresponden a las regresiones lineales calculadas.

pH	[OH ⁻] (M)	k' (min ⁻¹)
10,60	3,981x10 ⁻⁴	0,0253
10,90	7,943x10 ⁻⁴	0,0531
11,25	1,778x10 ⁻³	0,0993
11,60	3,981x10 ⁻³	0,275
11,80	6,310x10 ⁻³	0,406
11,94	8,710x10 ⁻³	0,582
12,10	1,26x10 ⁻²	0,776
12,75	5,62x10 ⁻²	2,819

Tabla 15.1. Constantes cinéticas obtenidas en experimentos realizados a distintos pH. Cada valor es el resultado de promediar, al menos, 10 constantes correspondientes a distintas .

De acuerdo a estos resultados puede observarse que el valor de la constante cinética aparente (k') aumenta linealmente al aumentar la $[\text{OH}^-]$. Puede escribirse la siguiente expresión para k' :

$$k' = k \cdot [\text{OH}^-] + k''_0$$

con $k = 63,0 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ y $[\text{OH}^-]$ expresada en M. La ordenada al origen (k''_0), dentro del error experimental es 0. La ecuación (1) puede, entonces, escribirse

$$-d[\text{A}]/dt = k \cdot [\text{OH}^-] \cdot [\text{A}]$$

De acuerdo a esta ley de velocidad la reacción de transformación de la sustancia **A** a la **B** es de primer orden para $[\text{OH}^-]$.

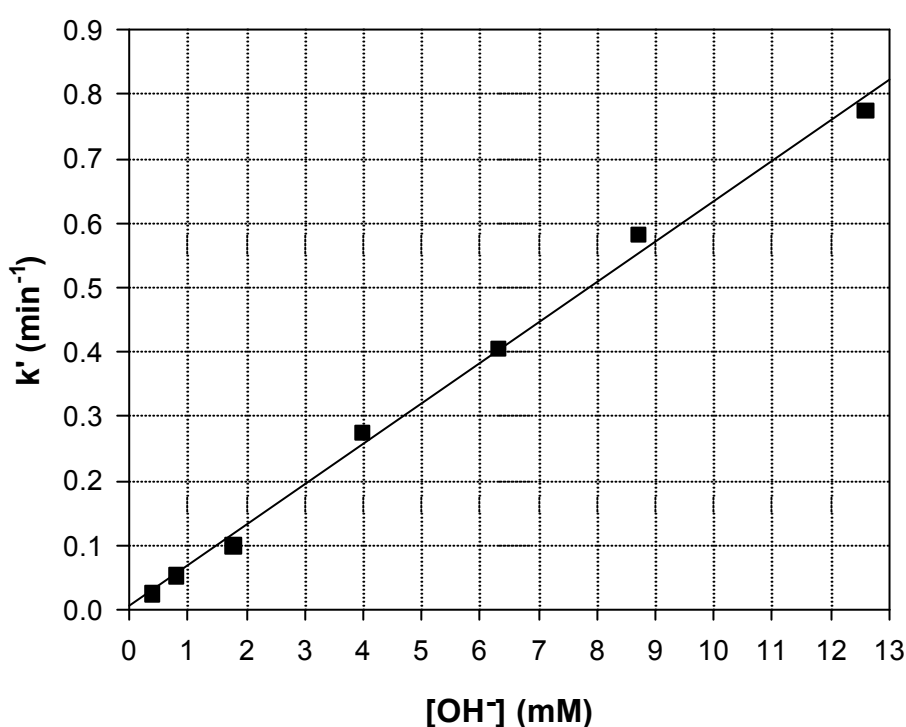


Figura 15.4. Dependencia lineal de la constante k' con la concentración de hidroxilos.

15.2. Experimentos realizados con soluciones de sustancia A preparadas por TLC preparativa.

15.2.1. Metodología.

En otro grupo de experimentos, se utilizaron soluciones de la sustancia **A** extraída de corridas de TLC preparativa. Este procedimiento fue explicado en la sección 7.4.2. Para

obtener estas soluciones se sembraron en banda soluciones de ácido fólico de pH=10, irradiadas en tubo de ensayo (15 a 20 ml) durante 60 minutos y luego concentradas a presión reducida. Se usaron placas de DEAE-celulosa (250 μ m) (Baker) y celulosa con indicador fluorescente (250 μ m) (Sigma). Solución acuosa de NH₄Cl 3%(p/v) fue empleada como fase móvil y como solvente de extracción. Mediante esta técnica se obtienen soluciones de la sustancia **A** de concentración suficientemente alta como para poder registrar espectros de absorción adecuados para realizar el estudio cinético.

Al igual que en el grupo de experimentos de la sección anterior, para iniciar la reacción térmica se mezclaron alícuotas de estas soluciones con soluciones de buffer fosfatos de pH conocido. En este caso, debido a la alta concentración de iones amonio de las soluciones de la sustancia **A**, se trabajó con soluciones reguladoras más concentradas (0,1 M). Aún así, el pH de la mezcla fue en todos los casos significativamente menor al pH original de las soluciones reguladoras.

Debido a esto, el pH se midió inmediatamente después de la mezcla. Además, una vez completada la reacción, se volvió a controlar el pH. En ningún caso hubo diferencia entre ambos valores de pH. En los experimentos realizados empleando la técnica de flujo detenido, el pH inmediatamente después de la mezcla no puede ser medido. Por lo tanto, en estos casos se tomó el pH sobre las soluciones recogidas luego de los disparos (mezclas), es decir, después de finalizar el experimento.

15.2.2. Análisis cinético de los resultados.

En la figura 15.5 se muestra la evolución del espectro de una solución de la sustancia **A**, extraída como se explicó en la sección anterior, luego de ser mezclada con una solución reguladora. Estos cambios espectrales se deben, a la reacción térmica de conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. En la figura 15.5.b se muestran los espectros DE para distintos tiempos luego de la alcalinización.

Una observación importante que puede hacerse es que, si bien los espectros registrados en la figura 15.5 son muy distintos a los mostrados en la figura 15.1, los espectros DE son similares, lo cual es una evidencia más que corrobora que la reacción térmica es la conversión de la sustancia **A** en la sustancia **B**. Las diferencias de los espectros de absorción se deben, obviamente, a que en la solución del experimento de la figura 15.1 están presentes, además de estas dos sustancias, restos de ácido fólico y los otros productos que se generan en la fotólisis

directa (6-formilpterina, 6-carboxipterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico). En la figura 15.6 se muestran espectros DEN de ambos tipos de experimentos y puede apreciarse que, dentro del error experimental, son iguales.

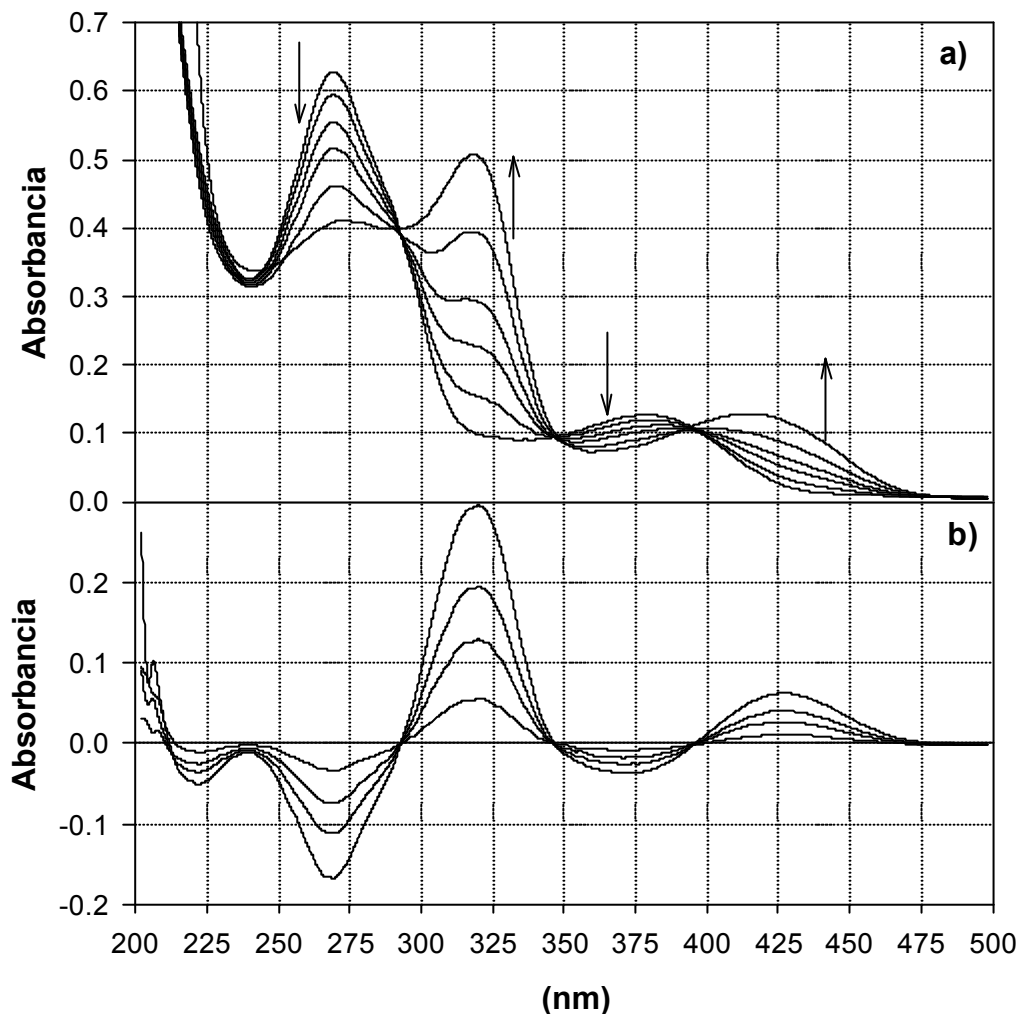


Figura 15.5. a) Evolución del espectro de una solución de sustancia A alcalinizada a pH 9,45 con un buffer de fosfatos. El tiempo 0 corresponde al momento de la alcalinización. Los espectros mostrados corresponden a los siguientes tiempos: 0; 20; 59; 104; 215 min y 48 horas. Las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

Se procedió de la misma manera como se hizo con el otro grupo de experimentos; es decir, para distintas condiciones de pH, se tomaron espectros a distintos tiempos a partir del momento de la mezcla de la solución de sustancia A con la solución reguladora. Posteriormente se realizaron gráficas de la absorbancia como una función del tiempo para distintas longitudes de onda y se llevó a cabo el análisis cinético de las mismas.

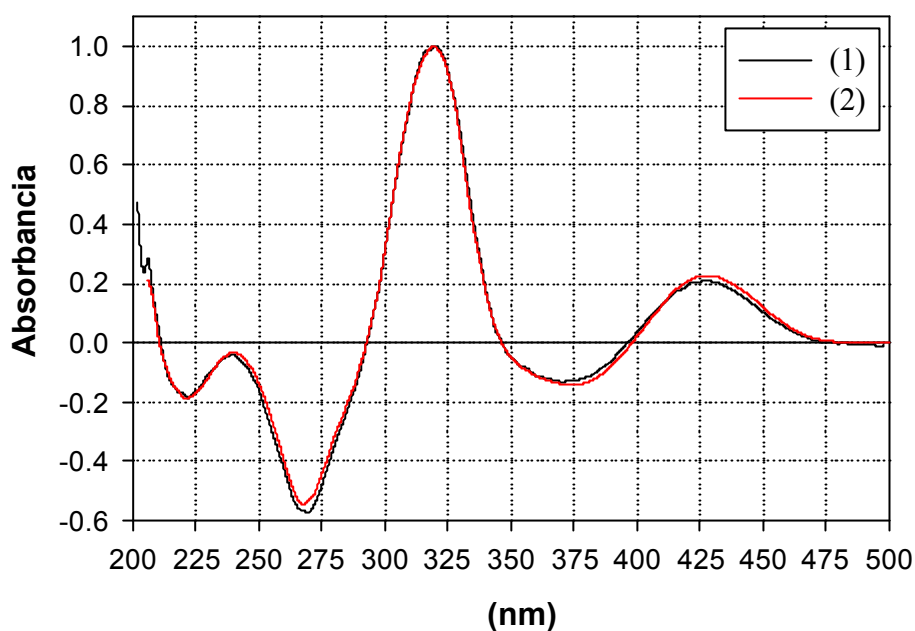


Figura 15.6. Comparación de espectros DEN obtenidos con los dos tipos de experimentos detallados en el texto. (1) espectro obtenido del experimento mostrado en la figura 15.5 ($t=104$ min.) (realizado con solución de la sustancia A obtenida por separación en TLC). (2) espectro obtenido del experimento mostrado en la figura 15.1 ($t=48,6$ min.) (experimento realizado con solución fotolizada de ácido fólico).

