

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 O₂. 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 O₂.

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.

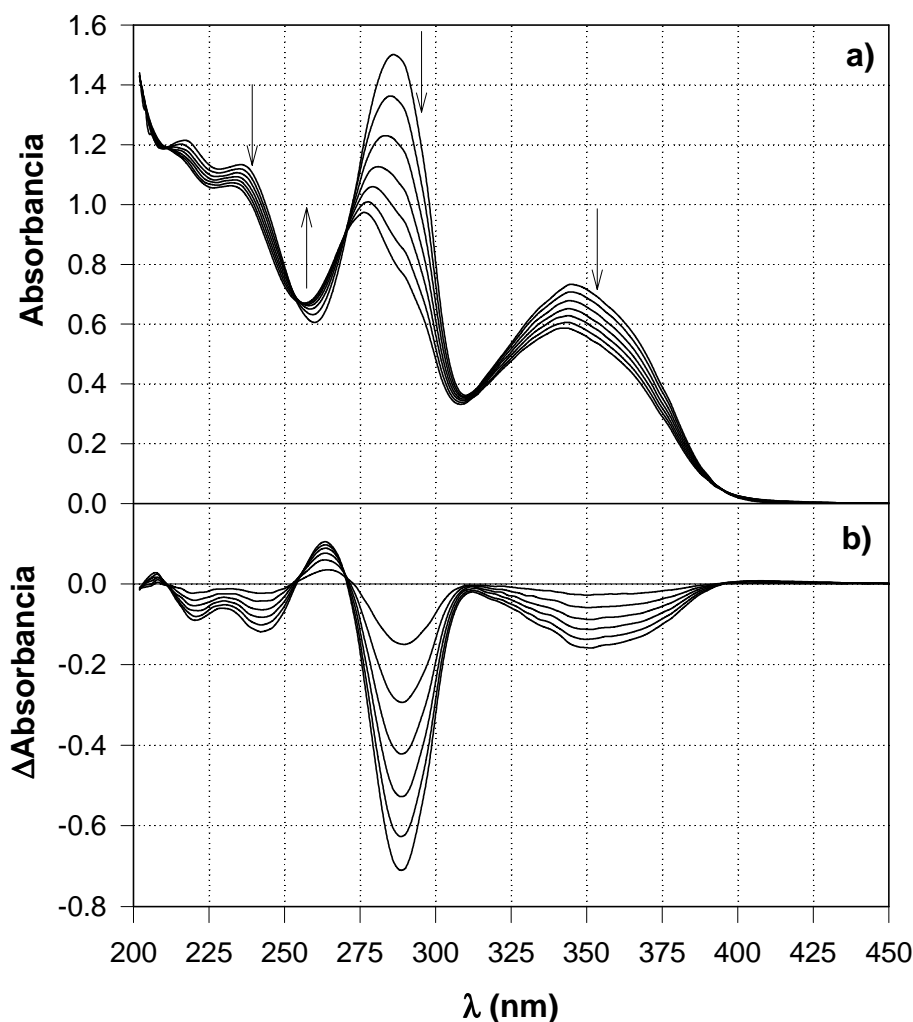


Figura 12.1. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 μM , $\text{pH}= 6,0$) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 10 min, durante 60 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y la observación.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

