

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de
Pterinas en Solución Acuosa: Fluorescencia,
Producción de Especies Reactivas de Oxígeno
y Oxidación.**

Lic. Franco Martín Cabrerizo
2005

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 presentará 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 mis padres y mis hermanos.

A Paula.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis, en especial:

Al Dr. Alberto L. Capparelli, director de este trabajo de tesis, por haberme dado la posibilidad de formar parte de su grupo de investigación, brindándome las condiciones de trabajo necesarias para el desarrollo de mis actividades. También por haber confiado en mí y en los demás integrantes del grupo, dándonos la posibilidad de trabajar libremente.

Al Dr. Andrés H. Thomas, por su invaluable ayuda y constante apoyo, tanto en el diseño y realización de los experimentos desarrollados en Argentina y Alemania, como en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Quiero destacar especialmente su desinteresada colaboración con la redacción de este trabajo de tesis y además, por sobre todas las cosas, deseo agradecerle su amistad.

A la Prof. Dra. Esther Oliveros, por haberme dirigido en la realización de los experimentos de oxígeno singlete y fluorescencia desarrollados en el Instituto Engler-Bunte de la Universidad de Karlsruhe, Alemania. Agradezco también su invaluable ayuda en la interpretación de los resultados, especialmente aquellos descritos en el capítulo 13 del presente trabajo.

Al Prof. Dr. André Braun, director del Lehrstuhl für Umweltmesstechnik del Instituto Engler-Bunte de la Universidad de Karlsruhe, Alemania, por haberme permitido disponer del equipamiento e infraestructura de dicho instituto. Asimismo, quiero expresar mi gratitud por la constante supervisión de mi trabajo en sus laboratorios y por su participación en la discusión de los resultados.

A la Prof. Dra. Rosa Erra-Balsells, por su permanente apoyo, por su asesoramiento en distintos temas y por sus valiosos consejos que contribuyeron a mi formación. En particular, quiero agradecerle su colaboración en la interpretación de los resultados expuestos en los capítulos 14 y 15 de esta tesis.

A la Dra. Mónica C. González y al Dr. Daniel O. Mártire por su permanente y desinteresado asesoramiento científico.

A Pau, por su enorme paciencia, por saber entender cuanto significa esta tesis para mí y no dejar de apoyarme en ningún momento a pesar de mis ausencias.

A mis compañeros de trabajo integrantes del primer piso del INIFTA: Daniel, Mónica, Paula C., Janina, Carlos, Adela, Norma, Paula B., Maria Eugenia, Mario, Ezequiel, Chino, Paula J., Larisa, Alberto, Sebastián, Andrés, Carolina, Laura V., Jorge, Gabriela, Laura D., Lucho, Mariana y Romina, por todo el afecto y compañerismo recibidos, y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de trabajo del Engler-Bunte y amigos de Karlsruhe: Juan, Peter Phil Collins Normail, Pepe, Adriano, Fernanda, Manolo, Manju, Marta, Anke, Sandra, Erika y Anette, por los gratos momentos compartidos, por brindarme toda su ayuda y, en especial, por hacer mi estadía en Karlsruhe muy agradable, a pesar de la distancia.

A la Dra. Carolina Lorente y al Dr. Fernando Sebastián García Einschlag por su incondicional apoyo, aliento y permanente predisposición para ayudarme. Quiero agradecer especialmente, a la Dra. Lorente por su colaboración en la realización y análisis de numerosos experimentos de oxígeno singlete, desarrollados en el Instituto *Engler-Bunte* de la ciudad de Karlsruhe, Alemania. Asimismo, agradezco al Dr. García Einschlag por el asesoramiento técnico y matemático que siempre me ha brindado con absoluto desinterés, y porque el uso de diversos programas desarrollados por él, me facilitaron la tarea de obtención y análisis de datos experimentales.

A Gabriela Petroselli, Laura Dántola, Mariana Vignoni y Romina Cabrerizo, por haber colaborado con entusiasmo y dedicación en la realización de numerosos experimentos de fotólisis y en el análisis de las soluciones irradiadas; como así también, por su colaboración en las medidas espectrofluorométricas realizadas con el equipo *Perkin-Elmer*.

Al Dr. Gustavo T. Ruiz por su permanente apoyo, compañerismo y aliento, aún desde la distancia. Asimismo, por su asesoramiento técnico en el uso del espectrofluorómetro *Perkin-Elmer*.

Al Dr. Manoj Narayana Pillai y a Manju Thankamoni Amma, por haber colaborado con el manejo de los equipos para desarrollar los experimentos de oxígeno singlete y fluorescencia, llevados a cabo en el Instituto *Engler-Bunte* de la ciudad de Karlsruhe, Alemania.

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 en el uso y manejo del equipo y por su colaboración en la realización de numerosos experimentos de HPLC.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas de Postgrado Tipo I otorgada por el período 2002-2004, y por la beca de Postgrado Tipo II otorgada por el período 2004-2006, ambas para realizar el Doctorado.

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

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y a la Fundación Antorchas, por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis.

Al DAAD por otorgarme una beca para realizar una estadía de investigación en el Instituto *Engler-Bunte*, Universidad de Karlsruhe, Alemania.

ÍNDICE

Objetivos.	1
Estructura y diseño del trabajo de tesis.	3

PARTE I: INTRODUCCIÓN.

1	<i>Introducción</i>	
1.1	Introducción a la fotofísica y fotoquímica	5
1.1.1	Procesos fotofísicos.	5
1.1.2	Procesos fotoquímicos.	8
1.2	Especies reactivas de oxígeno.	9
1.2.1	Importancia de las especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.	10
1.3	Oxígeno Singlete.	11
1.3.1	Mecanismos de formación y posibles destinos del oxígeno singlete.	13
1.3.2	Reacciones en las que participa el oxígeno singlete.	15
1.4	Anión superóxido y peróxido de hidrógeno.	17
1.4.1	Mecanismos de producción y posibles destinos de O_2^- y H_2O_2 <i>in vivo</i> .	19
1.5	Fotobiología y fotosensibilización.	20
1.5.1	Oxidaciones fotosensibilizadas.	22
1.6	Referencias.	23
2	<i>Aspectos químicos y biológicos de las pterinas</i>	
2.1	Estructura química y nomenclatura de las pteridinas.	25
2.2	Propiedades ácido-base de las pterinas.	28
2.3	Importancia de las pterinas en la naturaleza.	30
2.3.1	Ácido fólico y sus derivados reducidos.	30
2.3.2	Tetrahydrobiopterina.	31
2.3.3	Molibdopterinas.	32
2.3.4	Neopterina como marcador de la activación de la inmunidad celular.	33
2.3.5	Oncopterina.	34
2.3.6	Pigmentos presentes en insectos.	34
2.4	Referencias.	35
3	<i>Fotobiología y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas</i>	
3.1	Fotoliasa.	37
3.2	Pterinas como fotorreceptores.	38
3.3	Fotosensibilización de biomoléculas.	39
3.3.1	Fotosensibilización de desoxirribonucleótidos por pterina.	40
3.3.2	Fotosensibilización de ADN.	41
3.4	Vitiligo.	44
3.5	Referencias.	46
4	<i>Fotofísica y fotoquímica de pterinas</i>	
4.1	Espectros de absorción.	49
4.2	Conocimientos previos sobre la emisión de pterinas.	51
4.3	Aplicaciones de la fluorescencia de las pterinas.	57

4.3.1	Métodos analíticos para la determinación de pterinas.	57
4.3.2	Derivados pterínicos como marcadores fluorescentes.	58
4.3.3	Pterina como marcador de mutaciones específicas del ADN.	59
4.4	Estudios previos sobre la producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por pterinas.	60
4.5	Conocimientos previos sobre la fotoquímica de pterinas.	61
4.5.1	Fotoquímica de Biopterina y Neopterina.	62
4.5.2	Fotoquímica del Ácido fólico.	64
4.5.3	Fotoquímica de FPT en soluciones acuosas.	68
4.5.4	Fotoquímica de CPT en soluciones acuosas.	69
4.6	Referencias.	70

PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.

5	<i>Espectroscopía electrónica</i>	
5.1	Absorción.	73
5.1.1	Espectros de absorción.	73
5.1.2	Titulación espectrofotométrica.	74
5.2	Fluorescencia.	78
5.2.1	Espectros de emisión.	78
5.2.2	Espectros de excitación.	81
5.2.3	Rendimientos cuánticos de fluorescencia.	82
5.2.4	Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia.	84
5.2.5	Titulación espectrofluorométrica.	86
5.3	Referencias.	88
6	<i>Quenching de fluorescencia</i>	
6.1	<i>Quenching</i> dinámico o por colisiones.	89
6.2	<i>Quenching</i> estático.	92
6.3	Metodología para diferenciar tipos de <i>quenching</i> .	94
6.4	Referencias.	96
7	<i>Estudios sobre especies reactivas de oxígeno (ERO)</i>	
7.1	Oxígeno singlete.	97
7.1.1	Método de detección de oxígeno singlete.	98
7.1.2	Determinación del rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$.	102
7.1.3	Determinación de la constante de velocidad de <i>quenching</i> total de $^1\text{O}_2$.	105
7.1.4	Determinación de la constante de velocidad de la reacción química entre las pterinas y el $^1\text{O}_2$.	106
7.1.5	Fotólisis en agua deuterada.	109
7.2	Peróxido de hidrógeno	111
7.2.1	Preparación del reactivo de trabajo.	112
7.2.2	Metodología de trabajo.	113
7.2.3	Curva de calibración.	115
7.3	Radical Hidroxilo.	116
7.3.1	Fotólisis realizadas en presencia de secuestradores de radical hidroxilo.	116
7.4	Referencias.	120

8	<i>Fotólisis Estacionaria</i>	
8.1	Preparación y control de las soluciones a irradiar.	121
8.2	Condiciones de irradiación.	124
8.3	Técnicas para el análisis de las soluciones irradiadas.	125
8.3.1	Espectrofotometría.	126
8.3.2	Identificación de productos mediante el análisis espectral.	130
8.3.3	Cromatografía en capa delgada.	131
8.3.4	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).	135
8.3.5	Medida electroquímica de oxígeno.	137
8.4	Determinación del rendimiento cuántico de una reacción.	138
8.5	Actinometría.	141
8.6	Referencias.	143

PARTE III: RESULTADOS.

9	<i>Análisis Espectrofotométrico</i>	
9.1	Espectros de absorción y constantes de disociación.	146
9.2	Conclusiones.	152
9.3	Referencias.	155
10	<i>Análisis Espectrofluorométrico</i>	
10.1	Espectros de emisión.	157
10.2	Rendimientos cuánticos de fluorescencia.	160
10.3	<i>Quenching</i> de fluorescencia por ácido <i>p</i> -aminobenzoico y por ácido <i>p</i> -aminobenzoilglutámico.	163
10.4	Espectros de excitación.	166
10.5	Tiempos de vida de fluorescencia.	170
10.6	Titulación espectrofluorométrica.	174
10.7	Conclusiones.	177
10.8	Referencias.	181
11	<i>Quenching de fluorescencia por aniones</i>	
11.1	<i>Quenching</i> por aniones hidroxilo. Fluorescencia de pterinas en soluciones fuertemente alcalinas.	183
11.2	<i>Quenching</i> por aniones fosfato.	187
11.2.1	Estudio en estado estacionario.	187
11.2.2	Estudio resuelto en el tiempo.	191
11.3	<i>Quenching</i> por aniones acetato.	195
11.3.1	Estudio en estado estacionario.	195
11.3.2	Estudio resuelto en el tiempo.	199
11.4	<i>Quenching</i> por aniones cloruros.	203
11.5	<i>Quenching</i> por aniones sulfatos.	203
11.6	<i>Quenching</i> por aniones nitratos.	204
11.7	Conclusiones.	205
11.8	Referencias.	208

12	<i>Oxígeno singlete</i>	
12.1	<i>Quenching</i> total de oxígeno singlete por pterinas en solución acuosa.	210
12.2	Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete por pterinas.	214
12.3	Conclusiones.	218
12.4	Referencias.	218
13	<i>Reacción química entre el oxígeno singlete y las pterinas</i>	
13.1	Determinación de k_r en medio alcalino.	219
13.2	Conclusiones.	255
13.3	Referencias.	256
14	<i>Fotólisis de 6-hidroximetilpterina en medio ácido</i>	
14.1	Fotólisis en presencia de oxígeno.	257
14.2	Fotólisis en ausencia de oxígeno.	263
14.3	El rol del oxígeno singlete.	270
14.3.1	Fotólisis en agua deuterada.	271
14.4	Conclusiones.	272
14.5	Referencias.	273
15	<i>Fotólisis de 6-hidroximetilpterina en medio alcalino</i>	
15.1	Fotólisis en presencia de oxígeno.	275
15.2	Fotólisis en ausencia de oxígeno.	289
15.3	El rol del oxígeno singlete.	296
15.3.1	Análisis cinético.	296
15.3.2	Fotólisis en agua deuterada.	297
15.4	Conclusiones.	300
15.5	Referencias.	301
16	<i>Fotólisis de pterina: soluciones ácidas y alcalinas</i>	
16.1	Irradiación en ausencia de oxígeno.	303
16.2	Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio ácido	306
16.3	Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio alcalino	311
16.4	El rol del oxígeno singlete.	318
16.4.1	Análisis cinético.	318
16.4.2	Fotólisis en agua deuterada.	319
16.5	Conclusiones.	321
16.6	Referencias.	322
17	<i>Fotólisis de 6-metilpterina: soluciones ácidas y alcalinas</i>	
17.1	Irradiación en ausencia de oxígeno.	323
17.2	Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio ácido	325
17.3	Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio alcalino	333
17.4	El rol del oxígeno singlete.	342
17.4.1	Análisis cinético.	342
17.4.2	Fotólisis en agua deuterada.	343
17.5	Conclusiones.	345
17.6	Referencias.	346

Prólogo

Objetivos.

La absorción de radiación electromagnética por parte de una molécula conduce a la formación de especies electrónicamente excitadas. Existen numerosas vías de desactivación de estos estados excitados, algunas de las cuales implican cambios químicos en la molécula y otras no. En aquellos casos en los cuales el exceso de energía presente en la molécula excitada se utiliza para promover una reacción química, se habla de un proceso fotoquímico. Por el contrario, los casos donde no ocurren cambios químicos en la molécula son denominados procesos fotofísicos.

Las pterinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están ampliamente distribuidos en los sistemas biológicos, desempeñando diversas funciones que se expondrán en detalle más adelante. Muchos de estos procesos son desencadenados por la luz, y han sido descriptos tanto en bacterias como en eucariotas.

Es evidente que el conocimiento de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las pterinas y compuestos relacionados permite una mejor comprensión de las reacciones fotoquímicas y de los procesos en los que participan. En los últimos años, hubo un notable interés sobre el estudio de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, y se puede apreciar un marcado incremento de la información, publicada en literatura, acerca de sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas. Sin embargo, todavía es necesario profundizar aun más en este sentido y seguir investigando, para poder establecer reglas generales en cuanto al comportamiento fisicoquímico general de las pterinas, y poder comprender con mayor detalle los procesos fotobiológicos en los que están involucrados.

En este trabajo se presenta un estudio *in vitro* de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de un grupo de derivados pterínicos en solución acuosa, y su dependencia con el pH. En particular, se optó por investigar el comportamiento que presentan estos compuestos al ser irradiados con luz UV-A (320-400 nm). Se utilizó este tipo de radiación UV porque es el tipo de radiación, proveniente del sol, que llega en mayor proporción a la superficie terrestre. Esto tiene una gran importancia desde el punto de vista fotobiológico y biomédico. Por otro lado, estos compuestos no absorben luz visible (400-700 nm), o lo

hacen en muy baja proporción, y, por ende, son estables o muy poco sensibles a este tipo de radiación electromagnética. A continuación se mencionan los objetivos particulares:

⊕ *Análisis espectroscópico:* Análisis de los espectros de absorción. Estudio de los equilibrios ácido-base involucrados en el rango de pH comprendido entre 4 y 13. Estudio de las propiedades de los estados excitados a partir del análisis de los espectros de emisión y excitación. Determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de los tiempos de vida de fluorescencia. Análisis de la influencia del pH sobre la emisión fluorescente.