Como era de esperar, se encontró que el proceso se ajustaba a una cinética de primer orden y que las constantes cinéticas aparentes (k') eran independientes de la longitud de onda. En la figura 15.7 se muestra, a modo de ejemplo, una de las gráficas analizadas. Se llevaron a cabo cuatro experimentos cada uno de los cuales se realizó a un determinado pH. En la tabla 15.2 se listan los promedios de k' obtenidos.

En la figura 15.8 se muestra una gráfica en la cual fueron incluidos los valores de k' obtenidos en ambos grupos de experimentos. Puede apreciarse que la correlación entre ambos es muy buena. Asimismo, el valor de k , obtenido de esta gráfica ($62,8 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$) es prácticamente igual al obtenido analizando únicamente los datos del primer grupo de experimentos ($63,0 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$). Estos resultados muestran, por otra parte, que las demás sustancias presentes en las soluciones de ácido fólico irradiadas no afectan la velocidad de la reacción estudiada.

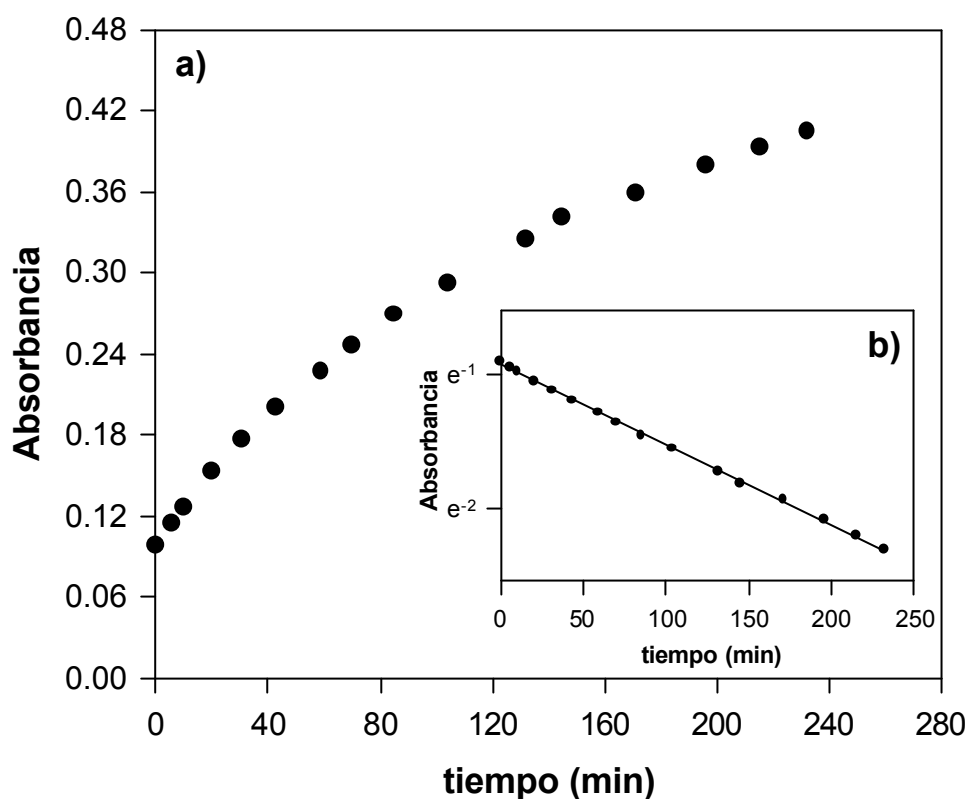


Figura 15.7. Análisis cinético del experimento mostrado en la figura 15.5. a) Absorbancia vs. tiempo a 320 nm. b) Se muestra el comportamiento cinético de primer orden.

pH	$[\text{OH}^-]$ (M)	k' (min^{-1})
8,48	$3,02 \times 10^{-6}$	$4,47 \times 10^{-3}$
9,45	$2,82 \times 10^{-5}$	$6,51 \times 10^{-3}$
10,50	$3,16 \times 10^{-4}$	$2,65 \times 10^{-2}$
10,98	$9,55 \times 10^{-4}$	$8,32 \times 10^{-2}$

Tabla 15.2. Constantes cinéticas obtenidas en experimentos realizados a distinto pH, con solución de la sustancia A obtenida mediante TLC. Cada valor es el resultado de promediar, al menos, diez constantes correspondientes a distintas .

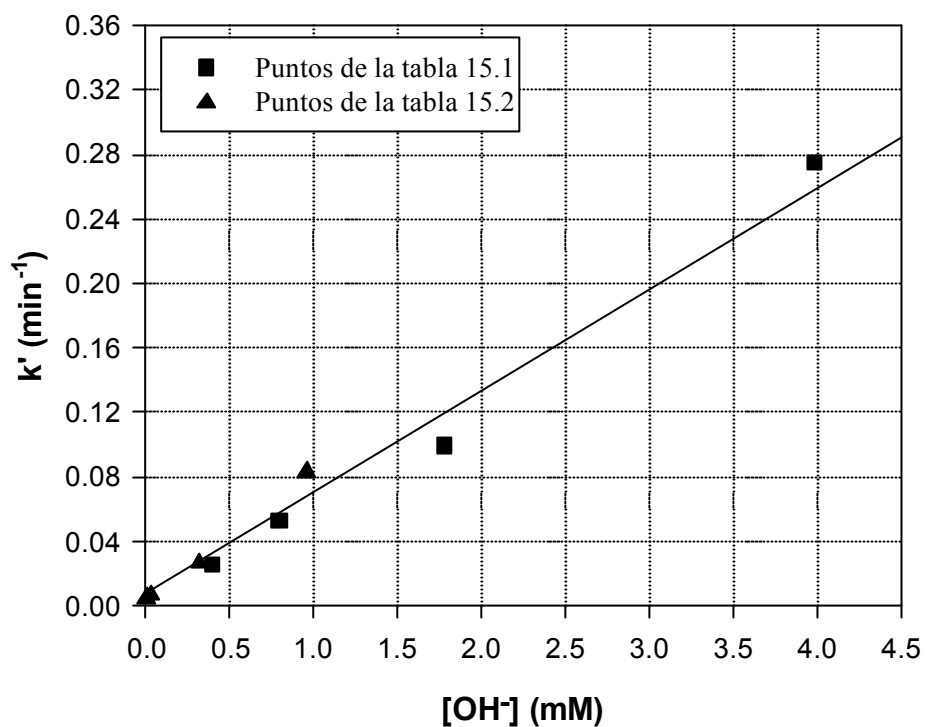


Figura 15.8. Dependencia lineal de la constante k' con la concentración de hidroxilos. La regresión lineal fue realizada con todos los puntos utilizados en la regresión de la figura 15.4 (incluso los que no aparecen en esta gráfica), más los datos de la tabla 15.2.

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.

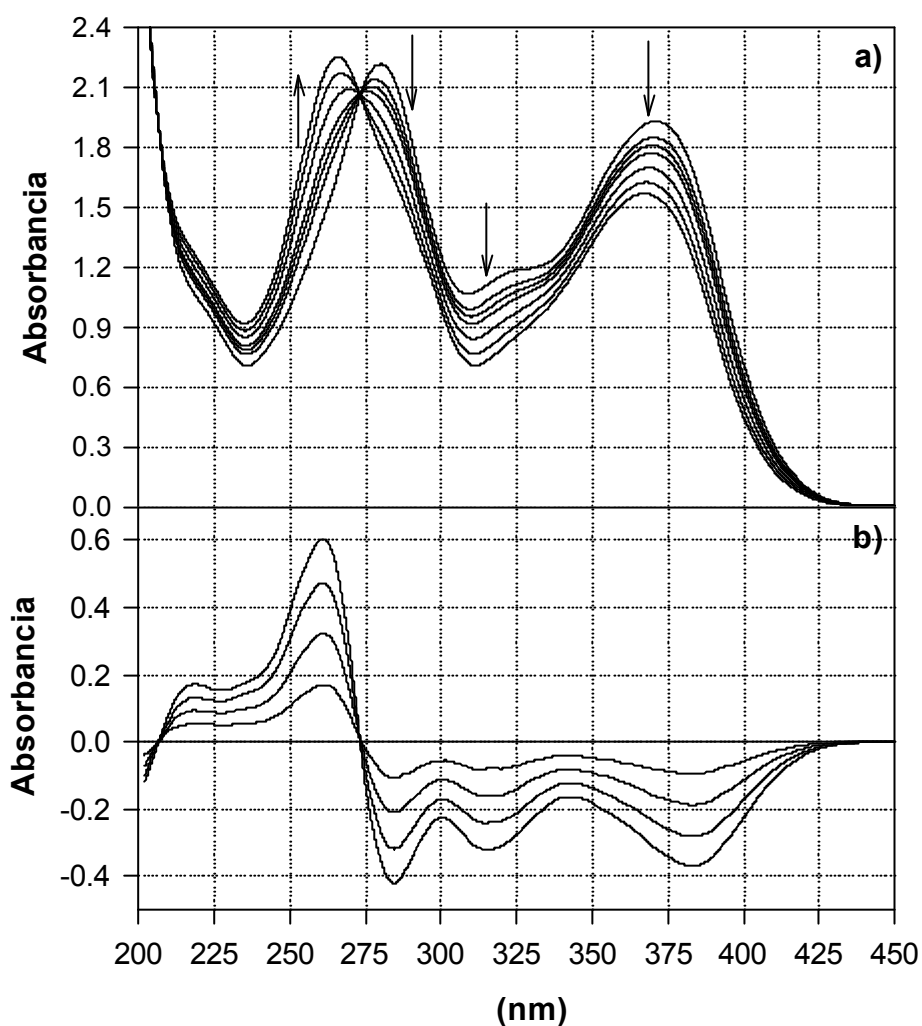


Figura 16.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (150 M, pH= 11,0) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 4 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes.

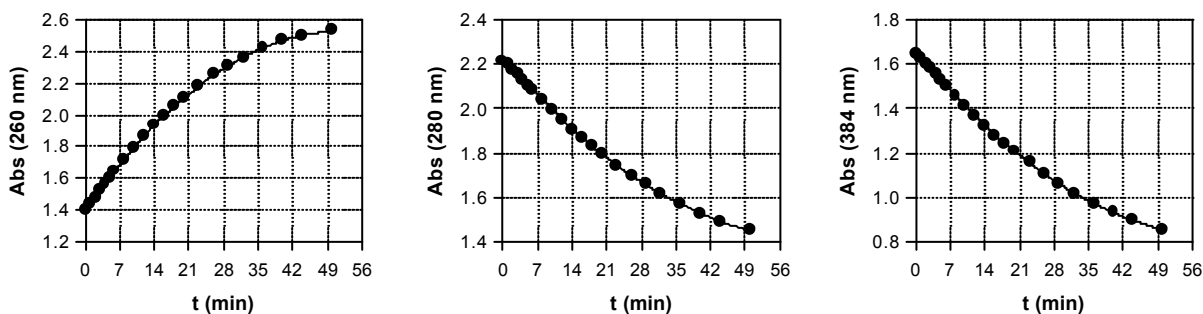


Figura 16.2. Variación con el tiempo de irradiación de la absorbancia a distintas longitudes de onda de una solución de 6-formilpterina (150 M, pH=11,0).

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.