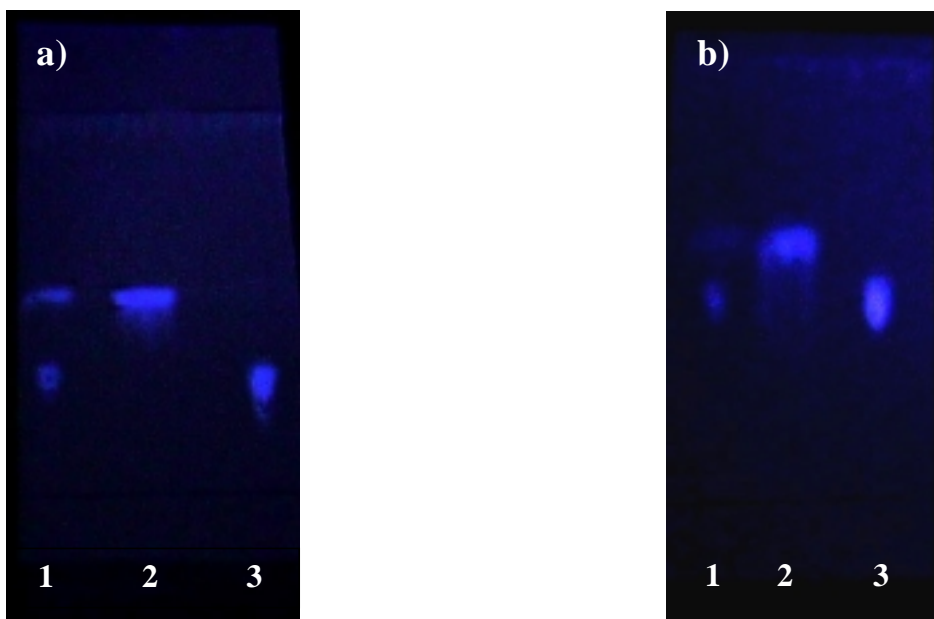


Figura 12.2. Corridas de TLC. a) Solvente de corrida: mezcla de 1-butanol, ácido acético y agua (4:1:2); b) Solvente de corrida: NH_4Cl 3%(p/v). Calles: 1, solución de 6-carboxipterina ($100 \mu\text{M}$, $\text{pH}=6,0$) irradiada 60 min con luz de 350 nm; 2, solución patrón de pterina ($100 \mu\text{M}$);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

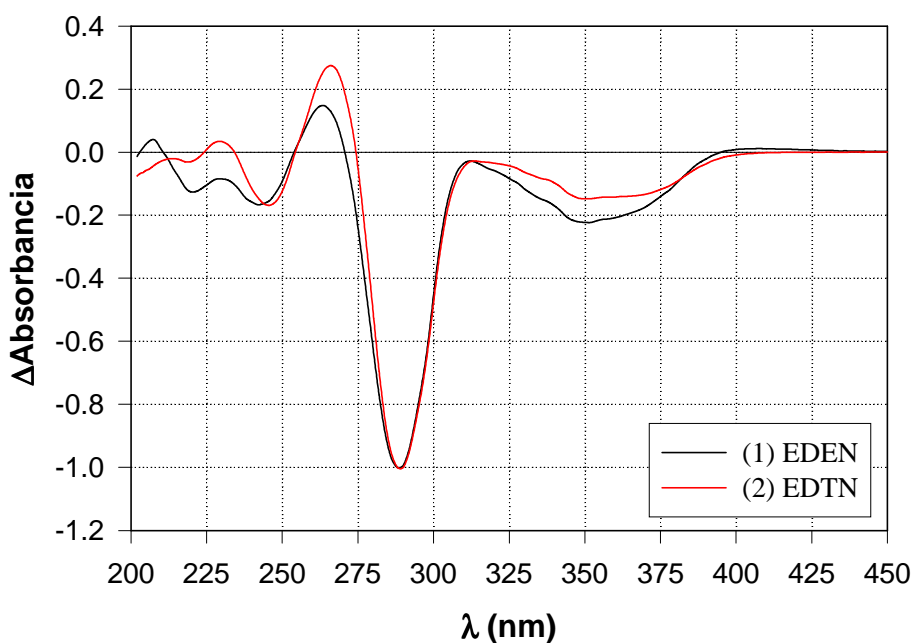


Figura 12.3. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 60 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución de pterina $100 \mu\text{M}$ y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración.

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.