⊕ *Estudio de procesos de quenching de fluorescencia.* Evaluación del efecto de diferentes aniones, sobre la emisión de las pterinas. Determinación de constantes de quenching. Estudio del efecto del pH sobre estos fenómenos.

⊕ *Oxígeno singlete.* Estudio de la capacidad de las pterinas para generar oxígeno singlete a partir de procesos de transferencia de energía. Determinación de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete y estudio del efecto del pH. Análisis de la capacidad de las pterinas para desactivar y/o reaccionar con oxígeno singlete. Determinación de las constantes de velocidad de quenching total y quenching químico.

⊕ *Estudio de fotólisis de pterinas.* Identificación de fotoproductos, evaluación de la influencia del pH. Se investigó la participación del O₂ disuelto en el medio, en las reacciones químicas estudiadas. Se estudió la capacidad que tienen las pterinas de generar fotoquímicamente peróxido de hidrógeno. Se determinaron los rendimientos cuánticos de los distintos procesos fotoquímicos detectados. Se investigó el rol del oxígeno singlete en el mecanismo de las reacciones.

Estructura y diseño del trabajo de tesis.

El presente trabajo de Tesis doctoral esta dividido en tres partes, cada una de las cuales contiene varios capítulos:

⊕ *Parte I: Introducción.* Esta parte esta compuesta por cuatro capítulos introductorios: el primero incluye un breve desarrollo acerca de los conceptos elementales de fotofísica y fotoquímica, necesarios para una fácil lectura y correcta interpretación de este trabajo; el capítulo 2 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 toda la información relevante accesible en literatura acerca de los diferentes procesos fotobiológicos y de fotosensibilización en los que participan las pterinas; y en el cuarto capítulo se describen las principales características fotofísicas y fotoquímicas de algunos derivados pterínicos publicadas en la literatura.

⊕ *Parte II: Materiales y métodos experimentales.* En esta parte, se detallan todas las técnicas experimentales empleadas en este trabajo, junto con el desarrollo de las ecuaciones necesarias para analizar e interpretar los resultados que de cada una de ellas derivan. En el capítulo 5 se hace una descripción de las diferentes técnicas de espectroscopia electrónica utilizadas, en particular, de absorción y emisión. En el capítulo 6 se describe la metodología empleada para el estudio de *quenching* de fluorescencia. En el capítulo 7 se hace referencia a las diferentes técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de diferentes especies reactivas, en particular, oxígeno singlete y peróxido de hidrógeno. También se describe la metodología empleada para el estudio de la reactividad de estas especies reactivas del oxígeno con las pterinas. En el capítulo 8 se presentan todos los detalles y condiciones experimentales bajo las cuales se realizaron los experimentos de irradiación continua con luz UV-A. Asimismo se explica la metodología empleada para la determinación de los rendimientos cuánticos de degradación de las pterinas estudiadas. También se presentan todas las técnicas analíticas mediante las cuales se analizaron las soluciones irradiadas.

⊕ *Parte III: Resultados.* Esta parte contiene un primer capítulo donde se exponen los resultados del análisis de los espectros de absorción y de las titulaciones espectrofotométricas de cada uno de los compuestos estudiados. Asimismo se presentan los correspondientes valores de las constantes de ionización obtenidos. El capítulo 10 resume

los principales resultados del análisis espectrofluorométrico: espectros de emisión, rendimientos cuánticos de fluorescencia, tiempos de vida de fluorescencia, espectros de excitación y curvas de titulación espectrofluorométricas. En el capítulo 11 se exponen los resultados del estudio de los procesos de *quenching* de emisión de 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT) y 6,7-dimetilpterina (DPT), por diferentes aniones. En el capítulo 12 se presentan los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete de HPT, MPT, DPT y ácido N-metil fólico (MAF), junto con los valores de las constantes de *quenching* total. En el capítulo siguiente, se exponen los resultados del estudio de la reactividad química del oxígeno singlete con algunos derivados pterínicos, en particular, HPT, MPT, DPT, MAF, pterina (PT) y ácido fólico (AF). Los resultados del estudio fotoquímico propiamente dicho se exponen en los últimos cuatro capítulos de la Parte III. Se presentan los resultados de la fotólisis de tres derivados pterínicos (HPT, PT y MPT) en diferentes condiciones de pH.

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, todos los capítulos de la Parte III donde se exponen resultados experimentales tienen una última sección en la cual se resumen dichos resultados e incluyen las conclusiones más importantes que pueden deducirse a partir de ellos.

PARTE I: INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la fotofísica y fotoquímica.

La absorción de radiación electromagnética por una molécula conduce a su excitación desde un estado cuántico de menor energía a otro de mayor energía. Una molécula en estado electrónico excitado se encuentra en una situación muy inestable respecto de su estado basal; por lo tanto, puede perder el exceso de energía siguiendo diversos caminos. Estas vías, de acuerdo al resultado final, se pueden dividir en dos grupos: *Procesos fotoquímicos* o *Procesos fotofísicos*. En el caso en que la molécula sufra una transformación química, entonces el camino elegido es fotoquímico; de lo contrario, si permanece químicamente inalterada, y se desactiva mediante alguna forma física, el camino elegido es fotofísico.

1.1.1 Procesos fotofísicos.

Existen muchos caminos de desexcitación física posibles, y el más favorable dependerá de cada tipo de molécula y de la naturaleza del estado electrónico involucrado. Estas vías de desexcitación suelen ser muy rápidas y pueden clasificarse en las siguientes categorías:

Transiciones radiativas: la molécula excitada emite radiación electromagnética para retornar al estado de menor energía. La cantidad de energía emitida es menor (de mayor longitud de onda) que la utilizada para crear el estado excitado.

Transiciones no radiativas: un estado previamente excitado se convierte en otro, sin emisión de radiación, por transferencia intramolecular de energía.

Procesos de quenching físico: involucra la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras moléculas que se encuentran en contacto con la primera.

Cada uno de estos tipos de desactivación física, incluye diferentes procesos. En la figura 1.1 se presenta un diagrama de Jablonski, que representa las transiciones radiativas y

no radiativas en un esquema simplificado de niveles de energía. En este esquema las transiciones se representan con flechas y los niveles vibracionales asociados a cada estado se representan con líneas horizontales.

La mayoría de las moléculas orgánicas presentan un estado electrónico basal singlete, representado por el símbolo S_0 . La absorción de radiación electromagnética promueve un electrón a un orbital de mayor energía. Si no ocurre cambio de spin, el estado electrónico excitado alcanzado continua siendo un singlete, representado ahora por S_1 . Si, por el contrario, ocurre un cambio de spin el estado electrónico alcanzado será un triplete, representado por T_1 . En un proceso de excitación electrónica existe una preferencia sobre la conservación del spin, por ello las bandas de absorción más intensas en un espectro corresponden a transiciones del tipo $S_0 \rightarrow S_1$. Por el contrario, las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ están “prohibidas por spin”, y, aunque ocurren, son transiciones muy débiles. A pesar de no estar representados en el diagrama, existen estados excitados de mayor energía a los descritos, tanto singletes como tripletes. Usualmente la excitación al primer estado excitado es el proceso más favorable, sin embargo, muchas moléculas presentan transiciones $S_0 \rightarrow S_2$.

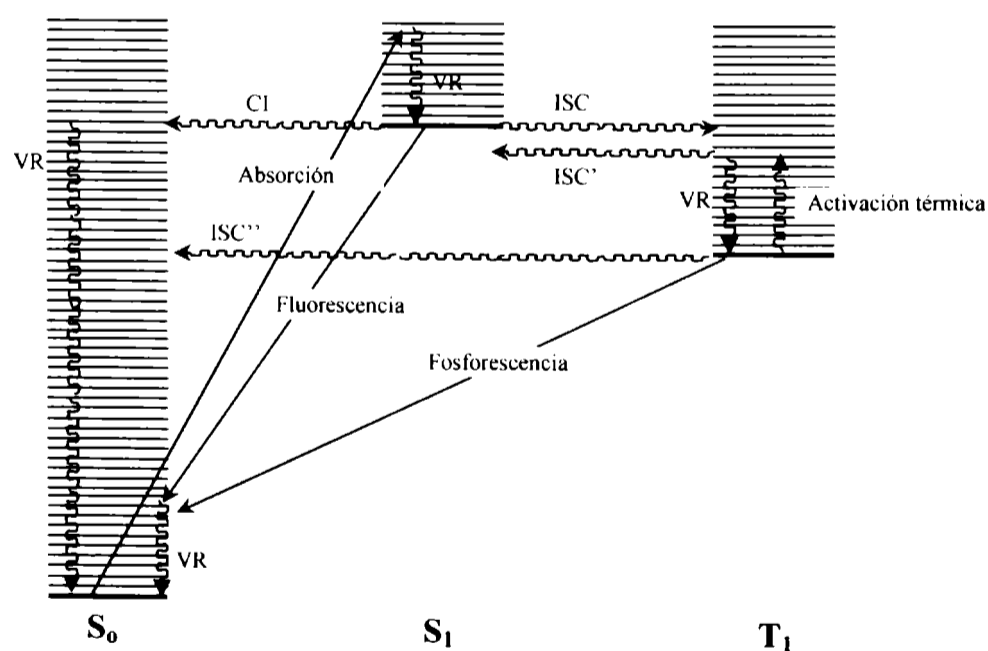


Figura 1.1: Diagrama de Jablonski, donde $ISC' = T_1 \rightarrow S_1$ ISC y $ISC'' = T_1 \rightarrow S_0$ ISC

El diagrama de Jablonski puede utilizarse para representar todas las transiciones posibles que pueden ocurrir entre niveles de diferente energía de una molécula. Usualmente se representan las transiciones que involucran absorción o emisión de energía electromagnética con flechas rectas, mientras que las transiciones no radiativas con flechas onduladas. Las transiciones radiativas son “transiciones verticales” e involucran un cambio en la energía total de la molécula, debido a la absorción o la emisión de un fotón. Las transiciones no radiativas son “transiciones horizontales” que involucran conversiones de un estado a otro, sin cambio de energía en la molécula. Las conversiones pueden ser entre estados de igual multiplicidad, denominándose *conversión interna* (IC), o de distinta multiplicidad, denominándose *cruzamiento intersistemas* (ISC). Las transiciones horizontales entre estados, por conversión interna o cruzamiento intersistemas, dejan a la molécula con un exceso de energía vibracional. En solución esta energía es rápidamente removida por colisiones con moléculas del solvente, en un proceso denominado relajación vibracional (VR).

Los procesos radiativos son la *fluorescencia* y la *fosforescencia*. En ambos fenómenos las moléculas que han absorbido radiación emiten luz. La emisión se denomina *fluorescencia* si la emisión ocurre desde un estado electrónico de igual multiplicidad de spin que el estado final, siendo así una transición fuertemente permitida y por lo tanto muy rápida. Por otro lado, la emisión conocida como *fosforescencia* es una transición entre estados de diferente multiplicidad de spin, es decir, una transición teóricamente prohibida. Sin embargo, la transición puede ocurrir, pero generalmente es de menor intensidad y ocurre más lentamente. Las propiedades de la luz emitida pueden evaluarse experimentalmente para revelar detalles de la naturaleza y el comportamiento de los estados excitados.

Los procesos de *quenching físico* son otro grupo de procesos de desexcitación física, que no están representados en el diagrama de Jablonski de la figura 1.1. Cuando en el medio se encuentra otra molécula capaz de interactuar con el estado excitado, aparece un nuevo camino de desactivación que compite con los descritos anteriormente. Esta segunda molécula se conoce usualmente como *quencher* o desactivador. En presencia de un *quencher* una cantidad de moléculas excitadas puede interaccionar con éste, y desactivarse sin emisión de radiación. Este fenómeno involucra generalmente la transferencia de energía de la molécula excitada a otra molécula en una colisión.

Consecuentemente, la intensidad de la radiación se reduce en una cantidad dependiente de la concentración del *quencher* y de la eficiencia del proceso de *quenching*. Adicionalmente la presencia del *quencher* aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión. Así medidas de la intensidad de la emisión y su dependencia en el tiempo proveen información de las velocidades de reacción entre la molécula excitada y el *quencher*^[1].

1.1.2 Procesos fotoquímicos.

El exceso de energía presente en una molécula en un estado electrónicamente excitado puede emplearse para promover una reacción química; existirá, en este caso, una reacción fotoquímica. Este hecho puede ocurrir por mecanismos muy diferentes; por ejemplo, la energía puede ser usada para romper una unión química, para superar una energía de activación, etc. Queda claro que la química de una molécula en un estado excitado puede ser muy diferente a la química de esa misma molécula en su estado basal.

De acuerdo al tipo de transformación química, las reacciones fotoquímicas pueden clasificarse en distintas categorías representadas esquemáticamente en la figura 1.2:

(i) *Reacciones de disociación*: en este tipo de proceso, la energía de la radiación debe ser suficiente para producir la ruptura de un enlace, que conduce a la fragmentación de la molécula excitada.

(ii) *Reacciones o procesos intermoleculares*: la excitación de una molécula favorece la reacción con una segunda molécula, lo cual no es posible para el estado electrónico fundamental. En estos procesos se incluyen reacciones directas entre la molécula excitada y una segunda molécula, como así también procesos de transferencia de electrones entre ambas moléculas.

(iii) *Procesos intramoleculares*: una parte de una molécula en estado excitado interacciona con otra parte de la misma molécula. Este tipo de procesos conduce a cambios estructurales de la molécula o procesos de isomerización. Un ejemplo de este tipo de proceso es la isomerización E-Z (cis-trans) donde un doble enlace en el estado fundamental, se convierte, en el estado excitado, esencialmente en un simple enlace. De esta manera la molécula en dicho estado excitado presenta la posibilidad de una libre

rotación alrededor del simple enlace y, consecuentemente, la isomerización se ve favorecida.

(iv) *Procesos de ionización*: la energía de la radiación produce la separación de un electrón y, por ende, la ionización de la molécula excitada. Estos procesos presentan cierta similitud con los descritos en (i), con la diferencia que, en lugar de producirse dos fragmentos neutros, aquí se genera un ión y un electrón. La molécula ionizada posteriormente sufre una transformación química; por ejemplo, por reacción con otra molécula.

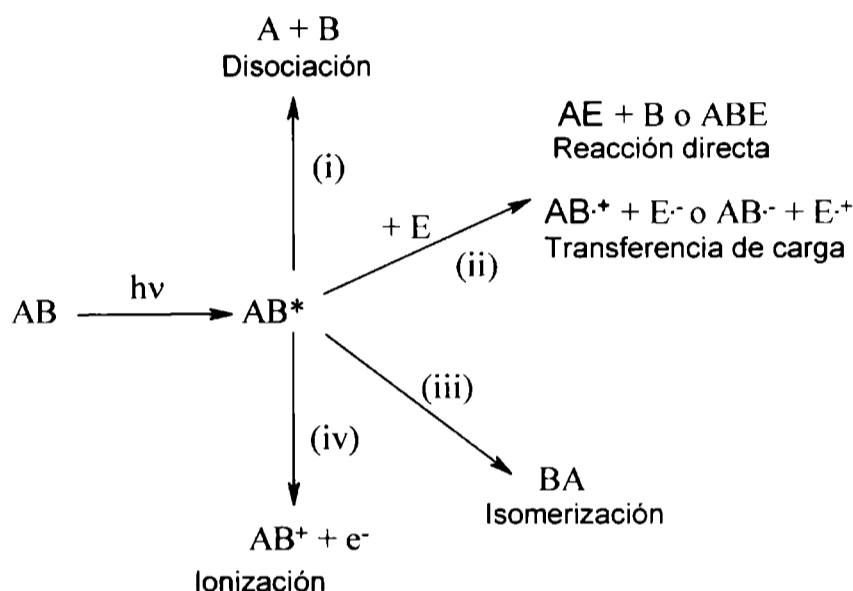


Figura 1.2: Esquema de algunas de las vías de desactivación química del estado excitado de una molécula AB.