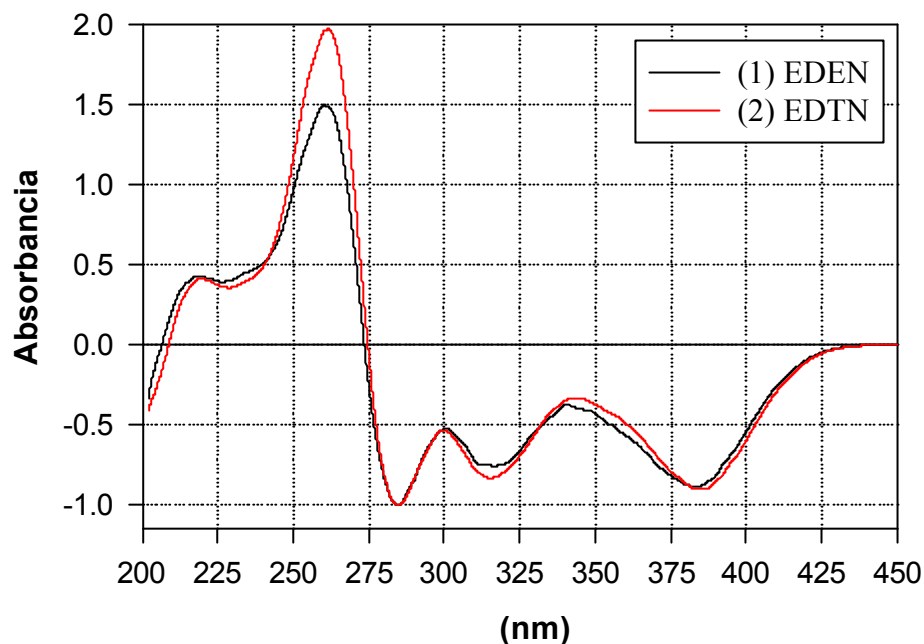


Figura 16.3. Comparación de espectros diferencia normalizados a 280 nm. (1) Espectro DEN ($t=10$ min). (2) Espectro DTN obtenido a partir de sendas soluciones (100 M , $\text{pH}=11$) de 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

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.

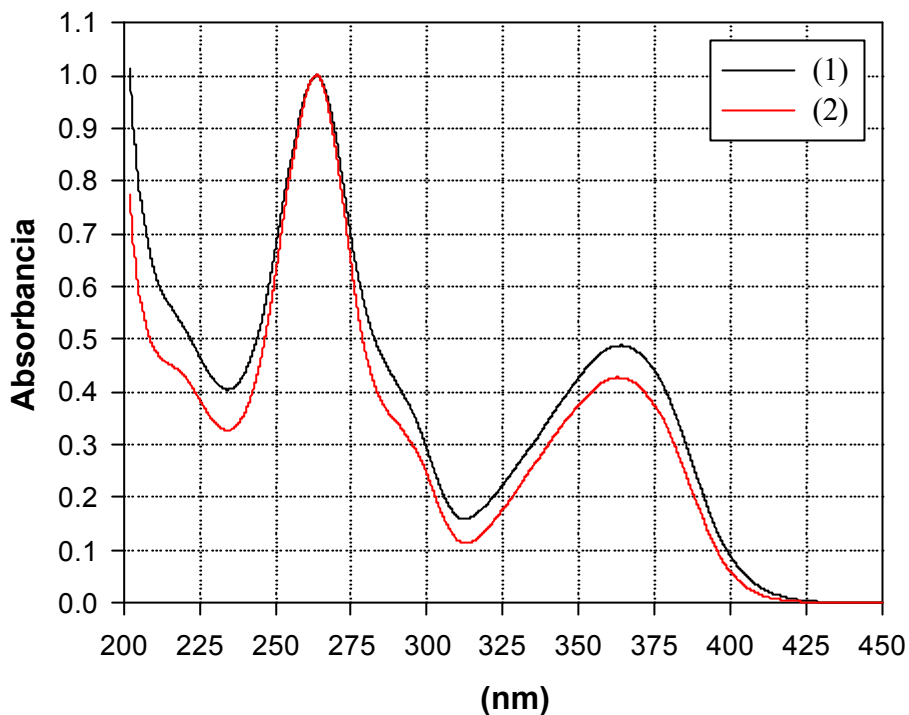


Figura 16.4. (1) Espectro normalizado de una solución de 6-formilpterina irradiada 50 min. (2) Espectro normalizado de una solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 5,7).

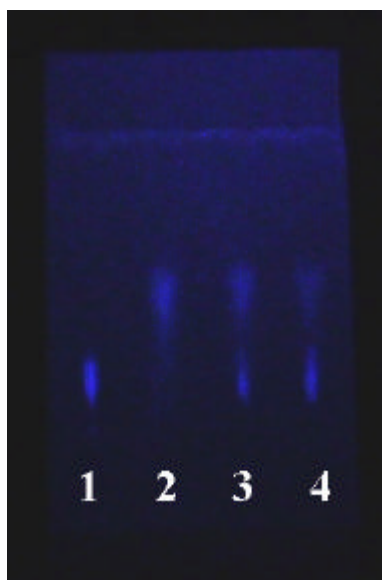


Figura 16.5. Corrida de TLC. Calles: 1, solución de 6-carboxipterina 150 M; 2, solución de 6-formilpterina 200 M; 3 y 4, solución de 6-formilpterina 150 M (pH= 11,0) irradiada 10 y 20 min, respectivamente.

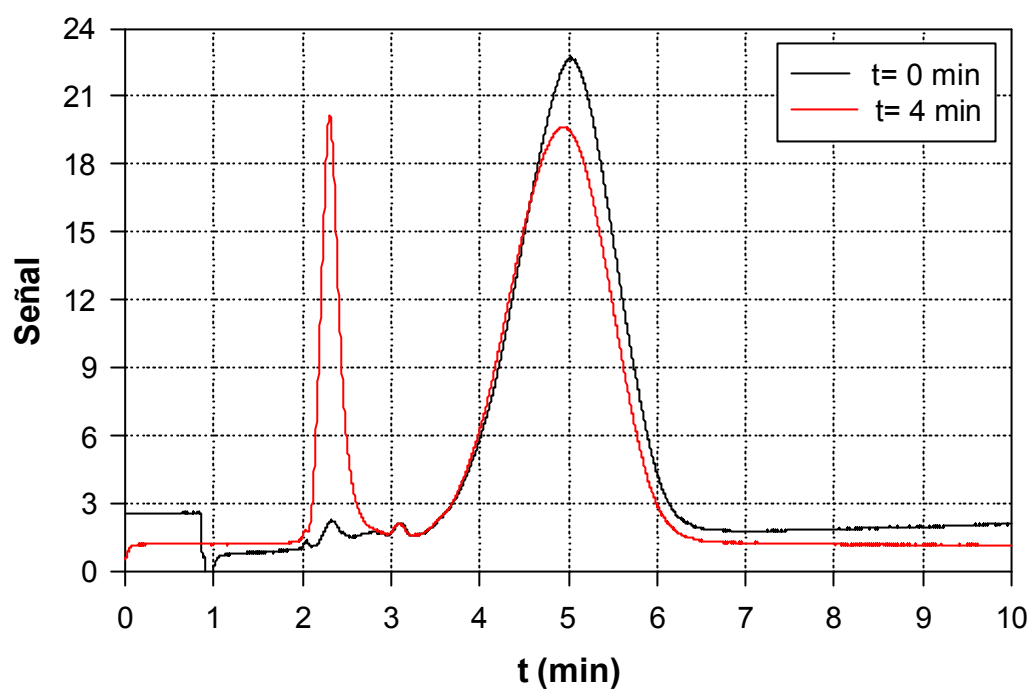


Figura 16.6. Cromatogramas. Solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 11,0) irradiada con luz UV-A de $\lambda = 350$ nm. λ de análisis= 340 nm.

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

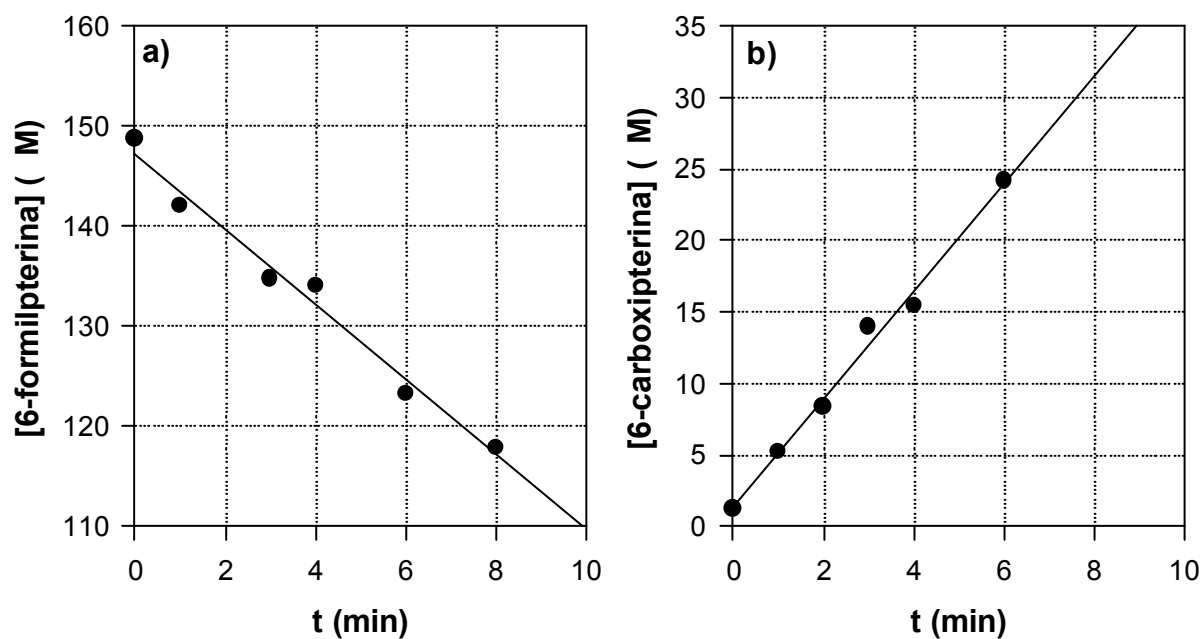


Figura 16.7. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina 150 μ M y pH= 11,0. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC.

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.

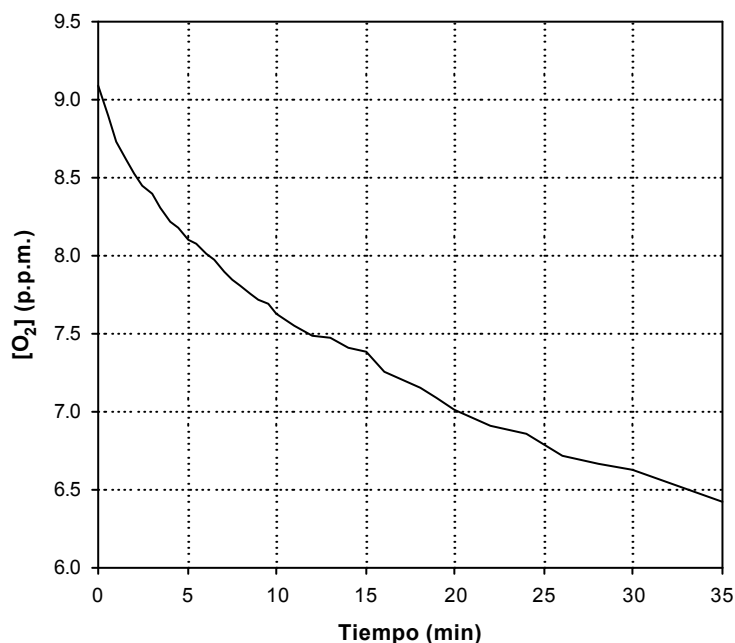


Figura 16.8. Evolución de la concentración de O_2 durante la irradiación de una solución de 6-formilpterina 150 M ($\text{pH}=11,0$).

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.