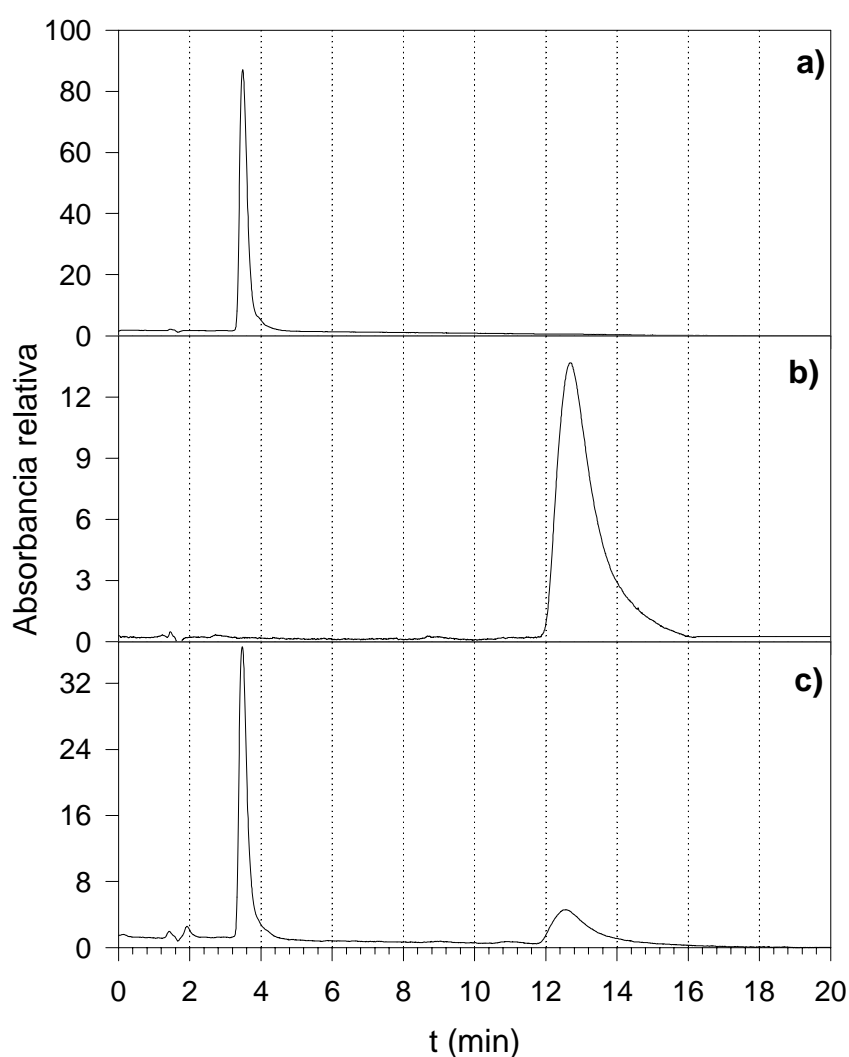


Figura 12.4. Cromatogramas. a) Solución de 6-carboxipterina 200 μ M. b) Solución de pterina 200 μ M. c) Solución de 6-carboxipterina 200 μ M irradiada 90 min con luz UV-A de $\lambda= 350$ nm. Para los tres cromatogramas la λ de análisis fue 340 nm.