1.2 Especies Reactivas de Oxígeno.

El oxígeno es el elemento más abundante sobre la corteza terrestre, principalmente en su forma de molécula diatómica gaseosa (O_2), constituyendo el 21 % en volumen del aire seco. Por ello su presencia es casi inevitable en cualquier sistema de reacción^[2]. Es uno de los elementos más importantes desde el punto de vista biológico debido a que las reacciones en las que participa el O_2 proveen la fuerza termodinámica necesaria para el metabolismo de todos los organismos superiores.

Sin embargo, los organismos aeróbicos expuestos a concentraciones de O_2 superiores a 21% pueden sufrir serias lesiones. Este efecto tóxico ha sido demostrado en plantas, animales y microorganismos. Por ejemplo, la exposición de un humano adulto

frente a 1 atm de presión de O₂ puro, durante 6 horas provoca dolores en el tórax, tos e irritación en la garganta; y en caso de exposiciones prolongadas, se producen daños en los alvéolos pulmonares. Los efectos nocivos del O₂ en los organismos aeróbicos varían considerablemente con el tipo de organismo estudiado, edad, estadio fisiológico, y dieta.

Las primeras teorías desarrolladas para explicar la toxicidad del O₂ postulaban que el O₂ actuaba como inhibidor de ciertas enzimas, alterando así el metabolismo. Actualmente se sabe que la elevada concentración de O₂ favorece la formación de otras especies derivadas del mismo, con carácter mucho más oxidante. Estas especies son las que actualmente se conocen como *Especies Reactivas de Oxígeno* o simplemente ERO. Este es un término que no sólo incluye las especies radicalarias derivadas del O₂ (anión superóxido (O₂⁻) y radical hidroxilo (OH[•])), sino también a especies no radicalarias derivadas del O₂ como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singlete (¹O₂), ácido hipocloroso (HOCl) y ozono (O₃). Cabe aclarar que, el término *Reactivo* es un término relativo, ya que el O₂⁻ y el H₂O₂ poseen, en soluciones acuosas, una reactividad mucho menor comparados especialmente con el radical OH[•].

En este capítulo se hará una breve discusión respecto de las características generales de la molécula de O₂ y de las especies reactivas derivadas del mismo, que puedan ser relevantes en las distintas reacciones en las que participan.

1.2.1. Importancia de las especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.

Las ERO se generan constantemente *in vivo* y participan en innumerables reacciones de oxidación de un elevado número de biomoléculas. Este tipo de reacciones pueden ser beneficiosas o perjudiciales para los sistemas vivos. *In vivo*, las ERO pueden producirse de manera accidental; en procesos de óxido-reducción incompletos, o en diferentes procesos fotofísicos y fotoquímicos, como por ejemplo, la producción fotoquímica de oxígeno singlete (¹O₂), la generación de O₂⁻ por mecanismos de transferencia de electrones desde los estados electrónicamente excitados de diferentes compuestos orgánicos al O₂, también por oxidación de fotoproductos reducidos. Las ERO también pueden generarse de manera deliberada, y participar así en reacciones y procesos necesarios para la célula.

In vivo, existen numerosas moléculas como α -tocoferol, ácido ascórbico (Vitamina C) y glutatión reducido, capaces de secuestrar estas ERO. Por otro lado, los sistemas vivos han desarrollado mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante, para disminuir los daños producidos por las ERO. Entre las enzimas más importantes están la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Un gran número de experimentos han demostrado que estas enzimas son esenciales para la vida^[2,3].

Todos estos mecanismos de defensa antioxidante, están en equilibrio con los procesos de generación de ERO *in vivo*. Cuando existe una alteración de este equilibrio en favor de la formación de ERO, el resultado es lo que se conoce como *estrés oxidativo*. La mayoría de los organismos aeróbicos pueden tolerar un leve estrés oxidativo, para lo cual incrementan la síntesis de las enzimas del sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, un severo estrés oxidativo puede producir serias alteraciones: daños en las hebras del ADN, daños en los transportadores de iones de membrana u otras proteínas específicas, etc^[2,3].

1.3. Oxígeno singlete

Su alto contenido energético, su gran reactividad y sus estados excitados, de relativamente baja energía, hacen al O_2 una especie muy importante desde el punto de vista fotoquímico. Para entender la reactividad química del O_2 es necesario conocer su estructura electrónica. Sobre la base de la teoría de orbitales moleculares (OM) se puede construir un diagrama para el estado basal del O_2 , que posee 16 electrones (figura 1.3). La configuración resultante es $(\sigma_{1s})^2 (\sigma^*_{1s})^2 (\sigma_{2s})^2 (\sigma^*_{2s})^2 (\sigma_{2p})^2 (\pi_{2p})^4 (\pi^*_{2p})^2$. Esto da 3 estados electrónicos correspondientes a tres arreglos posibles para los electrones.

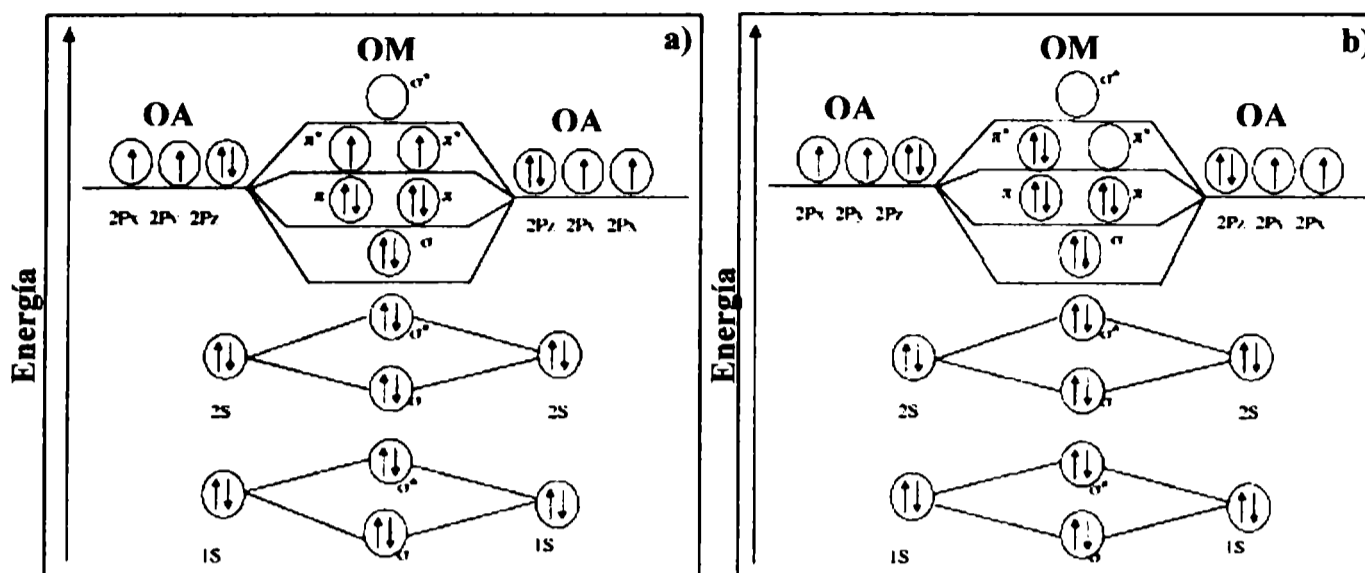


Figura 1.3: Diagrama de orbitales moleculares (OM) del O₂, construido a partir de la combinación lineal de los orbitales atómicos (OA) del oxígeno. a) Configuración del estado triplete basal ($^3\Sigma^-$). b) Configuración del primer estado excitado singlete ($^1\Delta_g$)^[4].

El estado basal del O₂ es un triplete ($^3\Sigma^-$), paramagnético, debido a sus dos electrones no apareados. Los dos estados electrónicamente excitados energéticamente más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$. En la figura 1.3 se muestran las configuraciones electrónicas detalladas de los estados $^3\Sigma^-$ y $^1\Delta_g$. Por otro lado, en la figura 1.4 puede apreciarse el diagrama de energía para el O₂. 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 este estado al cual se denomina comúnmente oxígeno singlete o, simplemente, 1O_2 . Se encuentra a 22,5 Kcal/mol sobre el estado basal. 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^[5].

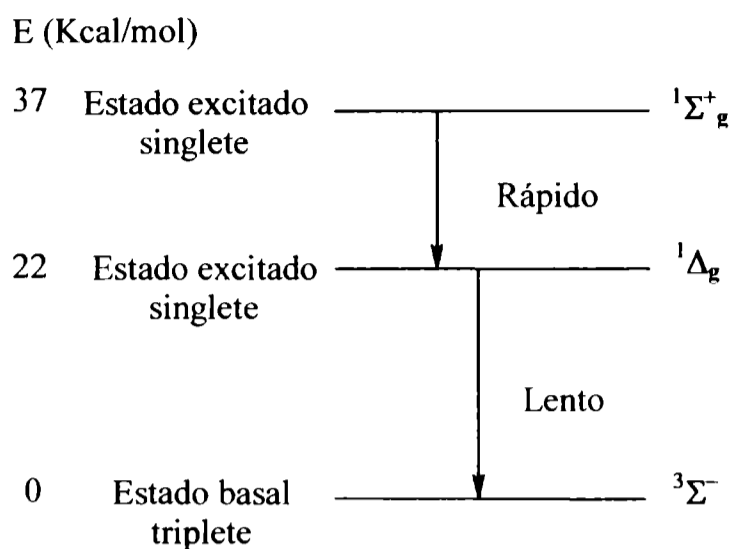


Figura 1.4: Diagrama de energía para el O_2 .

La configuración electrónica del oxígeno en estado basal (3O_2) le confiere a esta molécula características propias de un dirradical. Por lo tanto, esta especie reacciona rápidamente con diferentes compuestos de naturaleza radicalaria. Por su parte, el 1O_2 ($^1\Delta_g$) es una especie no radicalaria, muy electrofílica. Esta especie reacciona con compuestos que presentan una multiplicidad de spin igual a 1, y con compuestos “ricos” en electrones, sin la necesidad de formación de intermediarios radicalarios. El 1O_2 tiene la capacidad de atacar rápidamente a los compuestos orgánicos; y es alrededor de 1000 veces más reactivo que el 3O_2 . Esta mayor reactividad se debe simplemente a que numerosas sustancias con las que reacciona se encuentran en estado basal singlete, entonces la reacción es singlete-singlete, más probable que una reacción triplete-singlete, como debería ser con el 3O_2 .

1.3.1. Mecanismos de formación y posibles destinos del oxígeno singlete.

El 1O_2 puede generarse por diferentes vías: químicas, enzimáticas y fotoquímicas. Los mecanismos químicos de generación de 1O_2 implican una reacción química en la cual uno de los productos es el O_2 electrónicamente excitado. Uno de los ejemplos mejor conocidos es la reacción del NaClO con H_2O_2 ^[6]. También se han encontrado reacciones *in vivo* que producen 1O_2 , como, por ejemplo, la oxidación del ión superóxido o sistemas

enzimáticos capaces de generarlo.

La generación fotoquímica de $^1\text{O}_2$ consiste en la transferencia de energía al O_2 , desde una molécula electrónicamente excitada debido a la absorción de un cuanto de luz, denominada comúnmente sensibilizador. Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el O_2 queda en su estado excitado singlete. Este mecanismo se encuadra dentro de los denominados procesos fotosensibilizados, cuya explicación detallada se dará más adelante en este mismo capítulo.

Este proceso se encuentra representado en el esquema de la figura 1.5. En general, cuando el sensibilizador ($^1\text{Sens}$) es una molécula orgánica, la absorción de luz genera un estado excitado singlete ($^1\text{Sens}^*$), el cual, mediante cruzamiento intersistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete ($^3\text{Sens}^*$) de mayor tiempo de vida. Es este estado triplete del sensibilizador el que tiene la capacidad de transferir su energía hacia el $^3\text{O}_2$.

El $^1\text{O}_2$, así formado, puede desactivarse por dos vías diferentes: en forma *no radiativa* (por transferencia de energía al solvente), o *radiativa* (emitiendo luz). En general, la velocidad de la vía de desactivación radiativa, es mucho menor que la correspondiente a la vía no radiativa ($k_d \gg k_e$, ver figura 1.5). Si alguna sustancia (Q) en el medio es capaz de atrapar al $^1\text{O}_2$, es decir, de actuar como desactivador (*quencher*) del $^1\text{O}_2$, las posibilidades de *quenching* químico o físico deben considerarse. El *quenching* físico puede ocurrir principalmente por dos mecanismos: transferencia de energía o transferencia de carga. El primer mecanismo es exactamente el camino inverso a la producción fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$, y ocurre fácilmente si está presente una molécula cuya energía de excitación al triplete sea menor que la del oxígeno. Un ejemplo de este mecanismo puede observarse en presencia de carotenos, que tienen un papel muy importante protegiendo del daño fotooxidativo a los sistemas fotosintéticos. El segundo mecanismo ocurre en presencia de moléculas ricas en electrones y parece ocurrir por una transferencia de cargas parcial. Por último, el *quenching* químico consiste en la reacción química del $^1\text{O}_2$ con un sustrato (*quencher*), produciéndose la oxidación del mismo.

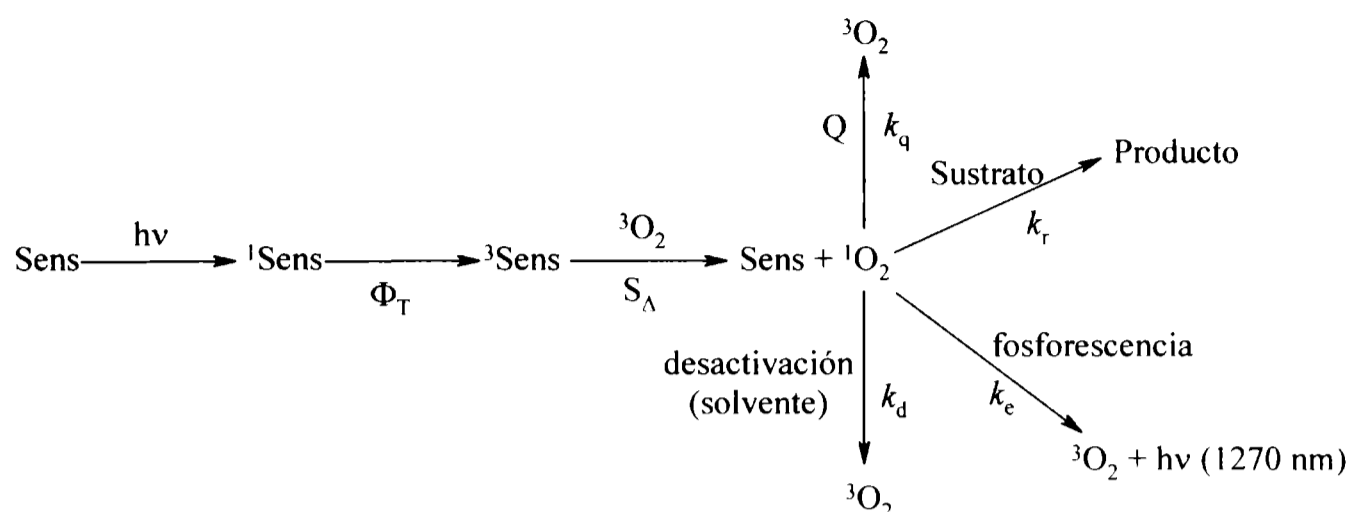


Figura 1.5: Generación fotoquímica de $^1\text{O}_2$ y posibles destinos del mismo. $^3\text{O}_2$ es el oxígeno molecular en su estado basal. Sens, $^1\text{Sens}$ y $^3\text{Sens}$ representan al sensibilizador en su estado basal, en un estado singlete excitado y en un estado triplete excitado, respectivamente. Q representa a un *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, flavinas, feofitinas, mioglobinas, distintos colorantes sintéticos, etc.^[2,4]. 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. En consecuencia, *in vivo*, pueden ocurrir procesos de fotosensibilización en los cuales se genere $^1\text{O}_2$ y, por consiguiente, las biomoléculas resulten oxidadas^[7-9].