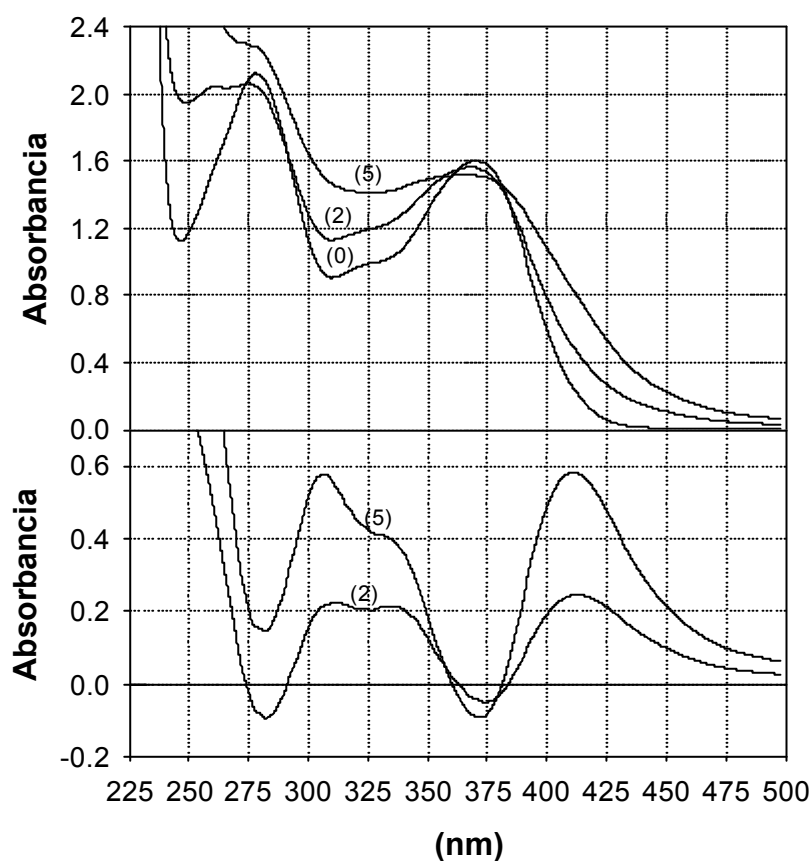


Figura 16.9. a) Evolución del espectro de una solución que contiene 6-formilpterina (125 M) y alcohol furfurílico (10 mM) al ser irradiada (pH= 11,0). Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE correspondientes. Entre paréntesis figuran los tiempos, en minutos, correspondientes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

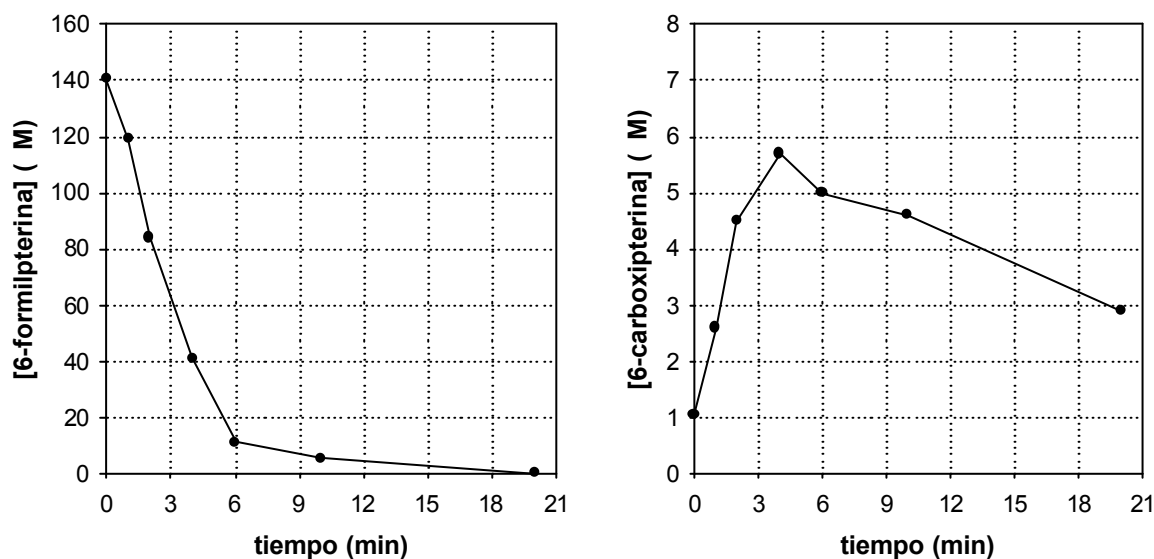


Figura 16.10. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina (140 M, pH= 11,0) en presencia de alcohol furfurílico (10 mM). Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC.

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 furfúrico. 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 furfúrico 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.

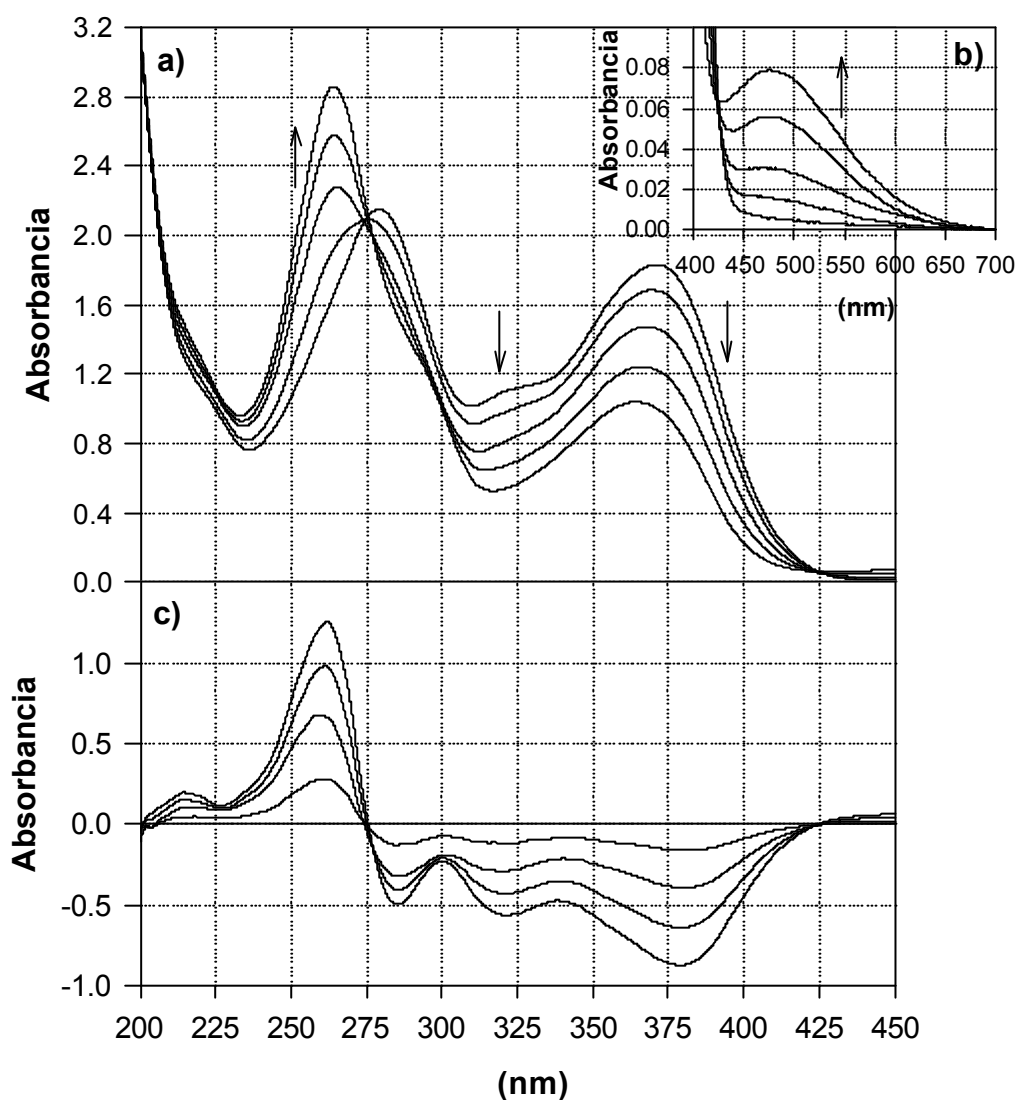


Figura 16.11. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-formilpterina (150 M, pH= 11,0) al ser irradiada en ausencia de O₂. Los espectros fueron tomados a los 0, 4, 9, 17 y 33 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. 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 O₂ 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.

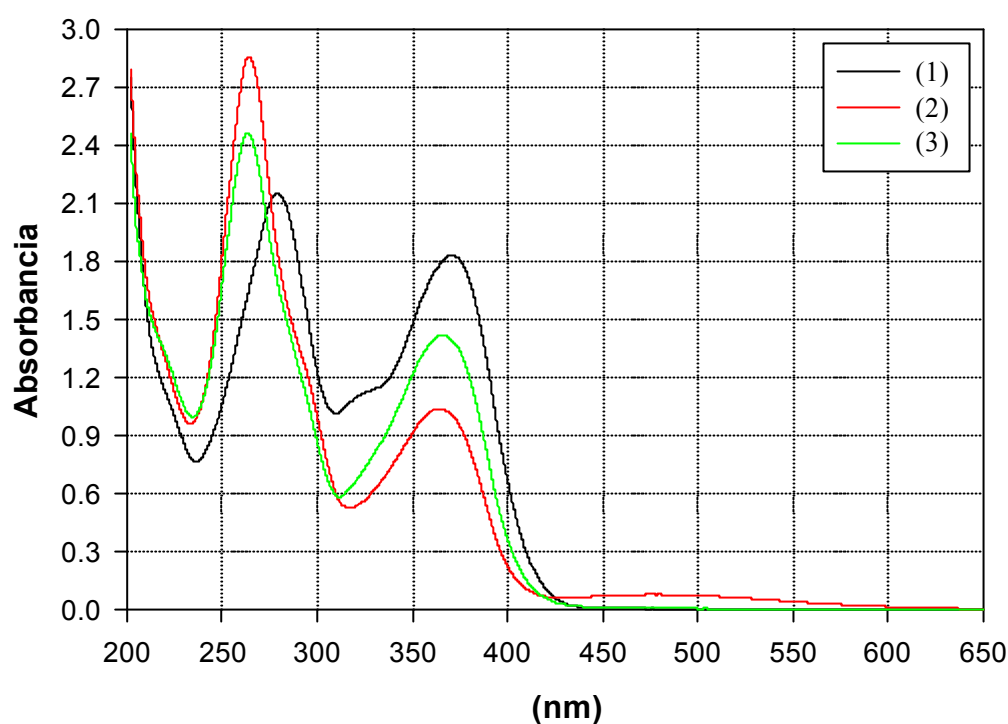


Figura 16.12. Fotólisis de una solución de 6-formilpterina (150 M , $\text{pH}=11,0$). Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. (1) Espectro de la solución original no irradiada. (2) Espectro de la solución irradiada 33 minutos en ausencia de O_2 . (3) Espectro de la solución irradiada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

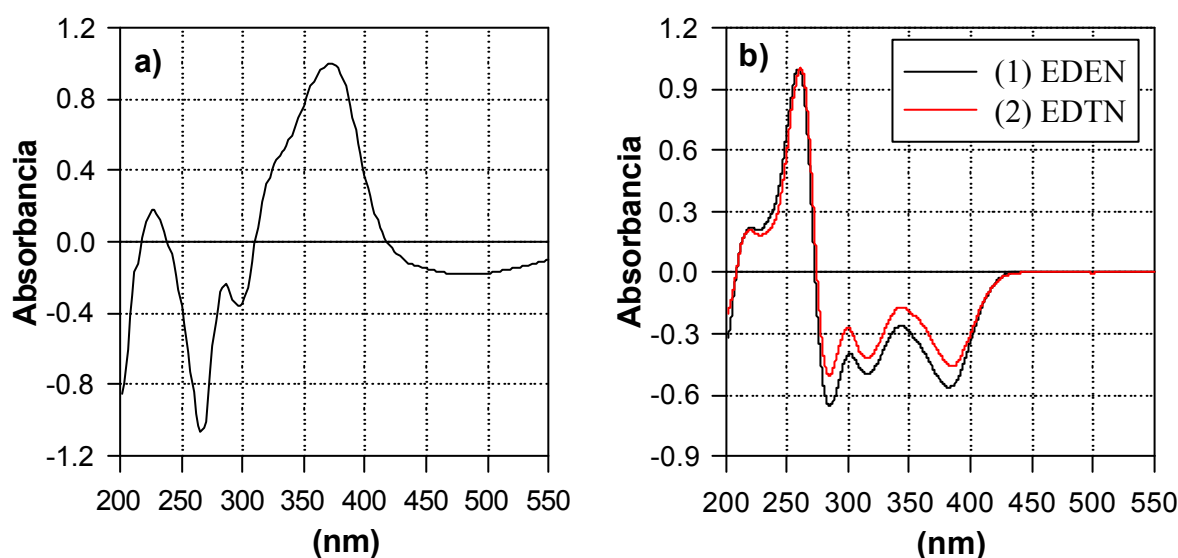


Figura 16.13. a) Espectro EDN obtenido entre los espectros 2 y 3 de la figura 16.12. b) (1) Espectro EDN obtenido entre los espectros 1 y 3 de la figura 16.12. (2) Espectro DTN obtenido a partir de soluciones patrones (100 M , $\text{pH}=11$) de 6-formilpterina y 6-carboxipterina.