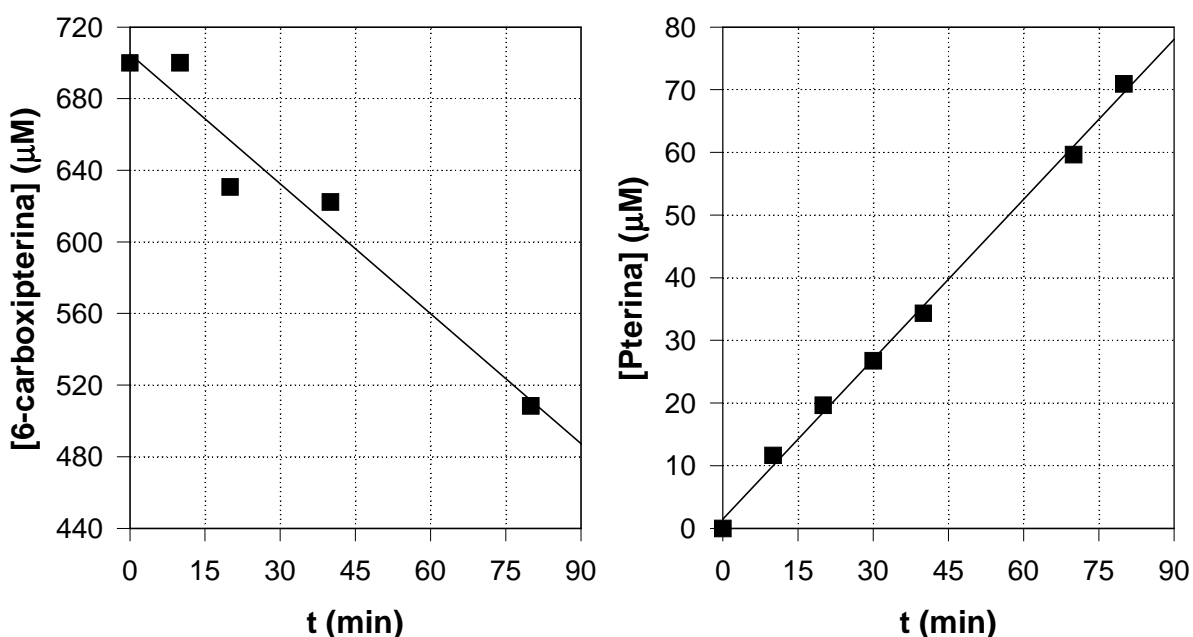


Figura 12.5. Evolución de las concentraciones de 6-carboxipterina y pterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución de 6-carboxipterina 700 μM y $\text{pH}=6,0$.

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.

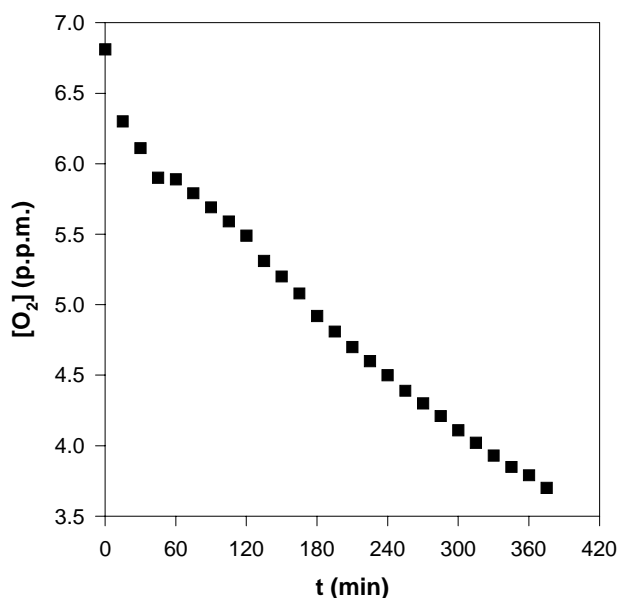


Figura 12.6. Disminución en la concentración de O_2 disuelto durante la fotólisis de una solución de 6-carboxipterina $200 \mu\text{M}$ ($\text{pH}= 6,0$).

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 ($200 \mu\text{M}$), 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.