1.3.2. Reacciones en las que participa el oxígeno singlete.

Existe una gran variedad de reacciones en las que participa el $^1\text{O}_2$, 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. Estos tipos de reacciones se esquematizan en la figura 1.6. En todas estas reacciones los productos primarios formados

pueden sufrir reordenamientos para dar una amplia gama de productos oxidados estables. El $^1\text{O}_2$ reacciona *in vitro* con macromoléculas de fundamental importancia para los seres vivos^[10]. Estas reacciones pueden ocurrir *in vivo* produciendo la oxidación de distintas biomoléculas, lo cual causa daños a los tejidos y muerte celular al afectar estructuras subcelulares^[2-4,7,8,11].

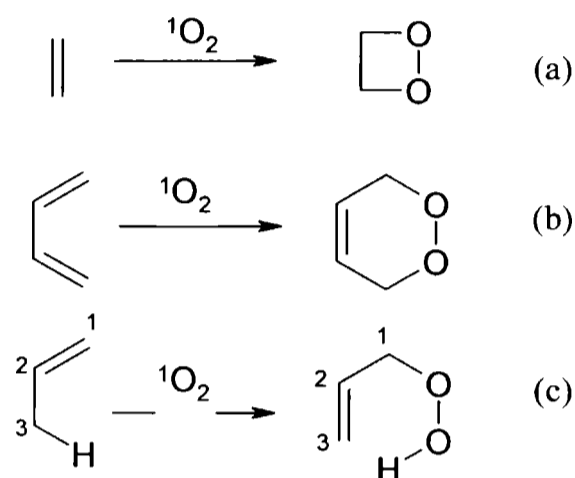


Figura 1.6: Reacciones típicas del $^1\text{O}_2$: (a) cicloadición [2 + 2], (b) cicloadición [2 + 4], (c) adición 1,3-eno.

Existen numerosas publicaciones relacionadas con el estudio de la reactividad del $^1\text{O}_2$ frente a distintas biomoléculas. En ellas, las purinas son compuestos heterocíclicos relacionados estructuralmente con las pterinas y por ello se hará un breve resumen de los antecedentes en el tema. En el esquema de la figura 1.7 se muestran las reacciones típicas de los derivados de la guanina^[12]. Las dos vías corresponden a adiciones [2 + 2] y [2 + 4], mencionadas anteriormente. En la mayoría de los trabajos publicados se describe, además, la formación de una gran variedad de productos, que derivan de la ruptura y apertura de los anillos de purina.

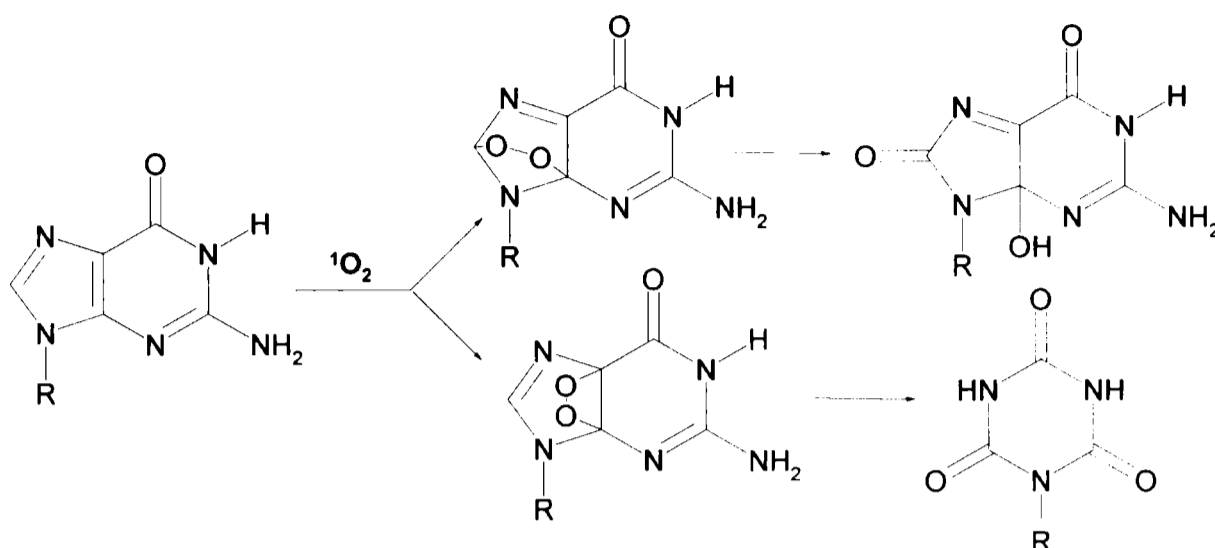


Figura 1.7: Reacciones típicas del $^1\text{O}_2$ con derivados de la guanina.

Debido a que las pterinas, tal como se explicará en el próximo capítulo, poseen grupos aminos, es interesante detenerse en las reacciones entre estos grupos funcionales y el $^1\text{O}_2$. Se sabe que las aminos son capaces de desactivar $^1\text{O}_2$ mediante mecanismos de transferencia de electrones^[13]. En la literatura se ha propuesto un mecanismo para este tipo de reacciones con aminos primarias y secundarias^[14]. El esquema de la figura 1.8 muestra las principales etapas, en donde se observa que el ataque del $^1\text{O}_2$ al nitrógeno transforma la amina ($-\text{CH}_2-\text{NH}-$) en un intermediario imina ($-\text{CH}=\text{N}-$), y por último, la hidrólisis de este intermediario en solución acuosa, produce la ruptura y oxidación de la amina.

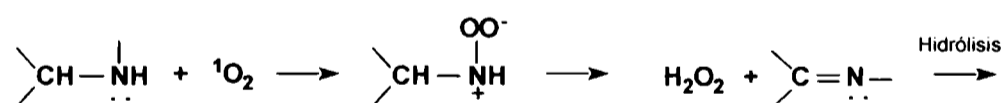


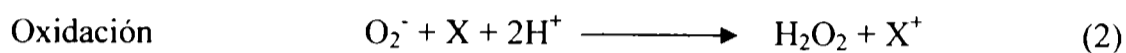
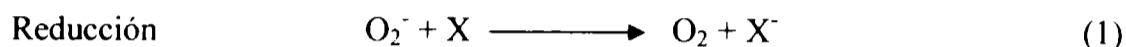
Figura 1.8: Reacciones típicas del $^1\text{O}_2$ con aminos primarias y secundarias.

1.4. Anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

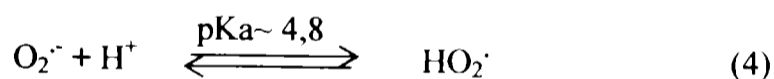
El anión superóxido, es un radical que puede ser generado por reducción parcial del O_2 , mediante la adición de un único electron. Teniendo en cuenta el diagrama de orbitales moleculares representado en la figura 1.3a, el electrón adicional se aloja en el orbital

antienlazante $\pi^*_{2p_z}$, consecuentemente, el orden de enlace se reduce a 1,5 y por lo tanto, se produce un alargamiento en la longitud del enlace O-O (1,21 Å y 1,33 Å longitud de enlace del O_2 y del O_2^- , respectivamente). El electrón adicional introduce un cambio en la multiplicidad de spin total de la molécula. En la molécula de O_2^- solo existe un electrón desapareado, y esto le confiere una multiplicidad igual a $2^{[5]}$.

Las principales formas de reaccionar que tiene el O_2^- se resumen en las siguientes ecuaciones:



Las dos últimas reacciones requieren la presencia de protones en el medio; por lo tanto, la reactividad del O_2^- es muy diferente según cuales sean las características del medio. En solventes no-proticos el O_2^- tiene una elevada reactividad, mientras que en solventes próticos su reactividad es muy pequeña. En agua, el O_2^- participa en el equilibrio ácido-base representado en la ecuación 4. La protonación del O_2^- genera otra especie denominada radical hidropéroxido (HO_2^\cdot), siendo esta especie es mucho más reactiva que el O_2^- [2, 5].



Teniendo en cuenta el valor de pKa observado para este equilibrio, podría suponerse que el O_2^- es una base débil, pero en realidad su basicidad efectiva, en solventes acuosos, es extremadamente alta. Esto se debe a que la especie HO_2^\cdot es removida rápidamente del medio, por medio de la reacción de desproporción. Por lo tanto, el O_2^- es capaz de desprotonar ácidos relativamente débiles:

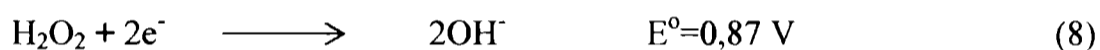


Por otra parte, en los péroxidos, el par de átomos de oxígeno tiene dos electrones adicionales comparado con el O_2 . Este par de electrones se localiza en los orbitales

antienlazantes π^*_{2p} , y hace que todos los electrones de estos orbitales estén apareados, convirtiendo a los peróxidos en compuestos diamagnéticos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede obtenerse a partir de diferentes peróxidos iónicos. Cuando se disuelven en agua las sales de los peróxidos iónicos, se obtiene H_2O_2 . En su forma pura, el H_2O_2 es un líquido incoloro y metaestable que posee propiedades físicas similares a las del H_2O . La longitud del enlace O-O es igual a 1,47 Å y posee cierta libertad de rotación alrededor de dicho enlace. El H_2O_2 puro puede descomponerse violentamente para dar H_2O y O_2 en presencia de trazas de metales o superficies rugosas:



Como todos los peróxidos, H_2O_2 es un buen oxidante que puede aceptar dos electrones para dar OH^- en soluciones alcalinas, o H_2O en soluciones ácidas:



El H_2O_2 también puede ser oxidada por un fuerte agente oxidante como permanganato, para dar O_2^- u O_2 . El H_2O_2 es capaz de oxidar compuestos orgánicos, particularmente en soluciones alcalinas. Algunas de las reacciones más importantes en las que participan son las reacciones de epoxidación e hidroxilación del alquenos, las oxidaciones de aminas y la formación de peroxiácidos e hidroperóxidos a partir de ácidos carboxílicos y otros compuestos orgánicos. La reactividad de H_2O_2 se incrementa por el agregado de catalizadores, en particular aquellos que contienen metales de transición.

1.4.1. Mecanismos de producción y posibles destinos de O_2^- y H_2O_2 *in vivo*.

Los organismos aeróbicos son capaces de producir O_2^- y H_2O_2 . Como se comentó anteriormente, estos procesos pueden clasificarse en dos grandes grupos^[2]:

Producción accidental: Esto involucra pequeñas “fugas” de electrones desde los diferentes sistemas transportadores de electrones (cadenas transportadoras de electrones mitocondriales, sistema citocromo p-450 microsomal, etc.), hacia el O_2 , para generar O_2^- .

Por ejemplo, en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, aproximadamente del 1 al 3% de los electrones escapan para formar $O_2^{\cdot-}$. Por otra parte, $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 pueden generarse por procesos de oxidaciones no enzimáticas en los cuales, compuestos tales como catecolaminas, tetrahydrofolatos, tetrahydrobiopterina y flavinas reducidas reaccionan directamente con el O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$. Como se puntualizó anteriormente, tanto el $O_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 pueden generarse fotoquímicamente. En efecto, $O_2^{\cdot-}$ puede producirse en mecanismos de transferencia de electrones desde moléculas electrónicamente excitadas por absorción de luz hacia el O_2 presente en el medio. Por otro lado, ambas especies pueden ser generadas en oxidaciones por O_2 de fotoproductos reducidos.

Síntesis deliberada: Aquí se incluye la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 por fagocitos activados, y de H_2O_2 por muchas enzimas de tipo oxidasas (glicolato oxidasa) y en la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. Existe evidencia que demuestra que el $O_2^{\cdot-}$ también es producido por otros tipos de células como los linfocitos y los fibroblastos.

Anteriormente se mencionó que la reactividad del $O_2^{\cdot-}$ depende fuertemente de la naturaleza del medio en el que se encuentra. Además se mostró que la protonación del $O_2^{\cdot-}$ genera otra especie, mucho más reactiva (HO_2^{\cdot}). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, en condiciones fisiológicas de pH (pH 7,4) sólo una pequeña fracción del $O_2^{\cdot-}$ se encuentra protonado. Existen numerosos ejemplos que ponen de manifiesto la diferencia en reactividad de estas dos ERO ($O_2^{\cdot-}$ y HO_2^{\cdot}) con diferentes biomoléculas: por ejemplo, HO_2^{\cdot} puede iniciar la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, mientras la reactividad del $O_2^{\cdot-}$ en este caso es despreciable.

El H_2O_2 por su parte, es muy poco reactivo en concentraciones por debajo de $1 \mu M$, mientras que a concentraciones mayores ($>50 \mu M$) puede atacar varios componentes celulares, y consecuentemente alterar el funcionamiento normal de las células. En el capítulo 3, se describirá un tipo de patología de la piel denominada vitiligo, en la cual el H_2O_2 tiene un papel fundamental.

1.5. Fotobiología y fotosensibilización.

La fotobiología estudia los procesos fotofísicos y fotoquímicos que ocurren en sistemas biológicos y sus consecuencias fisiológicas. Los fenómenos fotobiológicos se

inician, en general, por la absorción de luz por determinada molécula que actúa a modo de antena. Este primer acontecimiento provoca un cambio químico inicial que dispara una serie de reacciones bioquímicas que conducen, a su vez, a una respuesta fisiológica celular a la luz. Estos procesos, muchas veces, son complejos conjuntos de reacciones fotoquímicas y térmicas que están incluidos en la fisiología normal de gran cantidad de organismos vivos. Como ejemplos pueden mencionarse fenómenos tan importantes como la fotosíntesis, la captación de luz por parte de órganos fotosensibles y los mecanismos de defensa contra la radiación ultravioleta proveniente del sol. Otras veces, los procesos fotobiológicos son no deseados y aparecen involucrados en el desarrollo de patologías.

Un conjunto importante de reacciones involucradas en los procesos fotobiológicos son las reacciones de fotosensibilización. Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de luz por otra especie química denominada fotosensibilizador (o simplemente sensibilizador)^[15]. Los mecanismos de fotosensibilización son muy importantes en los sistemas biológicos, ya que están involucrados en distintos procesos fotobiológicos, muchos de ellos no deseados, relevantes desde el punto de vista médico. El caso más importante es, sin duda, la participación de reacciones fotosensibilizadas en la generación de cáncer de piel y en el desarrollo de otras enfermedades cutáneas tales como el vitiligo.

Se ha demostrado que la radiación solar es un agente genotóxico^[16]. La luz UV-A (320-400 nm) representa aproximadamente el 95% de la radiación UV proveniente del sol que incide sobre el hombre y se ha probado que es capaz de causar mutaciones y diferentes cánceres de piel. Sin embargo, la luz UV-A no es absorbida por el ADN y, por consiguiente, es incapaz de producir un daño directo al mismo. Las alteraciones sufridas por los ácidos nucleicos cuando son expuestos a luz UV-A *in vivo* se deben, en cambio, a reacciones fotosensibilizadas.

Existe un gran número de compuestos como las porfirinas, flavinas y otras moléculas distribuidas en las células, que pueden actuar como fotosensibilizadores endógenos del ADN y otras biomoléculas. Por otro lado, los fotosensibilizadores exógenos, provenientes de comidas y medicamentos, también pueden participar en las patologías de la piel inducida por la radiación.

1.5.1. Oxidaciones fotosensibilizadas.

Dentro de los procesos fotosensibilizados se encuentra un grupo de reacciones denominadas en su conjunto, *oxidaciones fotosensibilizadas*. En estas reacciones el O_2 presente en el medio oxida a un sustrato como consecuencia de la absorción de luz por otra sustancia, el sensibilizador. Debido a que las pterinas, tal como se comprobará en el desarrollo de este trabajo de tesis, pueden participar como sensibilizadores en oxidaciones fotosensibilizadas, estos procesos serán explicados con cierto detalle en esta sección.

Se conoce que un organismo puede morir al ser expuesto a la luz en presencia de O_2 y un sensibilizador (Sens) adecuado^[11]. Los efectos patológicos de la oxidación de constituyentes celulares pueden ser muy severos, incluyendo mutaciones y cáncer. Las oxidaciones fotosensibilizadas que ocurren en presencia de O_2 se esquematizan en la figura 1.9. El sensibilizador excitado ($Sens^*$) puede desactivarse mediante dos procesos competentes, según reaccione con el O_2 o no. Estos mecanismos fueron clasificados por C. S. Foote como fotooxidaciones de Tipo I y de Tipo II^[17].