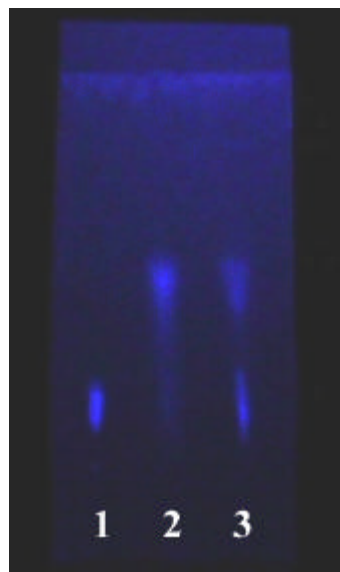


Figura 16.14. Corrida de TLC. Calles: 1, solución patrón de 6-carboxipterina 200 μ M; 2, solución patrón de 6-formilpterina 150 μ M; 3, solución de 6-formilpterina 150 μ M (pH= 11,0) irradiada, en ausencia de O_2 33 min. y luego aireada.

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.

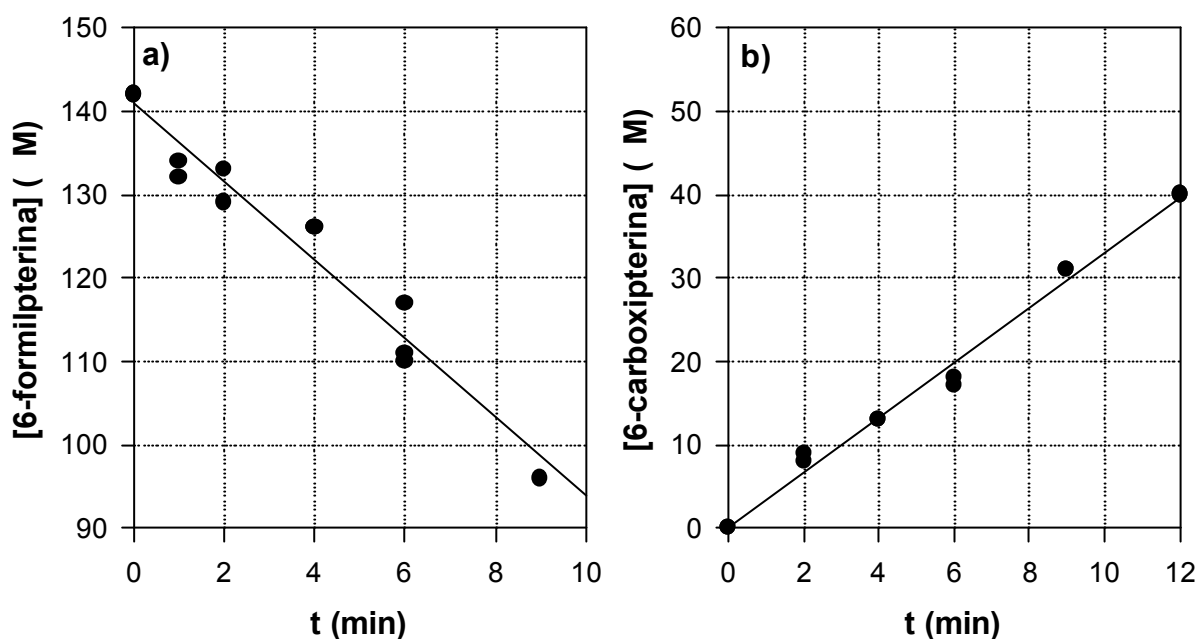


Figura 16.15. Evolución de las concentraciones de 6-formilpterina (a) y 6-carboxipterina (b), determinadas por HPLC, durante la fotólisis de una solución de 6-formilpterina (140 M y pH= 11,0) en ausencia de O₂.

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.

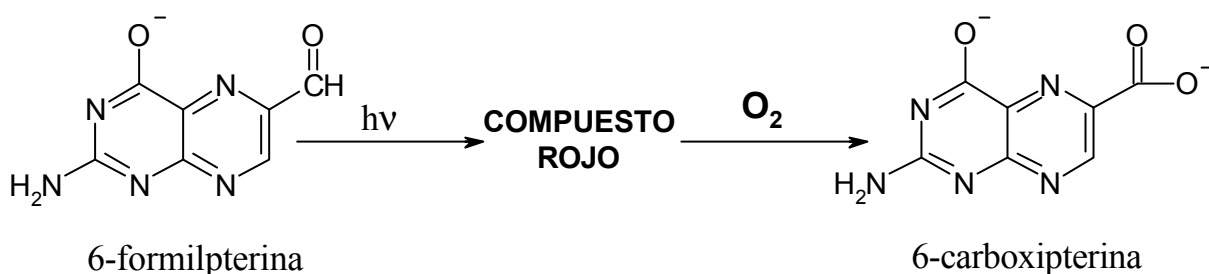


Figura 16.16. Fotólisis de 6-formilpterina.

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_2 , 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_2 .

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.

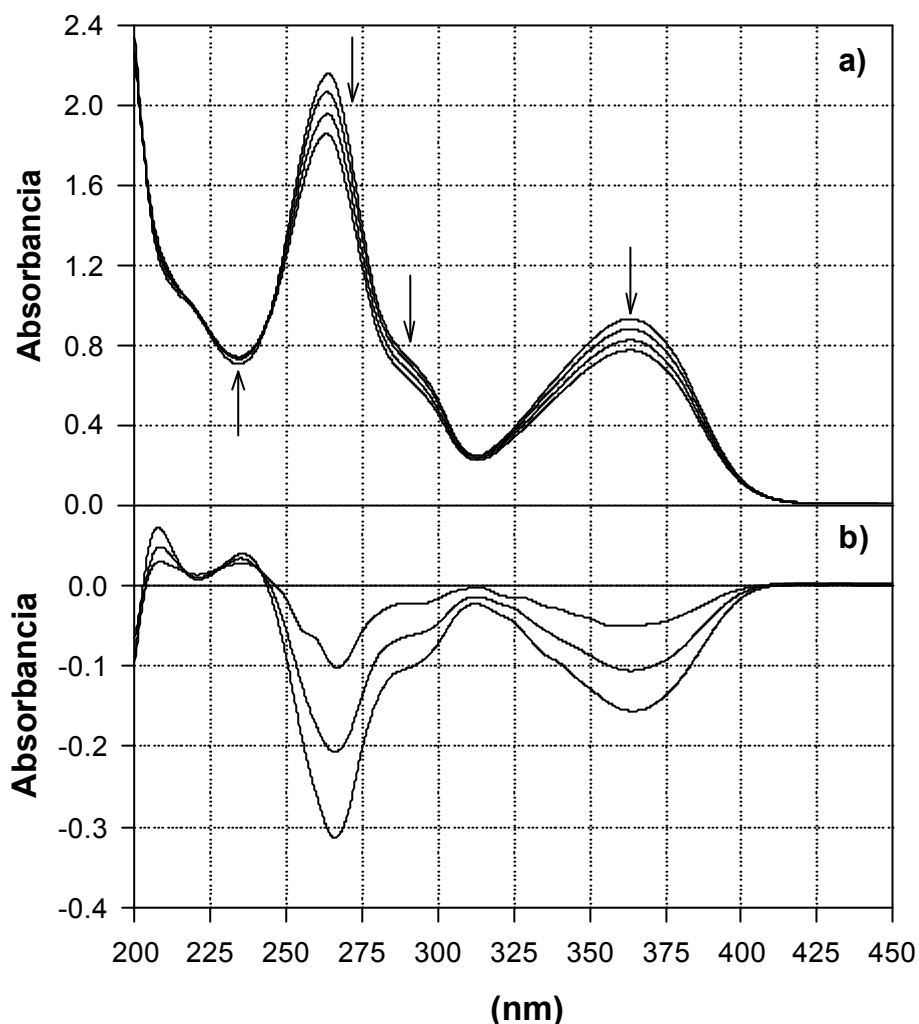


Figura 17.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 11,0) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 30 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros 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.

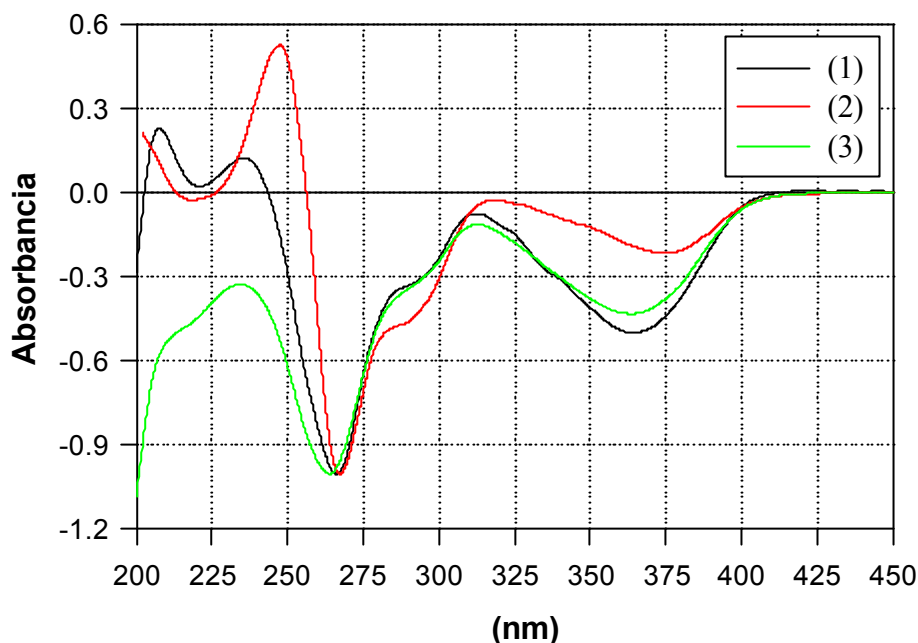


Figura 17.2. (1) Espectro DEN obtenido luego de fotolizar durante 90 min una solución de 6-carboxipterina (100 M , $\text{pH}= 11,0$) en presencia de O_2 . (2) Espectro DTN obtenido a partir de los espectros de una solución de pterina 100 M ($\text{pH}= 11,0$) y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración 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 substrarse 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 μ 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 μ M (pH= 11,0) irradiada 150 min; 2, solución de pterina 100 μ M; 3, solución de 6-carboxipterina 200 μ 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.

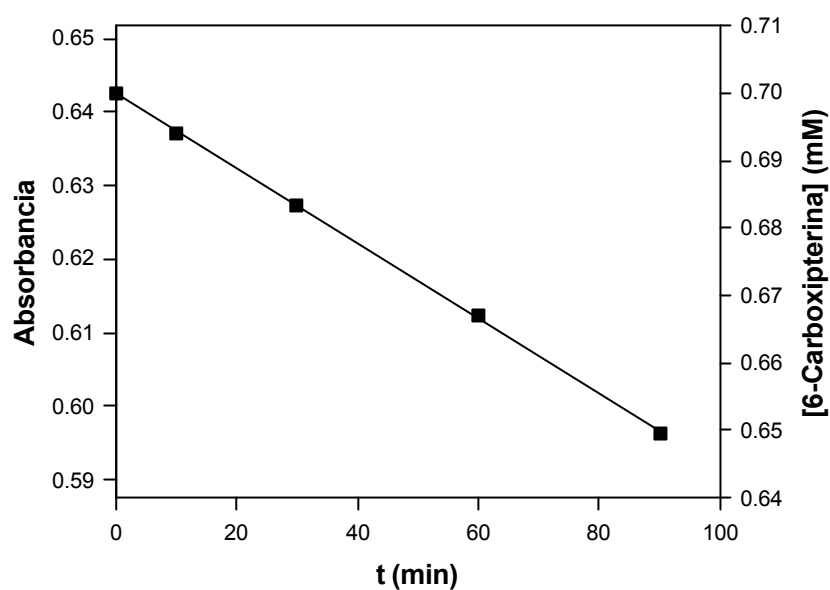


Figura 17.4. Evolución de la absorbancia a 364 nm y de la concentración, de una solución 700 M (pH= 11,0) en un experimento realizado para determinar el rendimiento cuántico. Camino óptico de irradiación: 10 mm; camino óptico para medir la absorbancia: 2 mm.