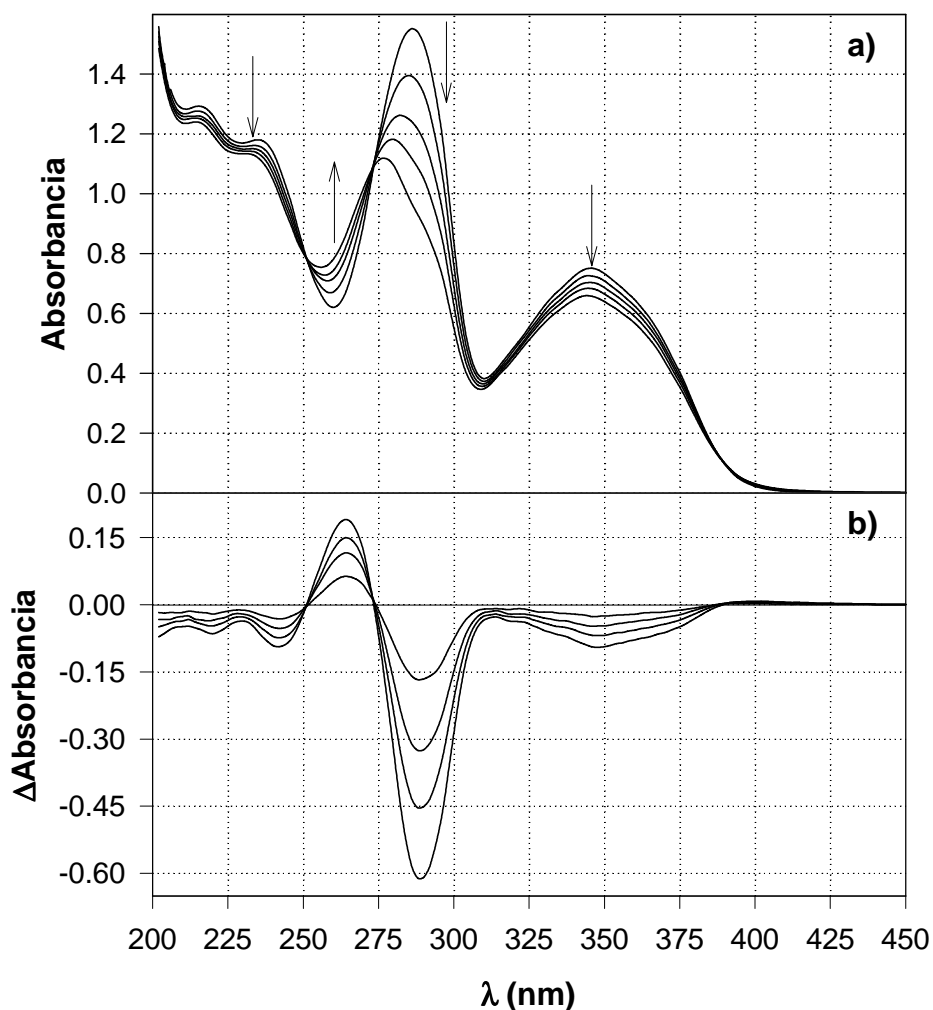


Figura 12.7. a) Evolución del espectro de absorción de una solución de 6-carboxipterina (100 μ M, pH= 6,0) al ser irradiada en ausencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 15 min y las flechas indican el sentido del cambio. b) Espectros DE correspondientes.

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 O₂ en el medio.

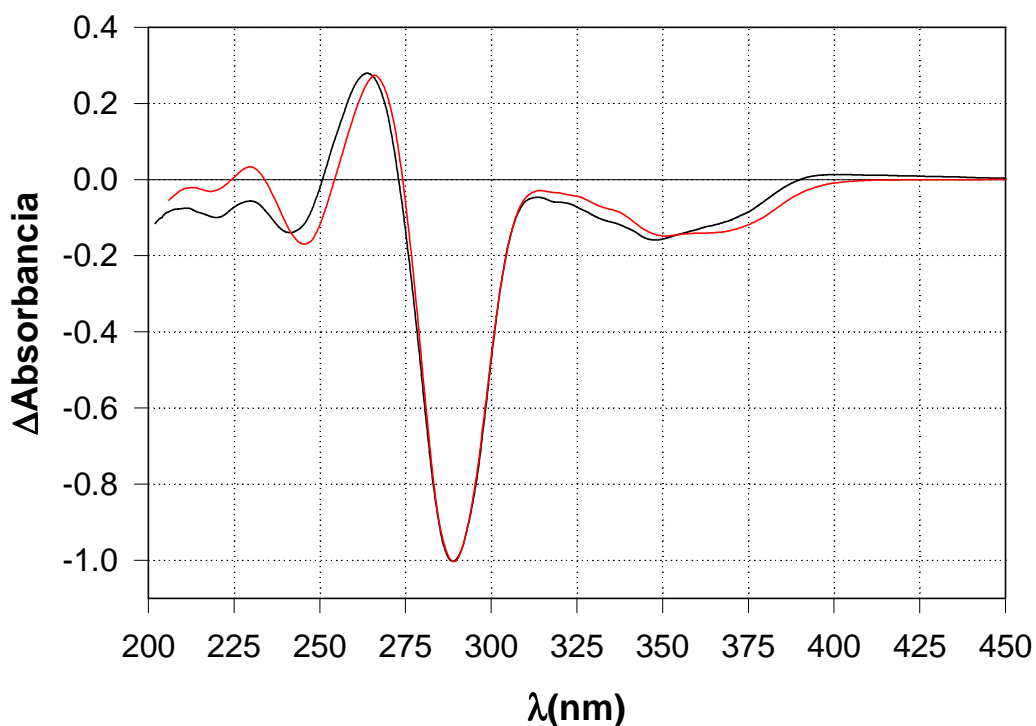


Figura 12.8. Comparación de espectros diferencia normalizados. (1) Espectro DEN obtenido luego de 110 min de fotólisis. (2) Espectro DTN obtenido a partir de una solución de pterina 100 μM y otra de 6-carboxipterina de la misma concentración.