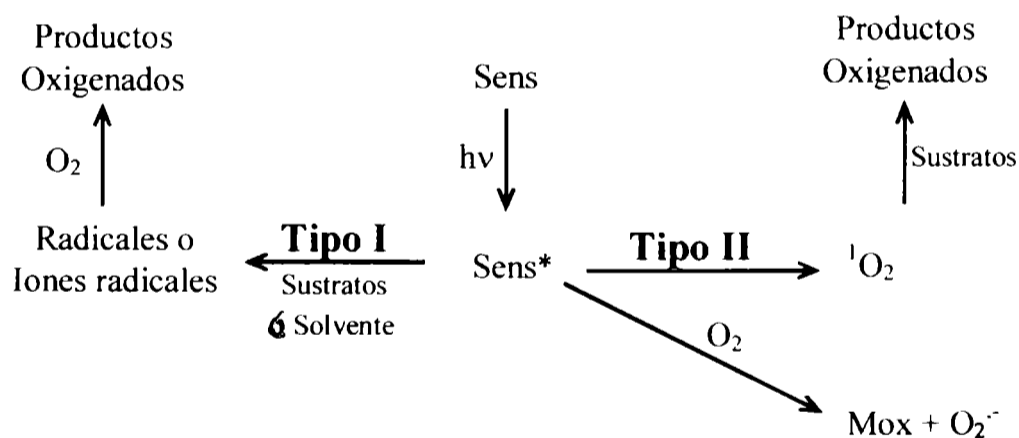
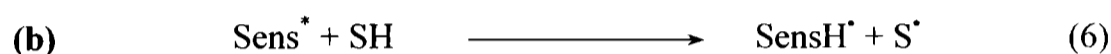
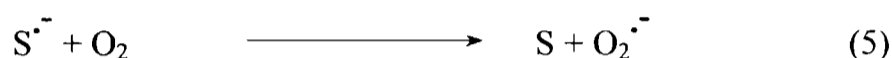
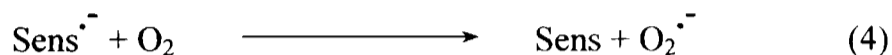
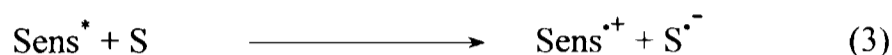


Figura 1.9: Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y de Tipo II.

$Sens^*$ puede ser un singlete o, más frecuentemente, un triplete. Puede reaccionar con el sustrato o el solvente (S) (mecanismo Tipo I) o con el O_2 (mecanismo Tipo II). El mecanismo de Tipo I involucra una transferencia de electrones (ecuaciones 2 a 5) o un proceso de abstracción de hidrógeno (ecuaciones 6 y 7), en donde se producen radicales o iones radicales por reacción del sensibilizador con el solvente o un sustrato. La transferencia puede ocurrir en las dos direcciones, pero generalmente $Sens^*$ se comporta

como oxidante. Los radicales aniones pueden, a su vez, generar (por reacción con el O₂) el O₂^{•-}, el cual puede por diversos mecanismos oxidar al sustrato (S). Los radicales generados por abstracción de un átomo de hidrógeno pueden, por su parte, reaccionar directamente con el O₂ para dar productos oxidados.



Reacciones que pueden ocurrir en fotooxidaciones de Tipo I. S representa una molécula del solvente o del sustrato. (a) Transferencia de electrones. (b) Abstracción de un átomo de hidrógeno.

El mecanismo de Tipo II consiste en la producción de ¹O₂ por procesos de transferencia de energía, explicados en la sección anterior. Luego, esta especie reacciona con el sustrato oxidándolo. Un ejemplo de este tipo de mecanismo de fotooxidación es el expuesto en la figura 1.7 para la oxidación de purinas por ¹O₂. Finalmente, en algunos casos, puede existir una transferencia de electrones desde el sensibilizador excitado hacia el O₂, generando una forma oxidada del sensibilizador y el anión superóxido. Esta especie reactiva puede, posteriormente, atacar a un sustrato y oxidarlo. Este mecanismo entra en la categoría de mecanismos de Tipo II, de acuerdo a la clasificación dada, debido a que el sensibilizador excitado reacciona directamente con el oxígeno.

1.6 Referencias.

- [1] Gilbert A. y Baggott J., "Essentials of Molecular Photochemistry", Blackwell Science (1991).
- [2] Valentine J- S-, Foote C. S., Greenberg A. y Liebman J. F., "Active Oxygen in Biochemistry", Editorial Blakie A & P (1995).
- [3] Rodríguez Capote K. y Céspedes Miranda E., *Rev. Cubana Invest. Biomed.*; **18** (2):67 (1999).

- [4] Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods D.B. Min and J.M. Boff
- [5] Foote C. S., Valentine J- S-, Greenberg A. y Liebman J. F., “*Active Oxygen in Chemistry*”, Editorial Blakie A & P (1995).
- [6] Murray, R. W., *Academic Press, New York*, pp. 59-114 (1979).
- [7] Henderson B. W. y Dougherty T. J., *Photochem. And Photobiol.*, **55**, 145, (1992).
- [8] Straight R. C. y Spikes J. D., “*Singlet O₂*”, **Vol. IV**, CRC Press, 85, (1985).
- [9] Armitage B., *Chem. Rev.*, **98**, 1171 (1998).
- [10] Nilsson R., Merkel P. B. Y Kearns D. R., *Photochem. and Photobiol.*, **16**, 117 (1972).
- [11] Stanier R. Y., Adelberg E. A. Y. Ingraham J. L., *Microbiología*, 4^{ta} Ed., Reverté, Barcelona (1984).
- [12] Sheu C. y Foote C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **115** 10446 (1993)
- [13] Darmanyan A. P., Jenks W. S. y Jardon P., *J. Phys. Chem. A*, **102**, 7420: erratum, *ibid.* 9308 (1998).
- [14] Gollnick K. y Lindner J. H. E., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1903 (1973).
- [15] Scaiano J. C., “*Handbook of Organic Photochemistry*”, CRC Press (1989).
- [16] Ravanat J., Douki T. y Cadet J., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **63**, 88, (2001).
- [17] Foote C. S., *Photochem. Photobiol.*, **54**, 659 (1991).

ASPECTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LAS PTERINAS

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Están presentes en prácticamente todos los seres vivos, pero, en general, en muy pequeñas cantidades. Estas moléculas desempeñan funciones muy diversas, participando en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia. Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se llevaron a cabo a fines del siglo XIX (1889). En estos trabajos, se reflejan los primeros intentos por aislar algunos pigmentos de diferentes clases de mariposas^[1-3]. Años más tarde, se dilucidó la estructura molecular de estos pigmentos, proponiéndolos como derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina^[4-6], al que finalmente se lo llamó pteridina^[7].

2.1. Estructura química y nomenclatura de las pteridinas.

Las pteridinas son una familia de compuestos heterocíclicos que tienen en común un doble anillo de diez átomos, cuatro de los cuales 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, y la numeración que reciben sus átomos. La molécula denominada pteridina propiamente dicha, que también se muestra en la figura 2.1, es la forma aromática y sin sustituyentes del doble anillo. El anillo I corresponde a la estructura de la pirimidina, mientras que el anillo II a la pirazina.

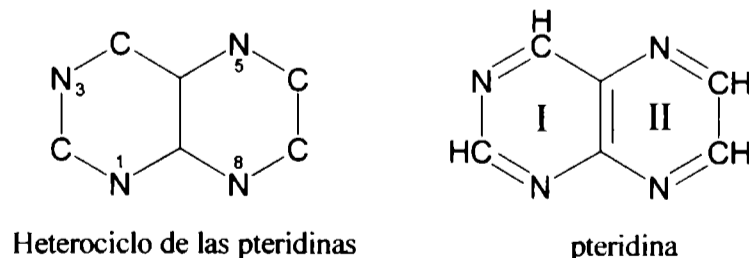


Figura 2.1: Estructura básica de las pteridinas. (I) Anillo pirimidínico (II) anillo pirazínico.

Las pteridinas presentes en los seres vivos (“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. 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. 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.

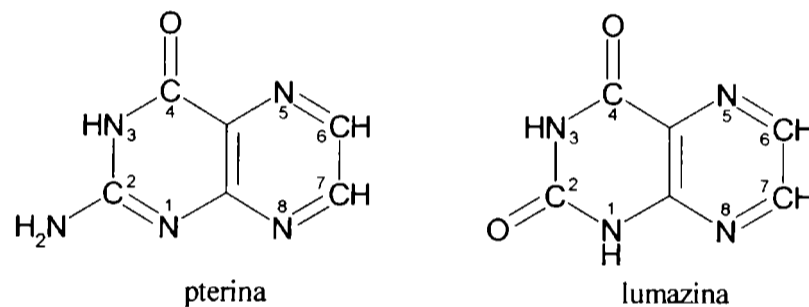


Figura 2.2: Estructura química de la pterina y la lumazina.

Como se dijo anteriormente, las pterinas poseen un átomo de oxígeno unido a un anillo con dos átomos de nitrógeno. Para uno de ellos el sustituyente está en posición α y para el otro en posición γ . Como puede apreciarse en la figura 2.3, esta estructura le confiere la posibilidad de formar diferentes tautómeros. Según los antecedentes que existen en la literatura, el tautómero preponderante es el que posee el átomo de hidrógeno en el nitrógeno más cercano al oxígeno (tautómero (2) de la figura 2.3)^[8,9]. Debido a esto, en todo el desarrollo de la tesis se representará a la pterina y sus derivados mediante su tautómero más estable. Sin embargo debe tenerse en cuenta que puede existir una mínima proporción de las otras dos formas tautoméricas.

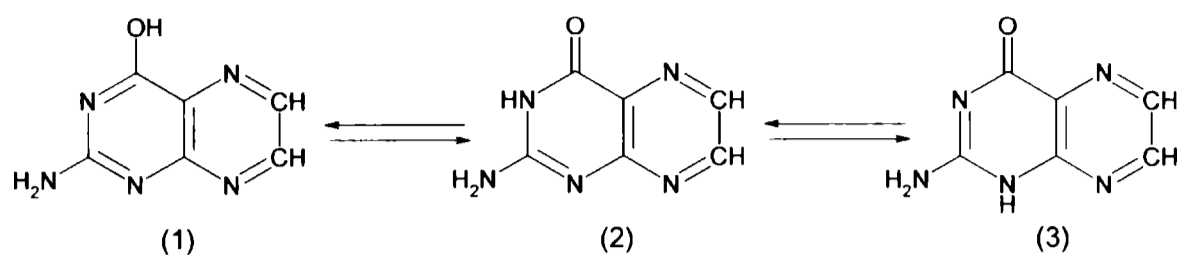


Figura 2.3: Posibles estructuras tautoméricas de las pterinas.

La mayor parte de las pterinas distribuidas en la naturaleza, presentan sustituyentes (-R) en la posición 6 del doble anillo pterínico. En la tabla 2.1 se presentan los sustituyentes de bajo peso molecular correspondientes a algunos de los derivados pterínicos más característicos.

-R	Compuesto
-CH ₃	6-metilpterina (MPT)
-CH ₂ OH	6-hidroximetilpterina (HPT)
-CHO	6-formilpterina (FPT)
-COOH	6-carboxipterina (CPT)
-CHOH-CHOH-CH ₃	Biopterina (BPT)
-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	Neopterina (NPT)

del Tabla 2.1: Nomenclatura de algunos derivados pterínicos según el sustituyente en la posición 6 del anillo.

Desde el punto de vista de su estructura química molecular, el ácido fólico (AF) puede ser considerado como un derivado pterínico (ver figura 2.4a). El AF contiene un doble anillo pterínico con un sustituyente en la posición 6; el cual es mucho más grande que los que presentan la mayoría de las pterinas naturales. En este sustituyente se pueden reconocer 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. En la figura 2.4b se representa la estructura química de otro derivado pterínico, el ácido N metil fólico

(MAF). La única diferencia entre ambos compuestos es un grupo metilo que está unido en al N 10 de la molécula de AF. Debido a estos sustituyentes, el AF y sus derivados presentan características fisicoquímicas y biológicas diferentes a las del resto de las pterinas.

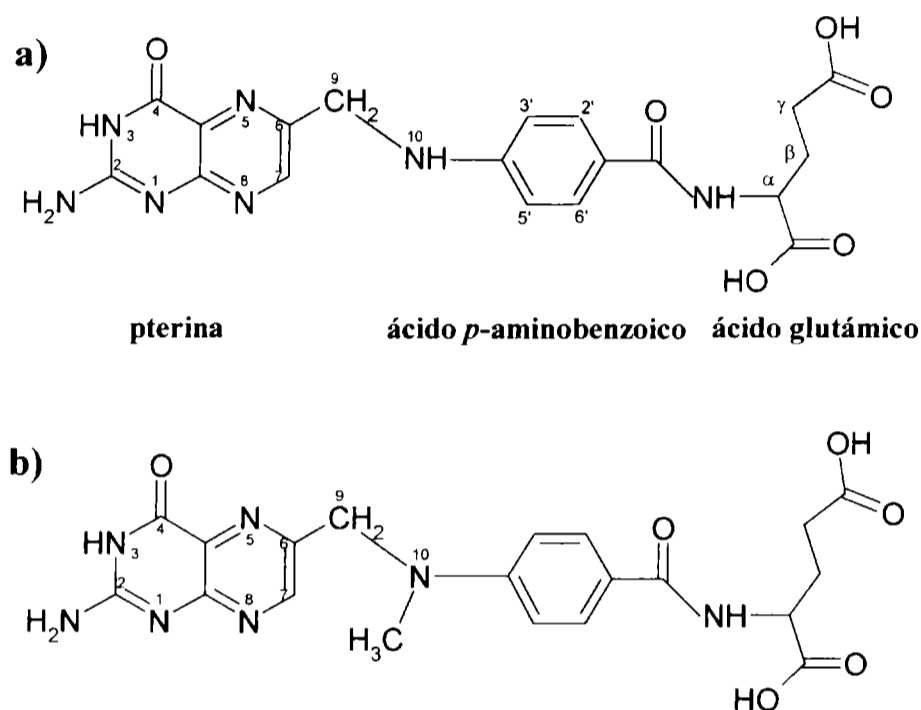


Figura 2.4: a) Estructura química del AF. b) Estructura química del MAF.

2.2 Propiedades ácido-base de las pterinas.

En el esquema de la figura 2.5 se muestra el equilibrio ácido-base más importante de las pterinas en solución acuosa, teniendo en cuenta los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida de este equilibrio corresponde a la forma neutra mostrada anteriormente (figura 2.2 y 2.3), cuyos equilibrios tautoméricos fueron descritos; la forma alcalina es un anión en el cual la carga negativa está localizada en una función fenolato.

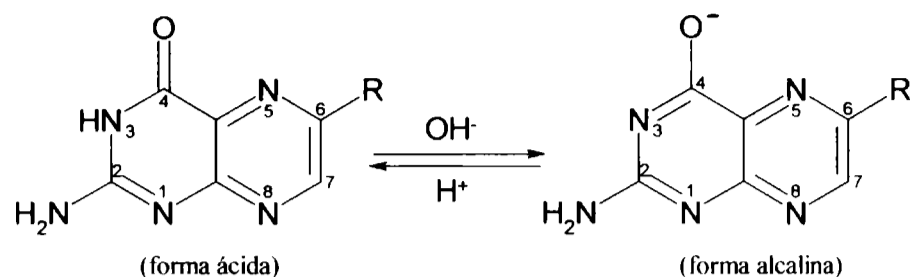


Figura 2.5: Equilibrio ácido-base del anillo pterínico en soluciones acuosas de pH entre 7 y 9.