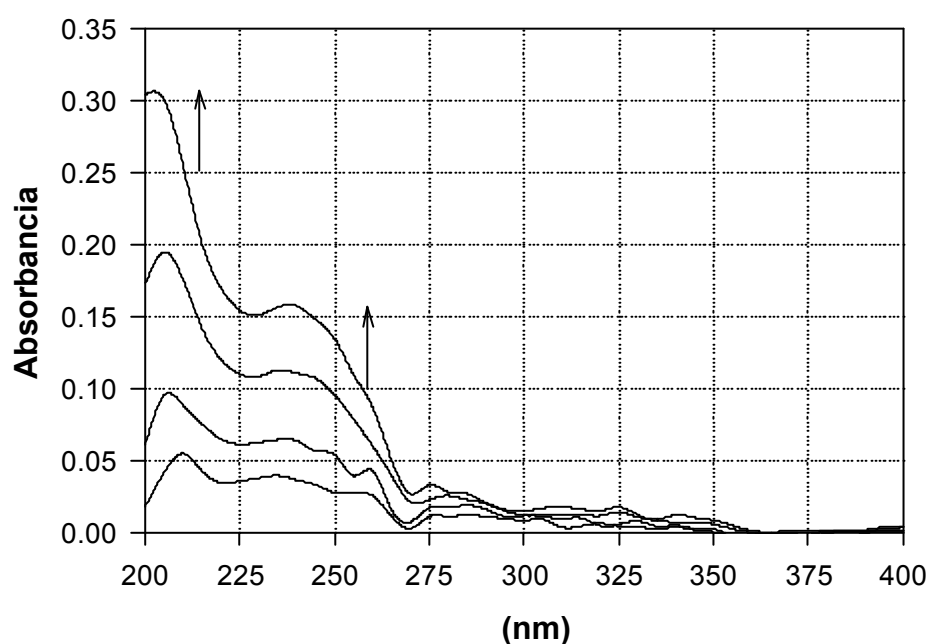


Figura 17.5. Espectros de los productos de fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 100 M (pH= 11,0) a distintos tiempos de irradiación. Los espectros corresponden a los siguientes tiempos: 15, 30, 60 y 90 min. Las flechas indican el sentido del cambio.

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.

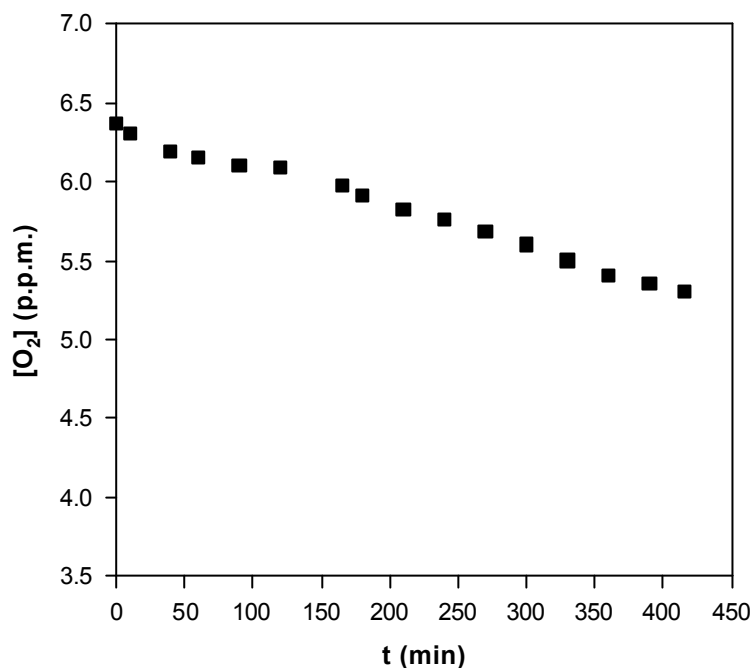


Figura 17.6. Disminución en la concentración de O_2 disuelto durante la fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 200 M (pH= 11,0).

Considerando el descenso de absorción a 364 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 min de fotólisis un descenso en la concentración de 6-carboxipterina de $2,47 \times 10^{-5} M$. Por su parte, el descenso de la concentración de O_2 medido para la misma solución fue de $2,72 \times 10^{-5} M$. 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 O₂.

Cuando se irradia una solución alcalina de 6-carboxipterina, previamente burbujeadada con N₂, no se aprecian cambios espectrales en ninguna región del espectro UV-visible. Estos resultados se observan en la figura 17.7.

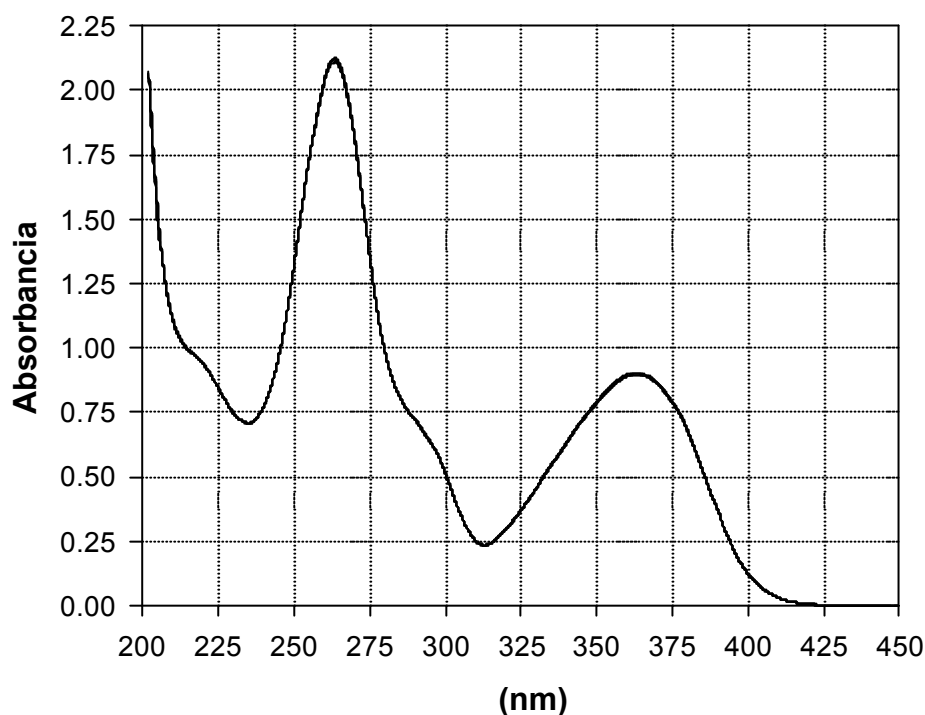


Figura 17.7. Espectros de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 M, pH= 11,0) a distintos tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 min durante 3 horas. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación.

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_2 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.

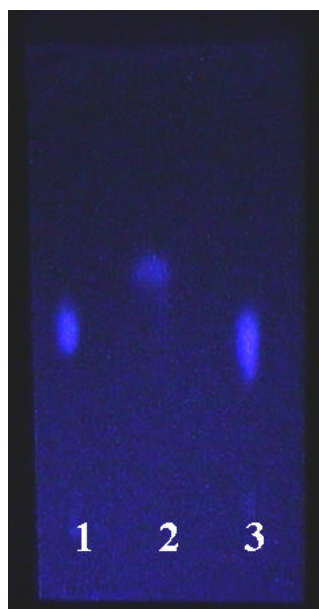


Figura 17.8. Corrida de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 200 μ M (pH= 11,0) irradiada 150 min; 2, solución de pterina 100 μ M; 3, solución de 6-carboxipterina 200 μ M.

17.3. Fotólisis de pterina.

En un experimento de fotólisis, realizado en presencia de O_2 , 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 O₂, 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 importante cambios químicos en la estructura de doble anillo.

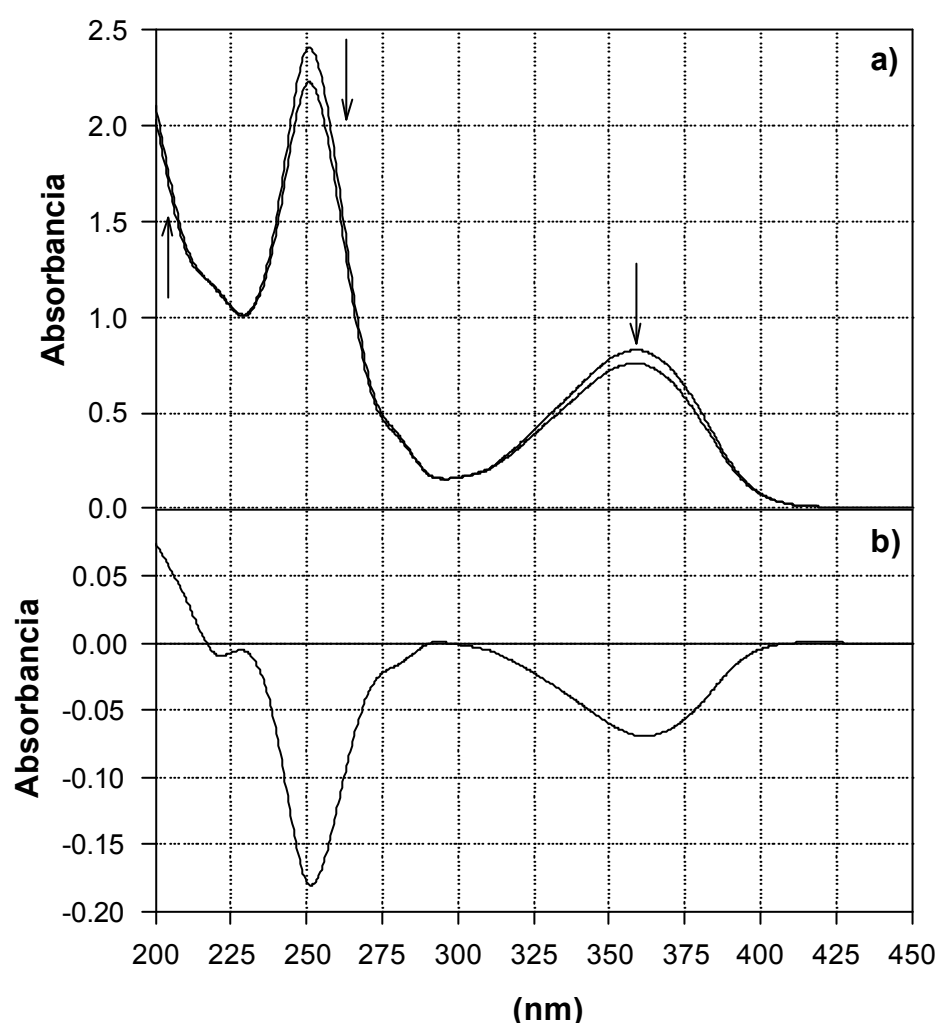


Figura 17.9. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de pterina (125 M, pH=11,0) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados a tiempo 0 y 220 min y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectro DE correspondiente.

Las soluciones de pterina irradiadas en presencia de O₂ fueron analizadas aplicando la técnica TLC. Se realizaron corridas cromatográficas empleando como solvente de corrida solución acuosa de NH₄Cl 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.