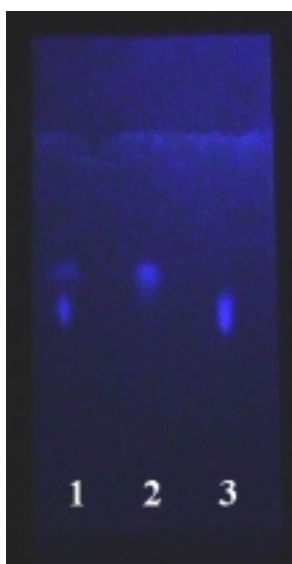


Figura 12.9. Carridas de TLC. Calle: 1, solución de 6-carboxipterina 200 μM (pH= 6,0) irradiada 90 min con luz de 350 nm; 2, solución patrón de pterina 100 μM ; 3, solución patrón de 6-carboxipterina 200 μM .

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.

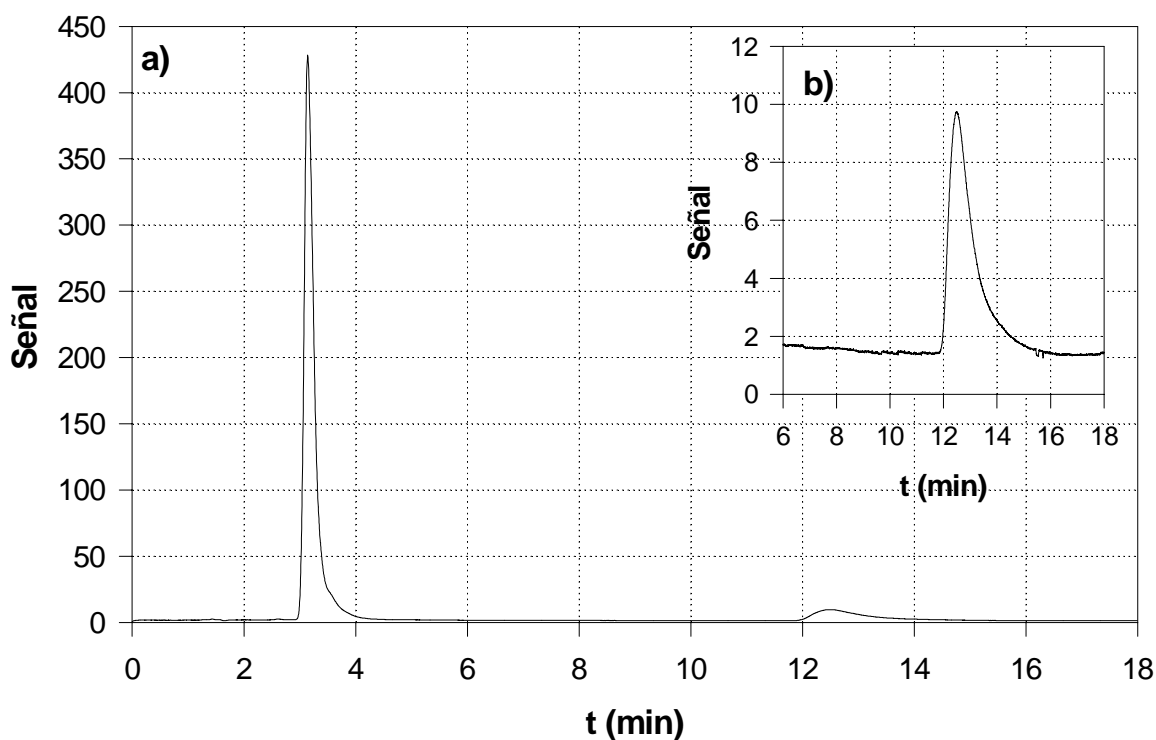


Figura 12.10. Cromatogramas. a) Solución de 6-carboxipterina 200 μM , burbujeada con N_2 e irradiada 45 min con luz UV-A de $\lambda = 350$ nm. λ de análisis 270 nm. b) Detalle del pico correspondiente a pterina.