En la literatura, existen numerosas publicaciones donde se presentan valores de las constantes de disociación de este equilibrio ácido-base, para distintos derivados pterínicos^[10-13] (tabla 2.2). De la información consignada en la tabla 2.2 puede evaluarse el comportamiento ácido-base general de estos compuestos. En todos los casos estudiados, el valor de pKa del equilibrio amida-fenolato, está alrededor de 8^[10,14-17]. Está claro que este comportamiento general se verá afectado por la presencia de sustituyentes adicionales en el doble anillo pterínico, los cuales modifican ligeramente los valores de pKa y la carga neta de la molécula. En el caso del AF, por ejemplo, la porción pterínica presenta el mismo grupo ionizable que el de las pterinas descritas anteriormente, pero la porción de ácido glutámico posee dos grupos ionizables adicionales (dos grupos carboxilatos cuyos pKa, en el ácido glutámico libre, son 2,19 y 4,25^[18], que le confieren a la molécula dos cargas negativas adicionales cuando el pH es mayor a las constantes de ionización de dichos grupos. Otro ejemplo, lo representa la CPT que posee un equilibrio adicional, con un pKa de aproximadamente 3^[14] debido al grupo carboxilo, que en condiciones de pH superiores a 3 le confieren a la molécula una carga negativa.

A valores de pH inferiores a 3, existen otros equilibrios ácido-base en los que participan otros grupos funcionales de la estructura pterínica, tales como los nitrógenos anulares o el grupo amino de la posición 2 del anillo. A medida que disminuye el pH, estos grupos comienzan a protonarse, apareciendo las correspondientes formas catiónicas con carga +2 y +3. Todos estos equilibrios presentan valores de pKa inferiores a 2^[10].

Todos los experimentos presentados en este trabajo de tesis, se llevaron a cabo en condiciones de pH comprendido entre 4 y 12. En estas condiciones, el único equilibrio ácido-base importante, es aquél que involucra al grupo amida y al fenolato (figura 2.5). En adelante, se hará referencia a estas dos formas ácido-base denominándolas “forma ácida” y “forma alcalina”, respectivamente.

Compuesto	pK _a
¹⁴ P _T	7,9
¹⁴ C _{P_T}	7,9
¹⁵ F _{P_T}	7,3
¹⁶ A _F	8,1
¹⁰ A _F	8,3
¹⁷ N _{P_T}	8,0
¹⁷ B _{P_T}	8,1

Tabla 2.2: pK_a del equilibrio amida-fenolato en las pterinas.

2.3 Importancia de las pterinas en la naturaleza.

Las pterinas están presentes en prácticamente todos los organismos vivos, incluidos los mamíferos, generalmente en muy pequeñas cantidades. Estas moléculas participan en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia^[19]; a tal punto, que la deficiencia de algunos de estos compuestos, produce serias alteraciones bioquímicas que conducen al desarrollo de graves enfermedades^[20]. El papel que desempeñan muchas pterinas no se conoce en detalle aún.

2.3.1 Ácido fólico y sus derivados reducidos.

El AF es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participan el AF y sus derivados, hacen que esta pterina sea una molécula indispensable para la vida de los mamíferos^[21]. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahidrofolato o THF (figura 2.6). Este derivado actúa como transportador de unidades de un solo átomo de carbono en una amplia gama de reacciones biosintéticas^[21]. Por ejemplo, participa en la síntesis de algunos aminoácidos naturales como metionina, glicina; también tiene un papel muy importante en la biosíntesis de los nucleótidos.

En condiciones de déficit de AF, la síntesis de nucleótidos se ve inhibida; y, como consecuencia de esto, las células no pueden replicarse. Así las células sanguíneas y la mucosa intestinal, que requieren de duplicación celular constante, se ven seriamente afectadas. Esta alteración en la síntesis de ácido desoxirribonucleico conduce a una patología con un cuadro morfológico característico en la sangre periférica y en la médula ósea, denominada anemia megaloblástica. Por otra parte, se produce una atrofia de la mucosa del tubo digestivo, que en casos avanzados, provoca un estado de malabsorción, lo cual intensifica el déficit primario de AF.

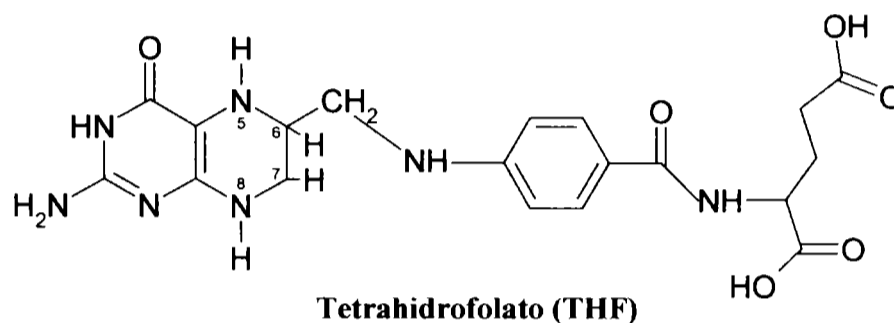


Figura 2.6: Estructura química del THF.

2.3.2. Tetrahydrobiopterina.

Otro derivado pterínico, que también participa en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores, es el denominado 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH_4), que es un derivado reducido de la BPT. La BPT participa en la transformación de fenilalanina (aminoácido esencial) en tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa^[21]. Esta enzima pertenece a la familia de las mono-oxigenasas, 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 (figura 2.7).

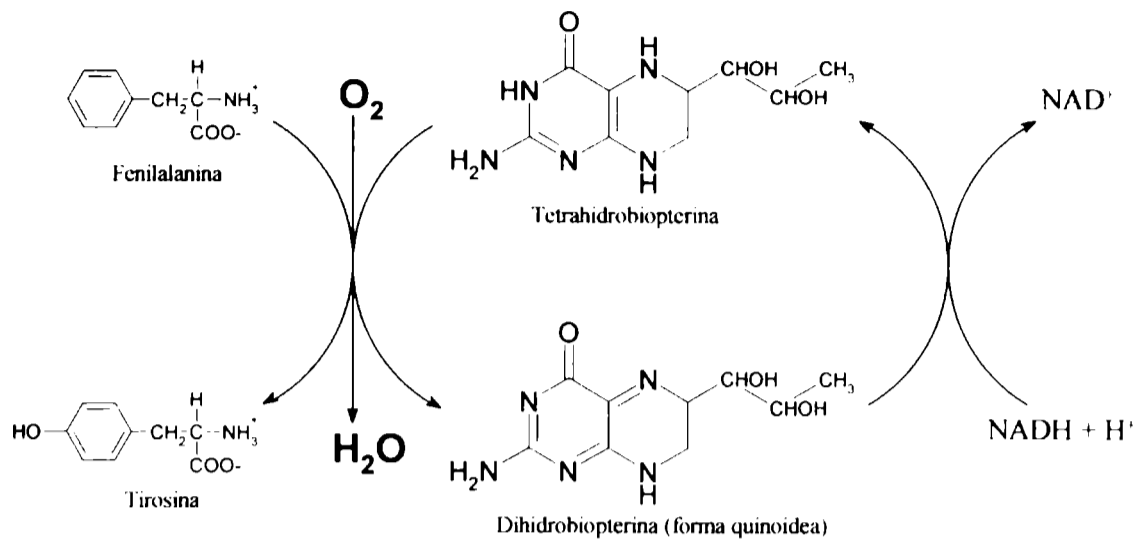


Figura 2.7: Participación de la tetrahidrobiopterina en la conversión de fenilalanina a tirosina.

2.3.3 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^[22]. 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 enzima sulfito oxidasa lograron caracterizarlo, postulándose la estructura que se muestra en la figura 2.8^[23]. 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.

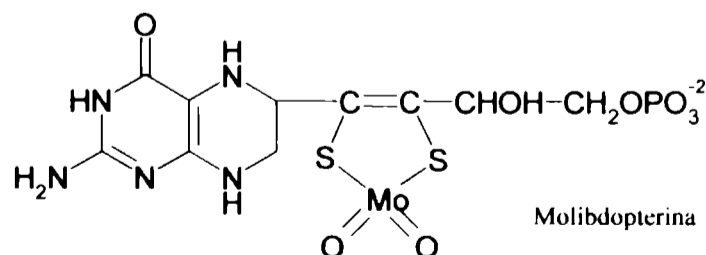


Figura 2.8: Estructura química postulada para el cofactor de la sulfito oxidasa.

2.3.4 Neopterina como marcador de la activación de la inmunidad celular.

Los linfocitos y los macrófagos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune celular que participa de los mecanismos de defensa del organismo contra enfermedades. Cuando los linfocitos-T reconocen antígenos en la superficie de las células de los tejidos, se activan y producen, entre otras citoquinas, el interferon- γ (INF- γ). El INF- γ estimula a los macrófagos; quienes a su vez sintetizan y liberan al medio, entre otras, sustancias como: EROs, factor de necrosis tumoral (TNF- α) y neopterina (NPT)^[24]. La NPT es un metabolito intermediario de la biosíntesis de la tetrahidrobiopterina, sintetizada a partir de guanosina trifosfato (GTP) por la GTP-ciclohidrolasa I^[25].

Investigaciones clínicas llevadas a cabo en la década de los 90' mostraron que la determinación de la concentración de NPT en distintos fluidos biológicos (suero, fluido cerebroespinal u orina) es una herramienta muy útil para el monitoreo de la respuesta inmunológica mediada por células^[26]. Se observó, por ejemplo, que los niveles séricos de NPT aumentan en la fase aguda de distintas infecciones virales tales como hepatitis A, B y C y sarampión. De la misma manera, se observó que infecciones por bacterias intracelulares (tuberculosis, lepra, etc) y parásitos intracelulares (malaria) cursan con un aumento de la concentración de NPT en suero. También se ha demostrado la utilidad de la determinación de NPT en fluidos biológicos en pacientes con trastornos óseos y articulares; y en otras patologías como enfermedades autoinmunes, tumores malignos, etc.

Si bien estos resultados indican que la NPT es un marcador inespecífico de respuesta inmunológica, es importante destacar que el aumento en los niveles de NPT, generalmente precede a los síntomas clínicos y correlacionan bien con la actividad de la enfermedad. Por lo tanto la medición de NPT es especialmente útil en el seguimiento y pronóstico de terapias aplicadas y del grado de avance o evolución del paciente. Además la NPT es un indicador sensible de las complicaciones inmunológicas tempranas, tales como los rechazos o infecciones en receptores de transplantes. También puede usarse como indicador del estrés oxidativo, ya que la concentración de NPT se correlaciona con productos de oxidación de proteínas y con la pérdida de antioxidantes como la vitamina-E, etc.^[27]. Una de las más importantes aplicaciones médicas que tiene la determinación de la concentración de NPT, es que puede ser utilizada como prueba de *screening* en bancos de

sangre como un indicador de activación inmune. En Austria, por ejemplo, existe una legislación desde 1994 que obliga a los bancos de sangre a realizar esta determinación.

2.3.5 Oncopterina.

Recientemente, se ha propuesto a un nuevo derivado pterínico, conocido como oncopterina (N^2 -(3-aminopropil)biopterina) (figura 2.9), como un posible marcador bioquímico de ciertos tipos de cáncer. Las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, muestran que en pacientes con hepatomas, cáncer de próstata y cáncer de vejiga, se producen grandes incrementos en la concentración de oncopterina en orina; mientras que en pacientes con distintos tipos de cáncer de sangre, como mielomas, leucemia mieloide aguda y linfomas, los incrementos son mucho menores. Por el contrario, la concentración de esta pterina conjugada es extremadamente baja en la orina de pacientes sanos^[28].

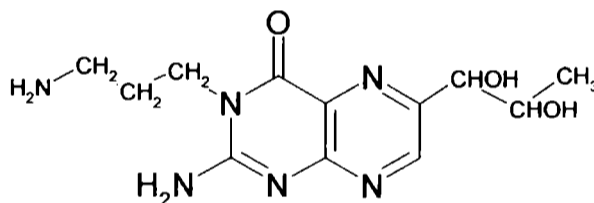


Figura 2.9: Estructura química de la oncopterina.

2.3.6 Pigmentos presentes en insectos.

Como se mencionó al principio de este capítulo, algunos pigmentos aislados de las alas de ciertas mariposas, estaban relacionados estructuralmente con esta familia de compuestos. En particular, el pigmento amarillo aislado de las alas de una mariposa denominada *brimstone* (azufre), es xantopterina. Por otra parte, otro derivado pterínico, leucopterina, es el pigmento blanco que forma parte de las alas de la mariposa de la col^[29,30]. Otro compuesto, isoxantopterina, es el pigmento amarillo que también ha sido aislado a partir de otra clase de mariposas^[31]. Las estructuras químicas de estos derivados se muestran en la figura 2.10. Investigaciones más recientes han revelado que pigmentos de otros colores presentes en una gran variedad de especies de mariposas son también de

naturaleza pterínica^[32]. La eritropterina, por ejemplo, fue aislada de mariposas tropicales sudamericanas^[33]; 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^[34].

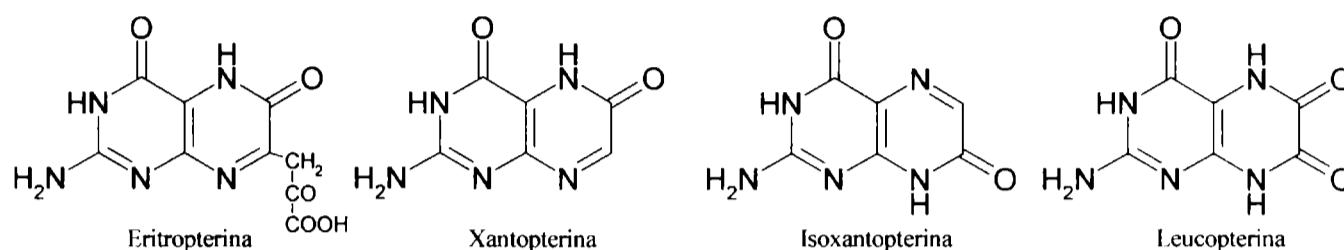


Figura 2.10: Estructura química de algunas pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.

2.4 Referencias.

- [1] Hopkins F. G.; *Proc. Chem. Soc.*, **5**, 117 (1889).
- [2] Hopkins F. G.; *Nature (London)*, **40**, 335 (1889).
- [3] Hopkins F. G.; *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*, **186**, 661 (1895).
- [4] Purrmann R.; *Liebigs Ann. Chem.*, **544**, 182 (1940).
- [5] Purrmann R.; *Liebigs Ann. Chem.*, **546**, 98 (1940).
- [6] Purrmann R.; *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 284 (1941).
- [7] Schöpf C., Reichert R. y Riefstahl K.; *Liebigs Ann. Chem.*, **548**, 82 (1941).
- [8] Brown D. J., Hoerger E. y Mason S. F.; *J. Chem. Soc.*, 211 (1955).
- [9] Albert A. y Barlin, G. B.; *J. Chem. Soc.*, 3129 (1962).
- [10] Albert A.; *Biochem. J.*, **54**, 646 (1953).
- [11] Albert A., Brown D. J. y Cheeseman G.; *J. Chem. Soc.*, 474 (1951).
- [12] Albert A. y Brown D. J.; *J. Chem. Soc.*, 74 (1953).
- [13] Albert A. y Wood H. C. S.; *J. appl. Chem.*, **2**, 591 (1952).
- [14] Monópoli V. D., Thomas A. H. y Capparelli A. L.; *International Journal of Chemical Kinetics*, **32**, 231-237 (2000).
- [15] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **135**, 147-154 (2000).
- [16] Thomas A. H., Feliz M. R. y Capparelli A. L.; *Transition Metal Chemistry*, **21**, 317-321 (1996).
- [17] Lorente C., Capparelli A. L., Thomas A. H., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 167 (2004).
- [18] Lehninger A. L.; “*Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*”, Ediciones Omega, Segunda Edición (1985).
- [19] Nichol C. A., Smith G. K. Y Duch D. S.; *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 729 (1985).
- [20] Rapaport S. I.; “*Introducción a la Hematología*”, Salvat, 2^{da} edición (1988).
- [21] Stryer L.; “*Biochemistry*”, W. H. Freeman and Company, 4^{ta} edición (1995).
- [22] Rajagopalan K. V., Johnson J. L., Wuebbens M. M., Pitterle D. M., Hilton J. C., Zurick T. R. y Garrett R. M. “*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 (1993).
- [23] Kramer S. P., Johnson J. L., Ribeiro A. A., Millington D. S. y Rajagopalan K. V.; *J. Biol. Chem.*, **262**, 16357 (1987).
- [24] Hevel J. M. y Marletta M. A.; *Biochem.*, **31**, 7160 (1992).