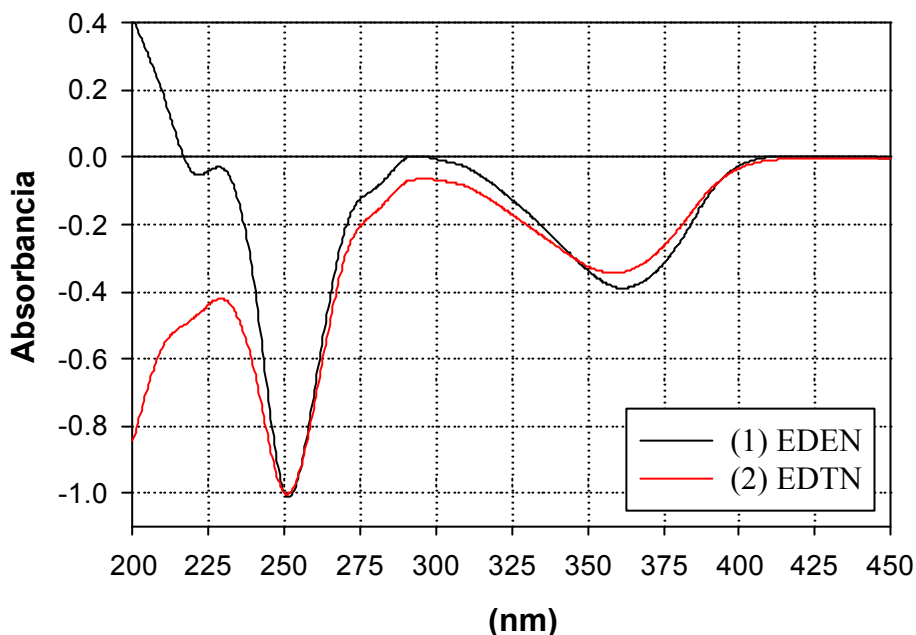


Figura 17.10. (1) Espectro DEN obtenido luego de fotolizar durante 221 min una solución de pterina (pH= 11,0) en presencia de O₂. (2) Espectro DTN correspondiente a un proceso en el cual los productos no absorben luz en el rango del espectro analizado.

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 µM/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.

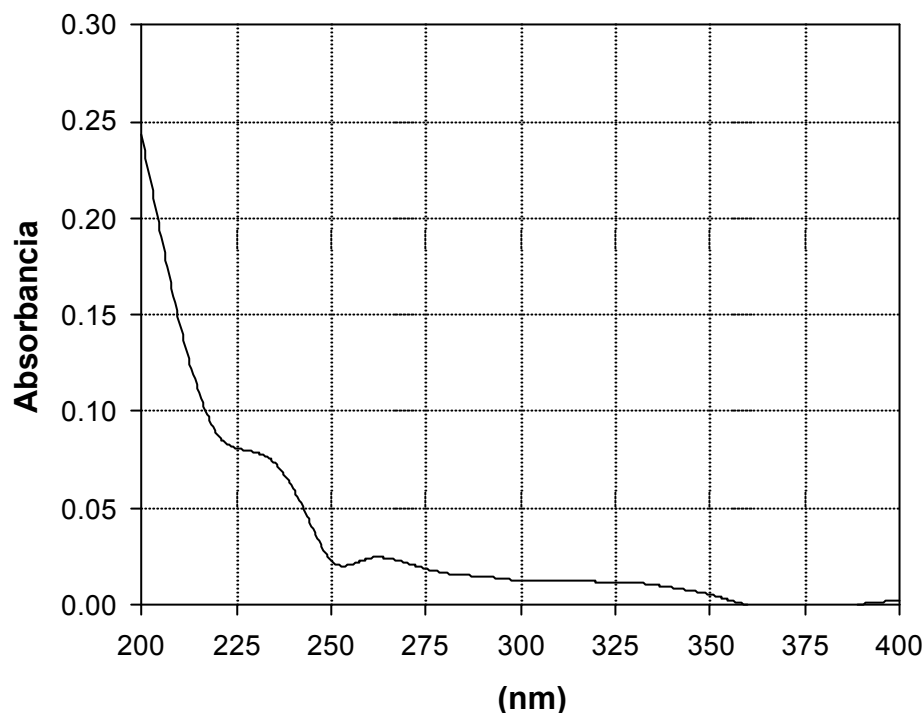


Figura 17.11. Espectro de los productos de fotólisis de una solución de pterina (pH= 11,0) irradiada durante 221 min.

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 μM 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 O₂ 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 existentes.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de Tesis se ha estudiado la fotoquímica en solución acuosa de un grupo de derivados pterínicos y la información obtenida permite realizar algunas generalizaciones y caracterizar su comportamiento fotoquímico general. Al final de esta sección se presenta un esquema que incluye todas las reacciones analizadas, junto con parte de la información relevante obtenida para cada una de ellas.

- Todos los compuestos estudiados comparten, como estructura común, el doble anillo de pterina. Esta estructura presenta, en solución acuosa y a valores de pH comprendidos entre 3 y 14, dos formas ácido-base. El equilibrio entre estas dos formas involucra un equilibrio entre un grupo amida y un grupo fenolato, con un pKa de aproximadamente 8. Las dos formas ácido-base de cada compuesto muestran comportamientos fotoquímicos diferentes.

- Excepto la pterina, los demás derivados analizados presentan sustituyentes en la posición 6 del doble anillo. Casi todas las reacciones estudiadas son transformaciones químicas localizadas en estos sustituyentes, manteniéndose intacta la estructura del doble anillo.

- Un grupo de reacciones que modifican la estructura de los mencionados sustituyentes consiste en fotooxidaciones en las cuales el O₂ disuelto en el medio oxida el átomo de carbono unido al átomo C-6 del doble anillo. Este es el caso, por ejemplo, de las reacciones de fotólisis del ácido fólico para transformarse en 6-formilpterina y ácido *p*-aminobenzoilglutámico y la fotooxidación de ésta última para formar 6-carboxipterina. Ambas reacciones se producen tanto en medio ácido como en medio alcalino. No obstante, las dos reacciones transcurren a través de mecanismos muy distintos.

- En la primera participa el ¹O₂ como intermediario reactivo generado tanto por el ácido fólico como por la 6-formilpterina. Además, como este último compuesto presenta una mayor eficiencia en la producción del intermediario que el propio reactivo, en la fotólisis de ácido fólico se observa una aceleración de la reacción a medida que avanza el tiempo de irradiación.

- La forma alcalina del ácido fólico se descompone fotoquímicamente no sólo transformándose en 6-formilpterina, sino también a través de otra vía. Esta segunda reacción también es una fotooxidación en la cual participa el ¹O₂ como intermediario reactivo. Sin embargo, no se produce la ruptura de la molécula, siendo el producto (denominado arbitrariamente sustancia **A**) un compuesto de mayor peso molecular que el reactivo.

- La sustancia **A** es fotoestable, pero se transforma térmicamente a otra sustancia (denominada arbitrariamente **B**). La cinética de esta reacción es fuertemente dependiente del

pH. En efecto, mientras la sustancia A es estable en medio neutro o ácido, se descompone en medio alcalino, mostrando su velocidad una dependencia lineal con la concentración de iones hidroxilos.

- El ácido fólico, por su estructura, podría sufrir reacciones de degradación fotoquímica siguiendo un mecanismo Norrish tipo II. Este tipo de reacciones, estudiadas para otros compuestos relacionados, tales como la biopterina y la neopterina, ocurren en ausencia de O₂. Sin embargo, en este trabajo de tesis se ha demostrado que el ácido fólico es fotoestable, en condiciones anaeróbicas, tanto en medio ácido como en medio alcalino.

- La transformación de 6-formilpterina a 6-carboxipterina no ocurre a través de un mecanismo similar. Por el contrario, esta reacción ocurre en dos etapas. En la primera no participa el O₂ ni ningún derivado activado del mismo, siendo, en realidad, una reacción de isomerización. En la segunda etapa el isómero de la 6-formilpterina reacciona con el O₂ para dar 6-carboxipterina. Si bien este mecanismo de reacción es el mismo, en medio ácido el rendimiento cuántico de la reacción es mayor que en medio alcalino.

- La 6-carboxipterina es un caso particular en el cual el reactivo posee un sustituyente en la posición 6, que no puede ser oxidado por tratarse de un grupo carboxílico. La forma ácida de este compuesto sufre una reacción fotoquímica de decarboxilación para producir pterina, mientras que la forma alcalina no presenta este comportamiento. Esta reacción es independiente del O₂.

- Por otro lado, ambas formas ácido-base de la 6-carboxipterina sufren reacciones de fotólisis en las cuales la estructura del doble anillo de pterina se modifica drásticamente con la participación del O₂. Los rendimientos cuánticos de estos procesos son mucho menores que los de aquellos en los que el ataque del O₂ se produce sobre los sustituyentes.

- La pterina, por su parte, se degrada en presencia de O₂, tanto en medio ácido como en medio alcalino. Estas reacciones, al igual que las observadas para 6-carboxipterina, implican la modificación de la estructura del doble anillo de pterina.

- La pterina es fotoestable a la luz UV-A en ausencia de O₂. En tales condiciones anaeróbicas, la 6-carboxipterina presenta un comportamiento similar en medio alcalino, mientras que en medio ácido, sufre la reacción de decarboxilación, pero no la reacción en la cual se modifica el doble anillo de pterina. Puede concluirse que esta estructura se degrada fotoquímicamente sólo si el O₂ está presente en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaron J. J. y Winefordner J. D. (1972) *Talanta*, **19**, 21.
- Acheson R. M., Hoult T. G. y Barnard K. A. (1954) *J. Chem. Soc.*, 4142.
- Albert A. (1952) *Quart. Reviews*, **6**, 197.
- Albert A. (1953) *Biochem. J.*, **54**, 646.
- Albert A. (1955) *J. Chem. Soc.*, 2690.
- Albert A. (1968) en “Heterocyclic Chemistry. An Introduction”, The Athlone Press, Segunda Edición.
- Albert A. y Barlin G. B. (1962) *J. Chem. Soc.*, 3129.
- Albert A., Batterham y McCormack (1966) *J. Chem. Soc.*, B, 1105.
- Albert A. y Brown D. J. (1953) *J. Chem. Soc.*, 74.
- Albert A. y Brown D. J. (1954) *J. Chem. Soc.*, 2060.
- Albert A., Brown D. J. y Cheeseman G. (1951) *J. Chem. Soc.*, 474.
- Albert A., Brown D. J. y Cheeseman G. (1952) *J. Chem. Soc.*, 1620.
- Albert A., Brown D. J. y Wood H. C. S. (1956) *J. Chem. Soc.*, 2066.
- Albert A. y Howell C. F. (1962) *J. Chem. Soc.*, 1591.
- Albert A., Howell C. F. y Spinner E. (1962) *J. Chem. Soc.*, 2595.
- Albert A., Inoue Y. y Perrin M. F. (1963) *J. Chem. Soc.*, 5151.
- Albert A. y Phillips (1956) *J. Chem. Soc.*, 1294
- Albert A. y Reich F. (1961) *J. Chem. Soc.*, 127.
- Albert A. y Spinner E. (1960) *J. Chem. Soc.*, 1221.
- Albert A. y Wood H. C. S. (1952) *J. appl. Chem.*, **2**, 591.
- Anderson L. C. y Seeger N. V. (1949) *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 340.
- Angyal S. J. y Angyal C. L. (1952) *J. Chem. Soc.*, 1461.
- Angyal C. L. y Werner R. L. (1952) *J. Chem. Soc.*, 2911.
- Arndt F. (1930) *Ber.*, **63**, 2963.
- Barlin G. B. (1965) *J. Chem. Soc.*, 2260.
- Baur R., Kappel M., Mengel R. y Pfeleiderer W. (1979) “Photochemistry of Pteridines” en “Chemistry and Biology of Pteridines”. Edit., Kisliuk and Brown; Elsevier.
- Berns D. S. y Vaughn J. R. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 1094.
- Bloom E. S., Vandenbelt J. M., Binkley S. B., O’Dell B. L. y Pfiffner J. J. (1944) *Science*, **100**, 295.
- Blough N. V. y Zepp R. G. (1995) “Reactive Oxygen Species in Natural Waters” en “Active