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 O_2 . 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 O_2 ($5,1 \times 10^{-3}$). Esta diferencia se debe, seguramente, a la ausencia de la vía oxidativa en la fotólisis de las soluciones burbujeadas con N_2 . 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 O_2 ($1,9 \times 10^{-3}$), indicando que la velocidad de descarboxilación no es afectada de manera importante por dicho gas

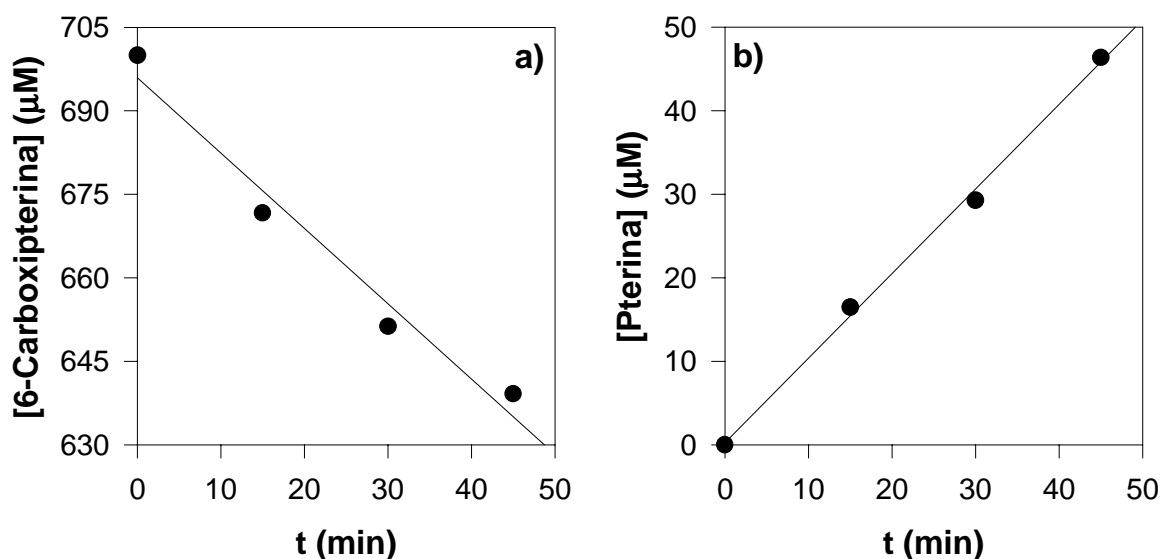


Figura 12.11. Evolución de las concentraciones de 6-carboxipterina y pterina, determinadas por HPLC, durante fotólisis de una solución, burbujeadada con N_2 , de 6-carboxipterina $700 \mu M$ y $pH= 6,0$.

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.