- [25] Werner et. al., (1990).
- [26] Fuchs D., Weiss G., Reibnegger G., Watchter H.; *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences*. **29**, (3) 307 (1992).
- [27] Murr C., Neurauder G., Wirleitner B., Fuchs D.; *International Eurogin-East conference* (2001).
- [28] Ogiwara S., Hidaka H., Sugimoto T., Teradaira R., Fujita K y Nagatsu T.; *J. Biochem.* **113**, 1 (1993).
- [29] Wieland H. y Schöpf C.; *Ber. Deut. Chem Ges.*, **58**, 2178 (1925).
- [30] Schöpf C. y Wieland H.; *Ber. Deut. Chem Ges.*, **59**, 2067 (1926).
- [31] Wieland H., Metzger H., Schöpf C. y Bülow M.; *Liebigs Ann. Chem.*, **507**, 261 (1925).
- [32] Pfeleiderer W. "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 (1993).
- [33] Schöpf C. y Becker E.; *Liebigs Ann. Chem.*, **524**, 49 (1936).
- [34] von Philipsborn W., Stierlin H. y Traber W.; *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2592 (1963).

FOTOBIOLOGÍA Y PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADORAS DE PTERINAS

Actualmente se sabe que algunas pterinas están involucradas en procesos fotoquímicos que ocurren *in vivo*. La mayoría de estos procesos fotobiológicos aún no se conocen en profundidad y no se sabe en detalle cuál es el papel que cumplen las pterinas. A continuación se describirán algunos ejemplos de procesos fotobiológicos en los cuales participan distintos derivados pterínicos.

3.1. Fotoliasa.

Es bien conocido el efecto mutagénico y letal que produce la irradiación directa con luz UV-C (200-280 nm) sobre las células. Esto explica los daños que produce la radiación UV sobre la piel del ser humano y la tendencia a generar cáncer de piel en las zonas expuestas. Muchos de estos fenómenos se originan como consecuencia del efecto que la radiación produce sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN). La presencia de las bases nitrogenadas en la estructura del ADN, hace que esta macromolécula absorba fuertemente la luz UV; en efecto, el ADN posee el máximo de absorción alrededor de los 260 nm.

Al irradiar una solución de ADN con luz UV-C, 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 son generadas principalmente por los mencionados 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 aparición de procesos neoplásicos.

Uno de los mecanismos principales que tiene la célula para reparar estos dímeros de pirimidina se denomina fotorreactivación^[1]. Este mecanismo, está regulado por la ADN-fotoliasa (o simplemente fotoliasa). Esta enzima contiene dos cofactores unidos de forma permanente a su estructura proteica^[2,3]. 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). Se ha propuesto que este derivado pterínico cuando absorbe luz UV desencadena una serie de modificaciones en la enzima que terminan activándola, iniciando los mecanismos de reparación antes mencionados.

3.2. Pterinas como fotorreceptores.

En general, se llaman fotorreceptores a sustancias que están incluidas, 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. Debido a las características espectrales de las pterinas y a su amplia distribución en órganos fotosensibles de una gran variedad de seres vivos, se ha postulado que estos compuestos podrían actuar como fotorreceptores en muchos procesos biológicos.

Se han encontrado algunos derivados pterínicos en órganos fotosensibles como los ojos de vertebrados e invertebrados^[4]. En particular, la pterorrodina fue aislada en cantidades considerables de varios insectos y anfibios y parece estar ampliamente distribuida en el reino animal^[5-8]. Esta sustancia de un color rojo muy intenso consta en su estructura, mostrada en la figura 3.1, de dos moléculas de xantopterina unidas por un puente de un átomo de carbono. Otro interesante grupo de pterinas naturales fue descubierto en los ojos de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta)^[9-11]. Se trata de las drosopterinas cuya estructura básica se muestra también en la figura 3.1.

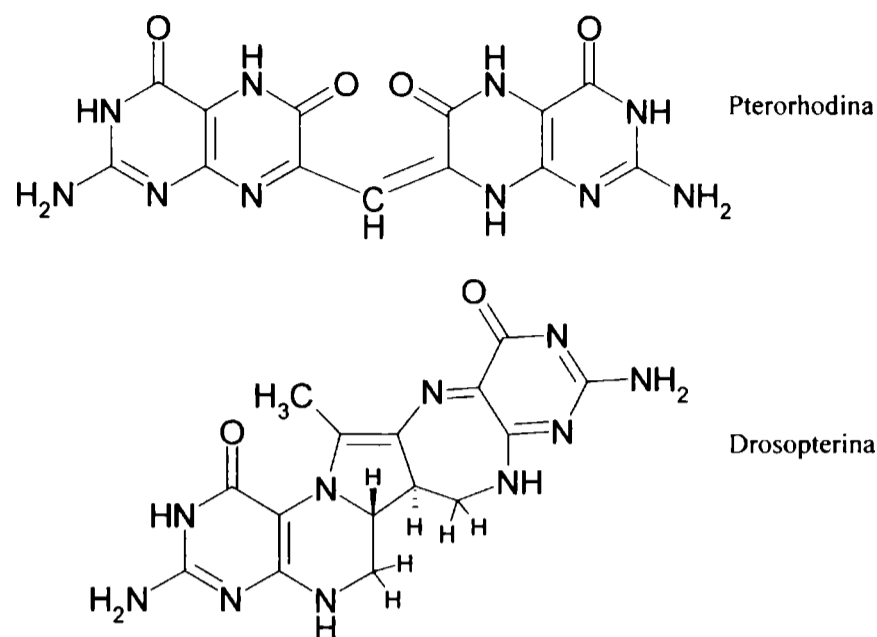


Figura 3.1: Estructura química de algunos derivados pterínicos encontrados en los ojos de ciertos insectos y anfibios.

Ha sido propuesto que ciertos derivados pteridínicos podrían participar en algunas etapas de la fotosíntesis^[12] y que otros pueden actuar como antenas para la luz azul en las plantas superiores^[13] y otros organismos tales como el hongo *Phycomyses blakesleanus*^[14]. Por último, fue postulada la participación de las pterinas como fotorreceptores en procesos de fototaxis presentes en *Euglena gracilis*^[15-17].

3.3. Fotosensibilización de biomoléculas.

En el capítulo 1 se definieron los procesos fotosensibilizados y se comentó la importancia de la fotosensibilización del ADN en sistemas biológicos expuestos a la luz. Se han realizado diversos trabajos que demuestran que las pterinas son capaces de actuar como fotosensibilizadores del ADN y sus componentes. Por consiguiente, estos estudios sugieren la posibilidad de que los derivados pterínicos presentes en la piel de los seres humanos pueden participar en procesos fotosensibilizados *in vivo*. En esta sección se resumirán los resultados más significativos de estos trabajos.

3.3.1. Fotosensibilización de desoxirribonucleótidos por pterina.

Existen antecedentes en la literatura sobre estudios de fotosensibilización de desoxirribonucleótidos, usando pterina (PT) como sensibilizador^[18]. En particular, se han realizado estudios sobre tres nucleótidos (2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP), 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP)).

Se realizaron experimentos en los cuales soluciones acuosas con PT y un nucleótido, se irradiaron con luz UV-A. En estas condiciones, como puede observarse en la figura 3.2, la radiación sólo es absorbida por PT. Los resultados revelan la existencia de oxidaciones fotosensibilizadas en las cuales el nucleótido es oxidado, con consumo del O₂ disuelto en el medio, mientras que la concentración de PT se mantiene constante con el tiempo de irradiación. La velocidad del proceso depende de la naturaleza del nucleótido utilizado. Por ejemplo, dGMP es rápidamente oxidada cuando se irradia con luz UV-A en presencia de PT. Por su parte, dAMP es oxidada mucho más lentamente, mientras que dCMP no sufre ningún tipo de alteración.

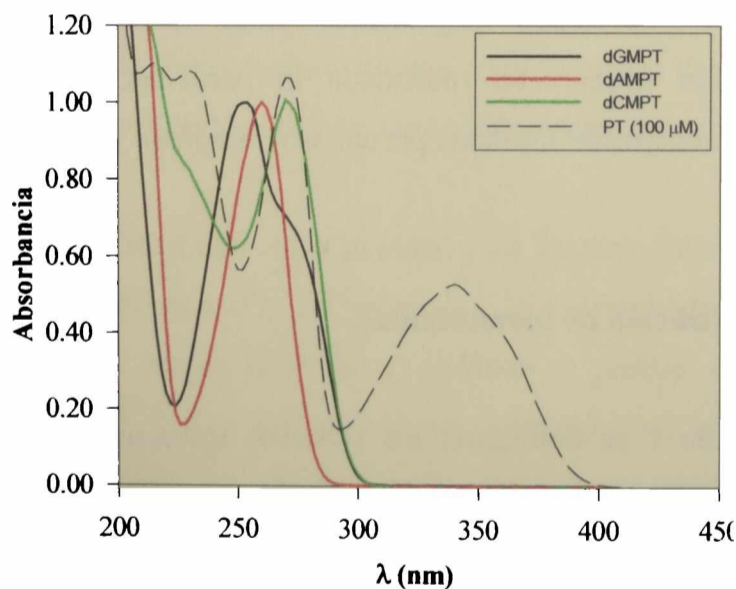


Figura 3.2: Espectro de absorción normalizados de los tres desoxinucleótidos (dGMP, dAMP y dCMP), junto con el espectro de absorción de una solución de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$).

3.3.2. Fotosensibilización de ADN.

✓ Fotosensibilización del plásmido pUC18 por PT.

Por otra parte, también hay antecedentes en la literatura acerca de la capacidad fotosensibilizadora de PT sobre macromoléculas biológicas como el ADN. En particular, se han descrito estudios de fotosensibilización bajo irradiación con luz UV-A (350 nm) del plásmido pUC18, usando PT como fotosensibilizador^[18,19]. El plásmido pUC18 es una molécula de ADN circular de doble hebra y bajo peso molecular. En la figura 3.3 se muestran los espectros de absorción de ambos compuestos. Puede apreciarse que en las condiciones de irradiación, el único compuesto capaz de absorber la radiación incidente es PT.

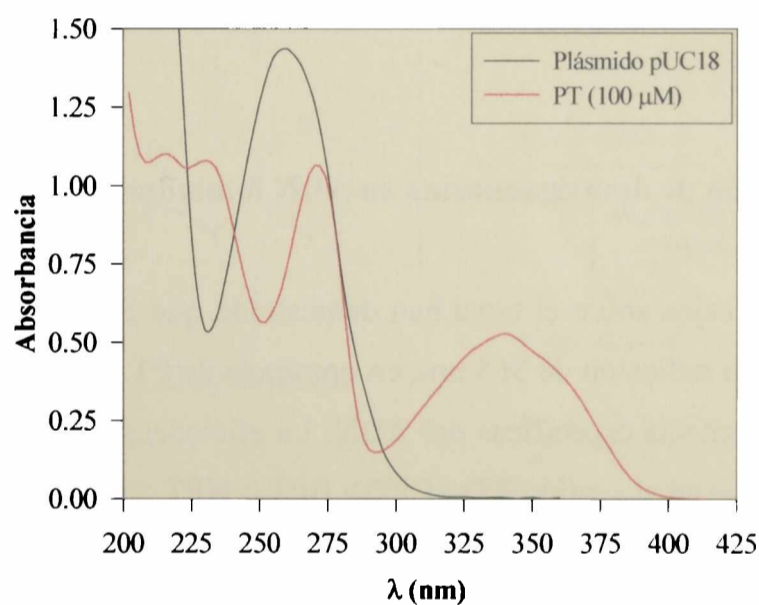


Figura 3.3: (—) Espectro de absorción del plásmido pUC18. (—) Espectro de absorción de una solución de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$).

En este trabajo, los autores demuestran que, cuando se irradia con luz UV-A (350nm) soluciones de plásmido pUC18 en presencia de PT, las moléculas de ADN sufren cortes al azar en sus hebras. Estos cortes conducen a la transformación del topoisómero superenrollado al topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes genera, en una segunda etapa, un corte en la doble hebra con la consiguiente transformación del plásmido

circular en una molécula lineal. Este proceso está representado esquemáticamente en la figura 3.4.

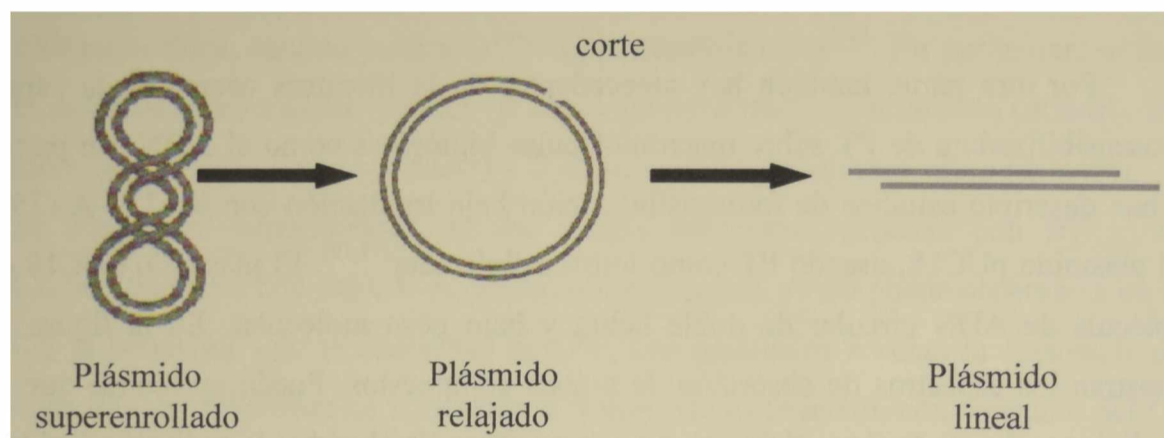


Figura 3.4: Esquema que representa la evolución de la estructura del plásmido pUC18 con el tiempo de irradiación en presencia de PT.

✓ **Hidroxilación de desoxiguanosina en ADN fotoinducida por derivados pterínicos.**

Otros trabajos sobre el tema han demostrado que la exposición de ADN eucariota de doble hebra, a radiación de 365 nm, en presencia de PT, CPT, BPT, NPT y AF produce lesiones en secuencias específicas del ADN. La eficiencia del daño al ADN inducida por luz UV-A decrece en el sentido $PT \approx CPT > BPT \approx NPT \gg AF$ ^[20].

En estos estudios, se demostró que las pterinas producen oxidaciones y ruptura en secuencias que incluyen varias guaninas consecutivas (secuencias poli-G: 5'-GG-3', 5'-GGG-3' y 5'-GGGG-3'). Este daño fotoinducido al ADN consiste en una oxidación fotosensibilizada tipo I (ver sección 1.5.1) que involucra una transferencia de electrones desde la guanina a la pterina excitada^[21]. El mecanismo de fotosensibilización propuesto puede resumirse de la siguiente manera: El sensibilizador (Sens = PT, CPT, BPT o NPT) excitado oxida el nucleótido por medio de un proceso de transferencia de electrones. El catión radical de la guanina (G^+) formado, sufre una migración de cargas localizando la carga en una G adyacente. La descomposición del G^+ puede seguir dos vías paralelas: una es la deprotonación seguida de la reacción con O_2 ; y la otra puede ser la hidratación produciendo 8-oxo-Guo. Por otra parte, el anión radical del sensibilizador formado, puede

oxidarse y regenerar el sensibilizador, por medio de una transferencia de electrones al O_2 produciendo anión superóxido, y/o puede degradarse. En el esquema de la figura 3.5 se presenta este mecanismo de fotosensibilización.