- Oxygen in Chemistry, Vol 2”, Edit., Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A. y Liebman J. F.; Chalman & Hall.
- Brain R. D., Woodward D. O. y Briggs W. R. (1977) *Carnegie Inst. Washington Year Book*, **76**, 295.
 - Bray R. C. (1963) *Enzymes*, **7**, 533.
 - Brodhum B. y Häder D. P. (1990) *Photochem. Photobiol.*, **52**, 865.
 - Brown D. J., Hoerger E. y Mason S. F. (1955) (a) *J. Chem. Soc.*, 211; (b) *J. Chem. Soc.*, 4035.
 - Brown D. J. y Mason S. F. (1956) *J. Chem. Soc.*, 3443.
 - Brown R. D. y Coller B. (1967) *Theoretica Chimica Acta*, **7**, 259.
 - Chahidi C., Aubailly M., Momzikoff A., Bazin M. y Santus R. (1981) *Photochem. Photobiol.*, **33**, 641.
 - Christomanos A. (1967) *Prakt. Akad. Athenon*, **42**, 405.
 - Eker A. P. M., Kooliman P., Hessels J. K. C. y Yasui A. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 8009.
 - Elvidge J. A. y Jackman L. M. (1961) *J. Chem. Soc.*, 859.
 - Endicott J.F., Ferraudi G. and Barber J.R (1975) *J. Phys. Chem.*, **79**, 630.
 - Ferraudi G. J. (1988) en “Elements of Inorganic Photochemistry”; John Wiley & Sons, Inc.
 - Foote C. S. y Clennan E. L. (1995) “Properties and Reactions of Singlet Dioxygen” en “Active Oxygen in Chemistry, Vol 2”, Edit., Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A. y Liebman J. F.; Chalman & Hall.
 - Forrest H. S. y Mitchell H. K. (1955) *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4865.
 - Fuller R. C., Kidder G. W., Nugent N. A., Dewey V. C. y Rigopoulos N. (1971) *Photochem. Photobiol.*, **14**, 359.
 - Galland P, Keiner P., Dörnemann D., Senger H., Brodhun B. y Häder D. P. (1990) *Photochem. Photobiol.*, **51**, 675.
 - García Einschlag F. S. y Capparelli A. L. (2000). “Kinesim 8.5” (Obra de Software). Registro: Dirección Nacional del Derecho de Autor. Expediente N° 040958.
 - Giovanelli J., Campos K. L. y Kaufman S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 7091.
 - Gorman A. A. y Rodgers M. A. J. (1989) “Singlet Oxygen” en “CRC Handbook of Organic Photochemistry, Vol 2”, Edit., Scaiano J. C.; CRC Press, Boca Raton.
 - Goulden J. D. S. (1952), *J. Chem. Soc.*, 2939.
 - Haag W. R. y Hoigné J. (1986) *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 341.

- Haag W. R., Hoigné J., Gassman E. y Braun A. M. (1984) a) *Chemosphere*, **13**, 631. b) *Chemosphere*, **13**, 641.
- Hearn J. M., Morton R. A. y Simpson J. C. E. (1951) *J. Chem. Soc.*, 3318.
- Hearst J. E. (1995) *Science*, **268**, 1858.
- Henderson B. W. y Dougherty T. J. (1992) *Photochem. Photobiol.*, **55**, 145.
- Hevel J. M. y Marletta M. A. (1992) *Biochem.*, **31**, 7160.
- Hohl N., Galland P. y Senger H. (1992) *Photochem. Photobiol.*, **55**, 239.
- Hollaender A. y Claus W. D. (1937) *Bull. Natl. Res. Council.*, **100**, 75.
- Hopkins F. G. (1889) a) *Proc. Chem. Soc.*, **5**, 117; b) *Nature (London)*, **40**, 335.
- Hopkins, F.G. (1895) *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*, **186**, 661.
- Inoue Y. y Perrin M. F. (1963) a) *J. Chem. Soc.*, 2648. b) *J. Chem. Soc.*, 3936.
- Ito K. y Kawanishi S. (1997) *Biochemistry*, **36**, 1774.
- Johnson J. L., Hamm-Alvarez S., Payne G., Sancar G. B., Rajagopalan K. V. y Sancar A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2046.
- Kang D., Kim S. y Yim J. (1998) *Pteridines*, **9**, 69.
- Kelner A. (1949) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, **35**, 73.
- Kiewisch S. y Fukshansky L. (1991) *Photochem. Photobiol.*, **53**, 407.
- Klages F. (1949) *Chem. Ber.*, **82**, 352.
- Klemm E y Ninneman H. (1979) *Photochem. Photobiol.*, **29**, 629.
- Knappe W. R. (1977) *Z. Naturforsch.*, **32b**, 434.
- Knappe W. R. y Hemmerich P. (1976) *Liebigs Ann. Chem.*, **1976**, 2037.
- Kramer S. P., Johnson J. L., Ribeiro A. A., Millington D. S. y Rajagopalan K. V. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 16357.
- Kühn A. y Egelhaf A. (1959) *Z. Naturforsch.*, **14b**, 654.
- Lederer M. (1940) *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, **15**, 273.
- Lehniger A. L. (1985) en “Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular”, Ediciones Omega, Segunda Edición.
- Lewis A. S., Murphy L., McCalla C., Fleary M. y Purcell S. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 12.
- Ley y Specker (1939) *Chem. Ber.*, **72**, 192.
- Lorente C., Thomas A. H., Villata L. S., Capparelli A. L., Mesaros M., Bilmes G. M., Martinez C. G., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E. (2000) XXVIII IUPAC Symposium of Photochemistry, Dresden, Alemania.

- Lown W., Akhtar M. H. y McDaniel R. S. (1974) *J. Org. Chem.*, **39**, 1998.
- Lowry O. H., Bessey O. A. y Crawford E. J. (1949) *J. Biol. Chem.*, **180**, 389.
- Maier J. y Ninnemann H. (1995), *Photochem. Photobiol.*, **61**, 43.
- Marletta M. A. (1993) “Nitric Oxide Synthase: Function and Mechanism” en “Chemistry and Biology of Pteridines and Folates”, Edit., Ayling J. E., Nair M. G. y Baugh M.; Plenum Press.
- Marshall J. R. y Walker J. (1951) *J. Chem. Soc.*, 2648.
- Mason S. F. (1955) *J. Chem. Soc.*, 2336.
- Mason S. F. (1957) *J. Chem. Soc.*, 4874.
- Mason S. F. (1959) *J. Chem. Soc.*, 1281.
- McCormack J. J. y Newman R. A. (1985) “Chromatographic studies of folic acid and related compounds” en “Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins”, Edit., de Leenheer A. P., Lambert W. E. y de Ruyter M. G. M.; Marcel Dekker, Inc.
- Misuraca G., Prota G., Bagnara J. T. y Frost S. K. (1977) *Comp. Biochem. Physiol.*, **57B**, 41.
- Mengel R., Pfeleiderer W. y Knappe W. R. (1977) *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2817.
- Merlini L. y Nasini G. (1966) *J. Insect. Physiol.*, **12**, 123.
- Momzikoff A. y Santus R. (1981) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **293**, 15.
- Muñoz V., Brody S. y Butler W. L. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 322.
- Neverov K. V., Mironov E. A., Lyudnikova T. A., Krasnovsky A. A. Jr. y Kritsky M. S. (1996) *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 1149.
- Nichol C. A., Smith G. K. y Duch D. S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 729.
- Ninneman H. (1984) “The Nitrate Reductase Sistem” en “Blue Light Effects in Biological Systems”, Edit., Senger H.; Springer Verlag.
- Ninnemann H. (1995) *Photochem. Photobiol.*, **61**, 22.
- Paietta J. y Sargent M. L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5573.
- Patterson E. L., von Saltza M. H. y Stockstad E. L. R. (1956) *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5871.
- Penfold (1953) *Acta Cryst.*, **6**, 591.
- Perrin M. F. (1962) *J. Chem. Soc.*, 645.
- Pfeleiderer W. (1963) *Z. Naturforsch.*, **14b**, 654.
- Pfeleiderer W. (1993) “Natural Pteridines – A Chemical Hobby” en “Chemistry and Biology of Pteridines and Folates”, Edit., Ayling J. E., Nair M. G. y Baugh M.; Plenum Press.
- Pfeleiderer W. (1984) “Photochemistry of Pteridines” en “Biochemical and Clinical Aspects

- of Pteridines”, Edit., Pfeleiderer W., Wachter H. y Curtis H. Ch.; Walter de Gruyter.
- Poff K. L. y Butler W. L. (1974), *Nature*, **248**, 799.
 - Poff K. L., Butler W. L. y Loomis W. F. Jr. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 813.
 - Purrmann R. (1940) (a) *Liebigs Ann. Chem.*, **544**, 182; (b) *Liebigs Ann. Chem.*, **546**, 98.
 - Purrmann R. (1941) *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 284.
 - Rajagopalan K. V., Johnson J. L., Wuebbens M. M., Pitterle D. M., Hilton J. C., Zurick T. R. y Garrett R. M. (1993) “Chemistry and Biology of the Molybdenum Cofactors” en “Chemistry and Biology of Pteridines and Folates”, Edit., Ayling J. E., Nair M. G. y Baugh M.; Plenum Press.
 - Ranney H. M. y Rapaport S. I. (1993) “El Eritrocito” en “Bases Fisiológicas de la Práctica Médica”, Edit. West J. B.; Panamericana, 12ª edición.
 - Rapaport S. I. (1988) “Introducción a la Hematología”, Salvat, 2ª edición.
 - Reese (1958) *J. Chem. Soc.*, 895.
 - Robinson K., Pilot T. F. y Meany J. E. (1990) *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, **22**, 95.
 - Salomaa P., Schaleger L. L. y Long F. A. (1964), *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1.
 - Sancar G. B. (1990) *Mutat. Res.*, **236**, 147.
 - Sancar A. y Sancar G. B. (1988), *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 29.
 - San Román E., Aramendia P. y Schumacher H. (1982) *An. As. Quim. Arg.*, **70**, 887.
 - Schallreuter K. U., Wood J. M., Pittelkow M. R., Gutlich M., Lemke K. R., Rodl W., Swanson N. N., Hitzemann K. y Ziegler I. (1994) *Science*, **263**, 1444.
 - Schmidt W., Galland P., Senger H. y Furuya M. (1990) *Planta*, **182**, 375.
 - Schöpf C. y Becker E., (1936) *Liebigs Ann. Chem.*, **524**, 49.
 - Schöpf C., Reichert R. y Riefstahl K. (1941) *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 82.
 - Schöpf C. y Wieland H. (1926) *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **59**, 2067.
 - Scott J. M. (1980) *Methods Enzymol.*, **66**, 437.
 - Scwuink I. y Manzini M. (1973) *Arch. Genetik*, **46**, 41.
 - Short (1952) *J. Chem. Soc.*, 4584.
 - Siefertmann-Harms D., Fritz B y Ninnemann H. (1985) *Photochem. Photobiol.*, **42**, 771.
 - Specker y Gawrosch (1942) *Chem. Ber.*, **75**, 1338.
 - Spector T. y Ferone R. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10784.
 - Spinner E. (1960) *J. Chem. Soc.*, 1232.
 - Spinner E. y White (1966) *J. Chem. Soc.*, B, 991, 996.

- Stanier R. Y., Adelberg E. A. y Ingraham J. L. (1984) “Microbiología”, Reverté, 4^a edición.
- Stokstad E. L. R., Fordham D. y Grunigen A. (1947) *J. Biol. Chem.*, **167**, 877.
- Straight R. C. y Spikes J. D. (1985) “Photosensitized Oxidation of Biomolecules” en “Singlet O₂, Vol.4”, Edit. Frimer A. A.; CRC Press, Boca Raton.
- Streitwieser A. y Heathcock C. H. (1989) “Química Orgánica”, McGraw-Hill, 3^{ra} edición.
- Stryer L. (1995) “Biochemistry”, W. H. Freeman and Company, 4^{ra} edición.
- Theobald N. y Pfeleiderer W. (1978) *Chem. Ber.*, **111**, 3385.
- Tjebbes, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 916 (1962).
- Tucker G. F. e Irvin J. L. (1951) *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1923.
- Viscontini M., Hadron E. y Karrer P. (1957) *Helv. Chim. Acta*, **40**, 579.
- Viscontini M., Hummel W. y Fischer A. (1970) *Helv. Chim. Acta*, **53**, 1207.
- Viscontini, M. y Stierlin H. (1962) *Helv. Chim. Acta*, **45**, 2467.
- von Philipsborn W., Stierlin H. y Traber W. (1963) *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2592.
- Wieland H., Metzger H., Schöpf C. y Bülow M. (1925) *Liebigs Ann. Chem.*, **507**, 261.
- Wieland H. y Schöpf C. (1925) *Ber. Deut. Chem Ges.*, **58**, 2178.
- Witkop B., Patrick J. B. y Rosenblum M. (1951) *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2641.

Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en soluciones acuosas ácidas y alcalinas