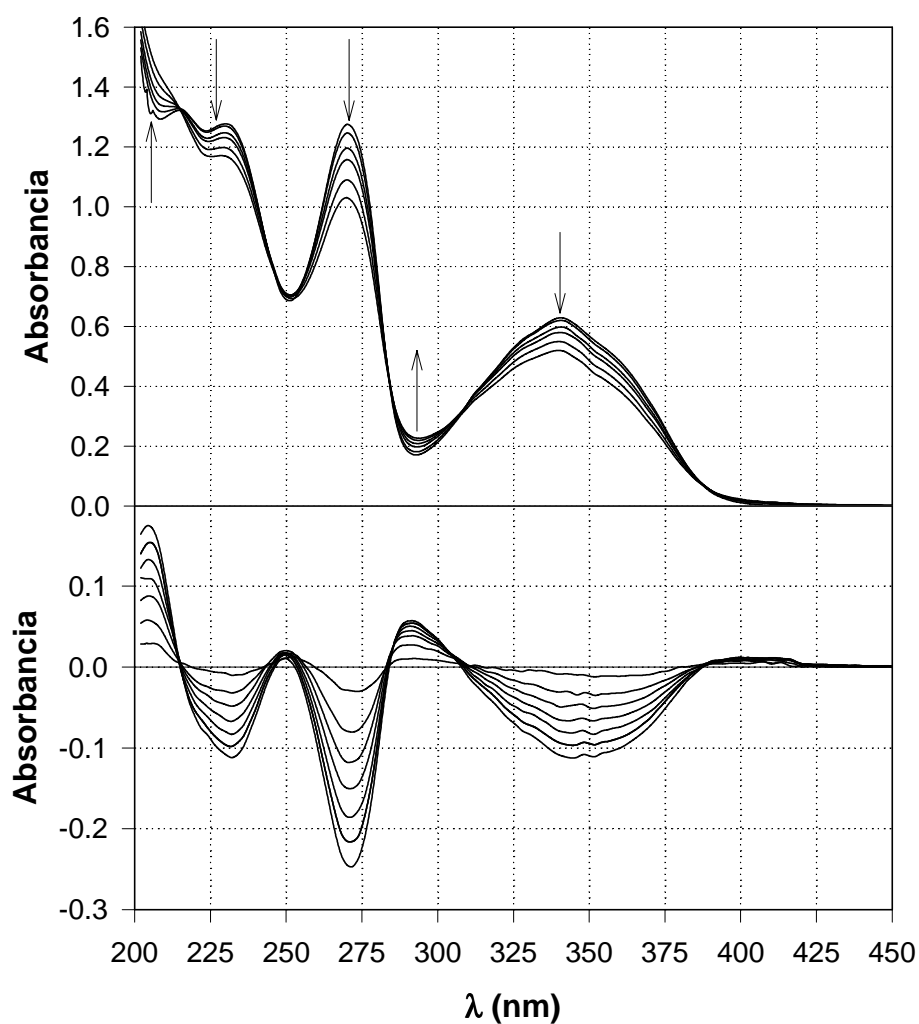


Figura 12.12. Evolución del espectro de absorción de una solución de pterina ($100 \mu\text{M}$, $\text{pH}= 5,6$) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 20 min durante 140 min y las flechas indican el sentido del cambio. Caminos ópticos de 1 cm para la irradiación y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

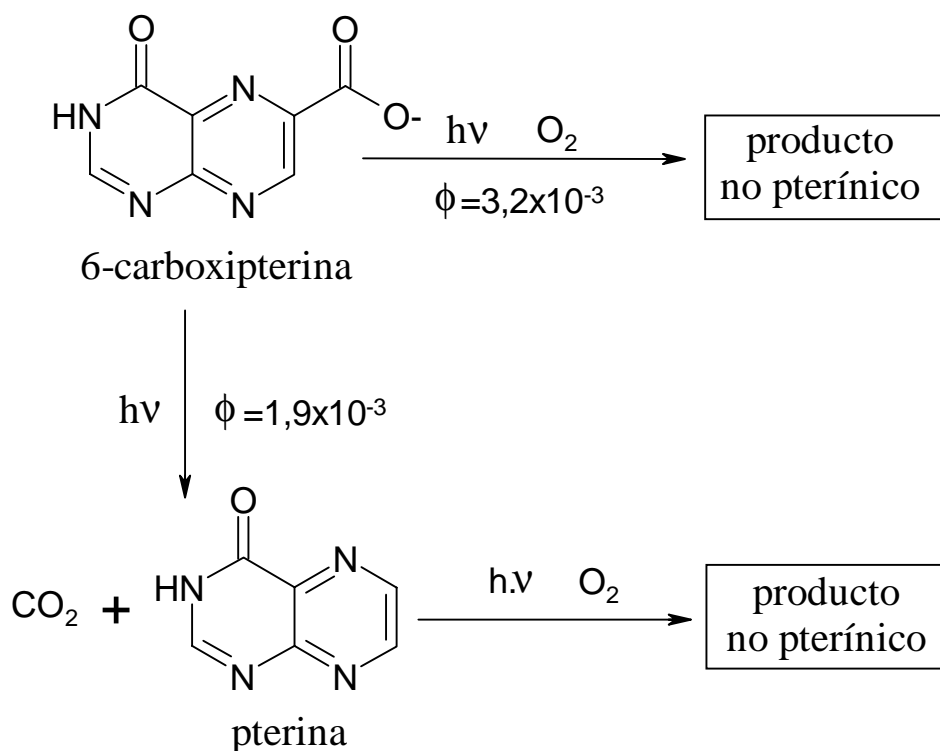


Figura 12.13. Fotólisis de 6-formilpterina y pterina.

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.