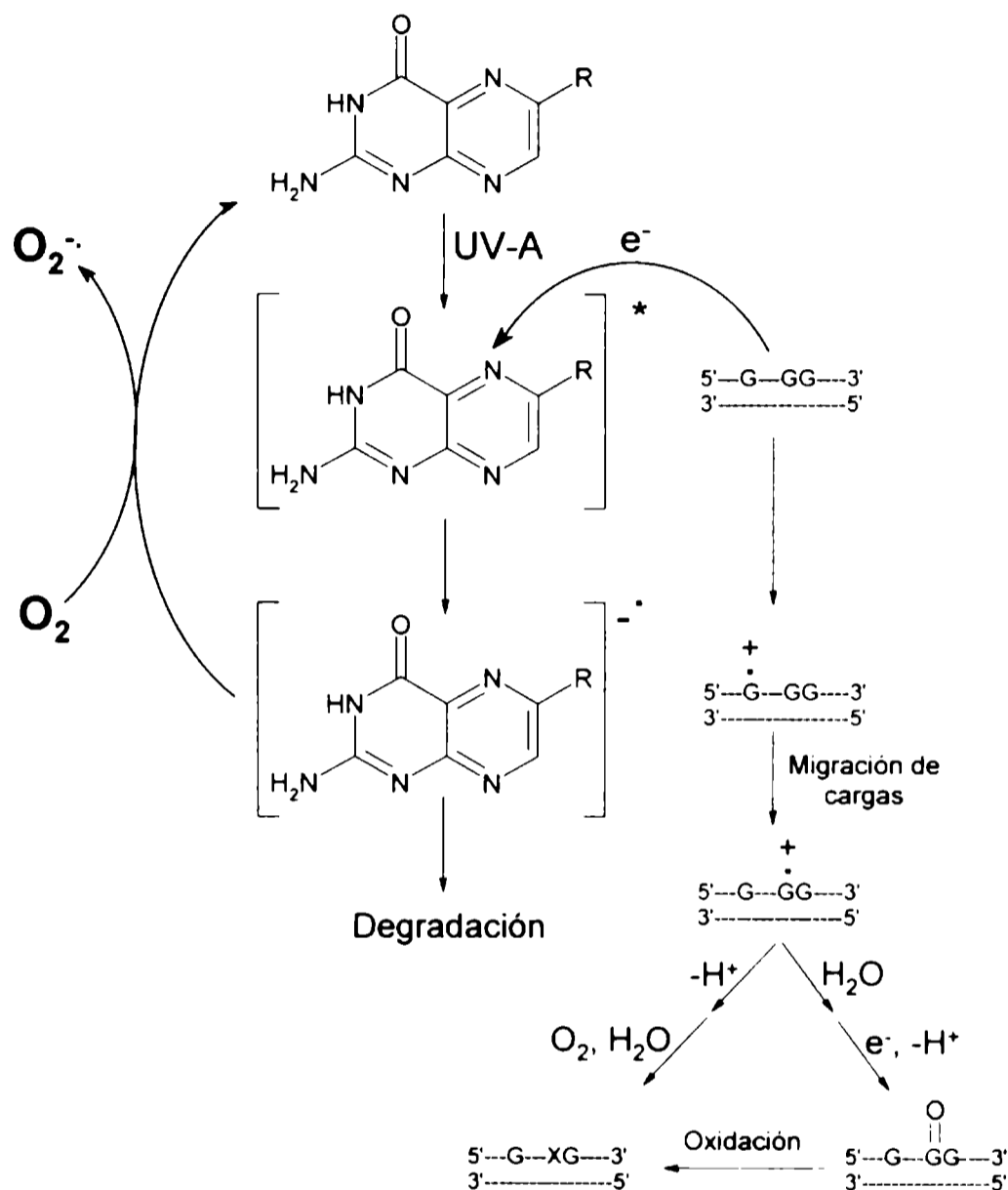


Figura 3.5: Mecanismo de fotosensibilización de secuencias poli-G en ADN eucariota por luz UV-A, donde el fotosensibilizador es un derivado pterínico.

✓ **Fotosensibilización del ADN por pterinas reducidas.**

Por último, se ha demostrado que la sepiapterina (SPT), un derivado reducido de las pterinas (figura 3.6), fotoinduce lesiones en secuencias específicas del ADN similares a las observadas para los derivados pterínicos oxidados. En este caso, las lesiones de ADN

fotoinducidas por SPT se ven significativamente aumentadas con el agregado de Cu (II). Por otro lado, cuando se agrega catalasa y batocuproína (un agente quelante del Cu(I)) a las soluciones con ADN y SPT, se observa una inhibición del daño fotoinducido. Estos resultados indican la participación de H₂O₂ y Cu(I) en estos procesos^[21]. En base a estos resultados, se especula que SPT excitada por la absorción de luz UV-A, reacciona con O₂ para generar anión superóxido^[22], con la subsiguiente formación de H₂O₂, y las especies reactivas generadas en la reacción del H₂O₂ con Cu(I) causan el daño fotoinducido al ADN.

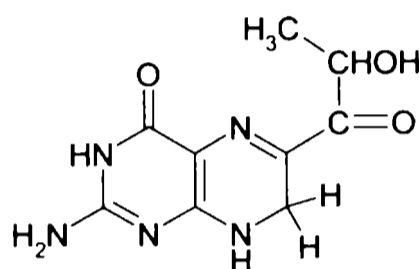


Figura 3.6: Estructura química de sepiapterina (SPT).

3.4. Vitiligo.

El vitiligo, una de las patologías cutáneas más frecuente en el ser humano, consiste en un desorden en la pigmentación que produce características manchas blancas sobre la piel. Los pacientes que sufren esta enfermedad, muestran fluorescencia en sus manchas cutáneas cuando son sometidos a la denominada examinación con luz de Wood (351 nm). Se ha demostrado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas en las zonas afectadas por la enfermedad^[23,25]. Es interesante comentar el papel que juegan varios derivados pterínicos en el vitiligo.

Para entender los mecanismos implicados en la formación de las lesiones de esta enfermedad es necesario presentar algunas reacciones metabólicas. En el esquema de la figura 3.7 se muestran dichas reacciones. Se mencionó anteriormente que la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄) es un cofactor de la enzima fenilalanina hidroxilasa que cataliza la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina (i). La tirosina es un sustrato fundamental en la síntesis de melanina (proceso conocido como melanogénesis) que ocurre en los melanocitos de la piel. Por otra parte, BH₄ es también un inhibidor no competitivo de una de las enzimas más importantes en la melanogénesis, la tirosinasa (ii). El radical anión

superóxido, generado por la absorción de luz UV-B, es un sustrato de la tirosinasa que oxida el BH₄, activando de esta manera a la enzima. En esta etapa, BH₄ se oxida a BPT, que es extremadamente citotóxica para los melanocitos humanos *in vitro*. Consecuentemente, para asegurar la viabilidad de éstas células, un mecanismo muy eficiente de reducción recupera la BH₄. Esta reducción es catalizada enzimáticamente y ocurre en dos etapas: primero la reducción de BPT a qBH₂ catalizada por la enzima tiorredoxina reductasa (TR). En la segunda etapa, un conjunto de enzimas NADH-dependientes reducen BH₂ a BH₄ (iii y iv). Si éste mecanismo de reducción de la BPT no es adecuado, éste compuesto se acumula en la piel siendo rápidamente fotooxidado a FPT por exposición a radiación de luz UVA y UVB (v).

La manifestación clínica de éste desorden es la pérdida de la coloración de la piel, con una fluorescencia característica de la misma atribuida a la acumulación de pterinas. Debido a esto los melanocitos poseen las vías metabólicas para la síntesis y reciclado de la BH₄. En pacientes con vitiligo los melanocitos presentan alteraciones en el metabolismo que conducen a la acumulación de BH₄, la generación de H₂O₂ y a la inhibición de la síntesis de melanina. La BH₄ se oxida a BPT por reacción tanto con el O₂ como con el H₂O₂. Finalmente, se produce una acumulación de BPT en zonas de la piel con déficit de pigmentación y, por ende, sin protección contra la radiación proveniente del sol.

En definitiva, todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos que sufre la BPT, y otros derivados pterínicos que pudieran estar presentes en la piel, en soluciones acuosas pueden ocurrir en las zonas afectadas de la piel de los pacientes con vitiligo. Se ha demostrado, recientemente, que la BPT se transforma *in vivo* en FPT y este compuesto, a su vez, se transforma en CPT (v y vi)^[26]. Estas transformaciones generan, además, H₂O₂ como producto de fotólisis, incrementando los efectos nocivos de este compuesto.

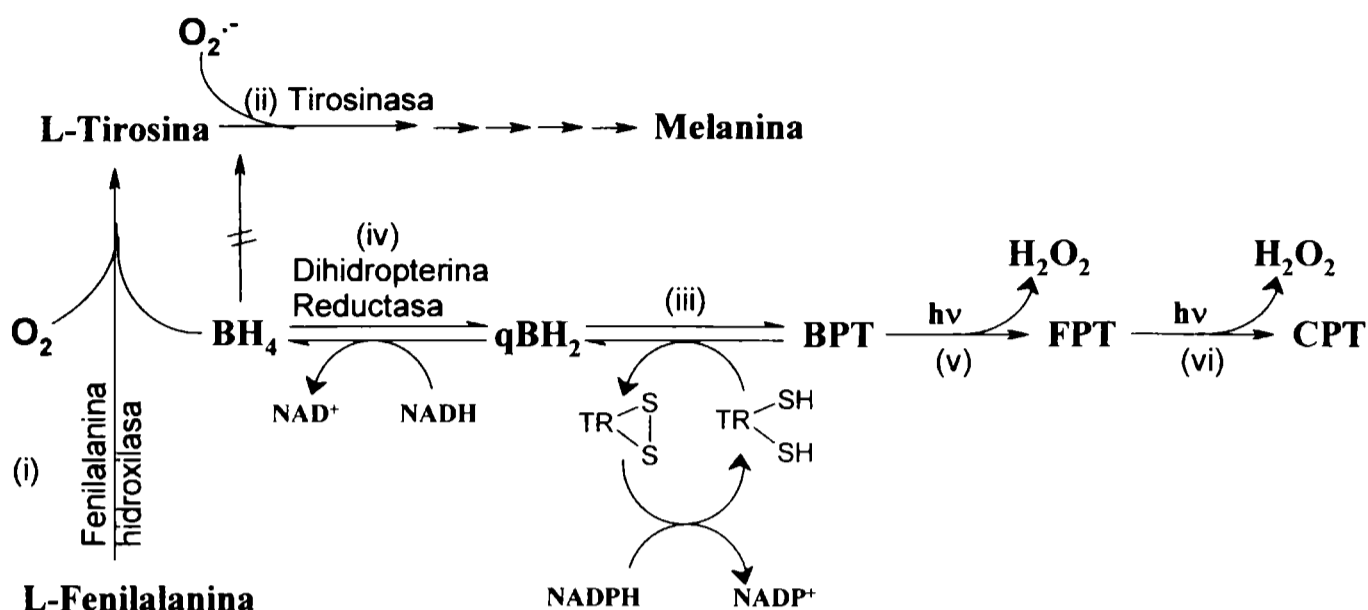


Figura 3.7: Reacciones enzimáticas y fotoquímicas involucradas en la generación de las lesiones cutáneas del vitiligo.

3.5 Referencias.

- [1] Kelner A.; Proc. Natl. Sci. U.S.A., **35** (1949).
- [2] Sancar A. y Sancar G. B.; Annu. Rev. Biochem., **57**, 29 (1988).
- [3] Johnson J. L., Hamm-Alvarez S., Payne G., Sancar G. B., Rajagopalan K. V. y Sancar A.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **85**, 2046 (1988).
- [4] Pirie A. y Simpson D. M.; Biochem. J., **40**, 19 (1946).
- [5] Pfeleiderer W.; Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, Edit., Ayling J. E., Nair M. G. y Baugh M.; Plenum Press (1993).
- [6] Kühn A. y Egelhaf A.; Z. Naturforsch., **14b**, 654 (1959).
- [7] Viscontini M., Hummel W. y Fischer A.; Helv. Chim. Acta, **53**, 1207 (1970).
- [8] Misuraca G., Prota G., Bagnara J. T. y Frost S. K.; Comp. Biochem. Physiol., **57B**, 41 (1977).
- [9] Lederer M.; Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., **15**, 273 (1940).
- [10] Viscontini M., Hadron E. y Karrer P.; Helv. Chim. Acta, **40**, 579 (1957).
- [11] Scwuink I. y Manzini M.; Arch. Genetik, **46**, 41 (1973).
- [12] Fuller R. C., Kidder G. W., Nugent N. A., Dewey V. C. y Rigopoulos N.; Photochem. Photobiol., **14**, 359 (1971).
- [13] Maier J. y Ninnemann H.; Photochem. Photobiol., **61**, 43 (1995).
- [14] Hohl N., Galland P. y Senger H.; Photochem. Photobiol., **55**, 239 (1992).
- [15] Galland P, Keiner P., Dörmemann D., Senger H., Brodhun B. y Häder D. P.; Photochem. Photobiol., **51**, 675 (1990).
- [16] Schmidt W., Galland P., Senger H. y Furuya M.; Planta, **182**, 375 (1990).
- [17] Brodhun B. y Häder D. P.; Photochem. Photobiol., **52**, 865 (1990).
- [18] Lorente C.; "Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa" Tesis Doctoral (2003).
- [19] Lorente C., Thomas A. H., Villata L. S., Hozbor D., Lagares A. y Capparelli A. L.; Pteridines, **11**, 100 (2000).
- [20] Ito K. y Kawanishi S.; Biochemistry, **36**, 1774 (1997)
- [21] Hirakawa K., Suzuki H., Oikawa S. y Kawanishi S.; Archives of Biochemistry and Biophysics **410** 261-268 (2003).

- [22] Foot C. S., *Photochem. Photobiol.*, **54**, 659 (1991).
- [23] Schallreuter K. U., Büttner G., Pittelkow M. R., Wood J. M., Swanson N. N. y Körner C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 43 (1994a).
- [24] Schallreuter K. U., Wood J. M., Lemke K. R., Pittelkow M. R., Lindsey N. J., Gütlich M. y Ziegler I.; *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 1226 (1994b).
- [25] Schallreuter K. U., Wood J. M., Pittelkow M. R., Gutlich M., Lemke K. R., Rodl W., Swanson N. N., Hitzemann K. y Ziegler I.; *Science*, **263**, 1444 (1994c).
- [26] Rokos H., Beazley W. D. y Schallreuter K. U.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 805 (2002).



FOTOFÍSICA Y FOTOQUÍMICA DE PTERINAS

4.1 Espectros de absorción.

Se ha descrito en la literatura el análisis espectral de un gran número de derivados pterínicos en soluciones acuosas. Las características de los espectros de absorción de estos compuestos dependen de varios factores: si son o no pterinas reducidas, de la naturaleza química del o los sustituyentes al doble anillo pterínico y de las condiciones de pH del medio. En esta sección se hará una breve descripción de las principales características de los espectros de las pterinas oxidadas 6-sustituidas en solución acuosa.

Como ya se mencionó en el capítulo 2, de acuerdo al pH de la solución las pterinas presentan distintas formas ácido-base. En el intervalo de pH comprendido entre 4 y 13 todas ellas comparten un equilibrio ácido-base común, que involucra los mismos grupos funcionales (ver figura 2.5, capítulo 2). Estas formas ácido-base presentan características espectrales diferentes^[1-7].

El doble anillo pterínico presenta dos bandas principales de absorción, una banda en el intervalo de longitudes de onda 220 a 290 nm con coeficientes de absorción molar relativamente altos, entre 1×10^4 y $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y la otra, con un máximo cercano a los 350 nm, con menor coeficiente de absorción molar, entre 5×10^3 y $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Estos espectros indican la presencia de, al menos, dos estados electrónicos singletes excitados. También se observa un corrimiento de ambas bandas de absorción de la forma alcalina respecto de la correspondiente a la forma ácida. La banda de menor energía está desplazada hacia el visible (a mayores longitudes de onda) y la banda de mayor energía está desplazada hacia el ultravioleta (a menores longitudes de onda). Por último, las formas alcalinas tienen coeficientes de absorción mayores que las formas ácidas para ambas bandas. En la figura 4.1 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de absorción de las formas ácido-base de PT.

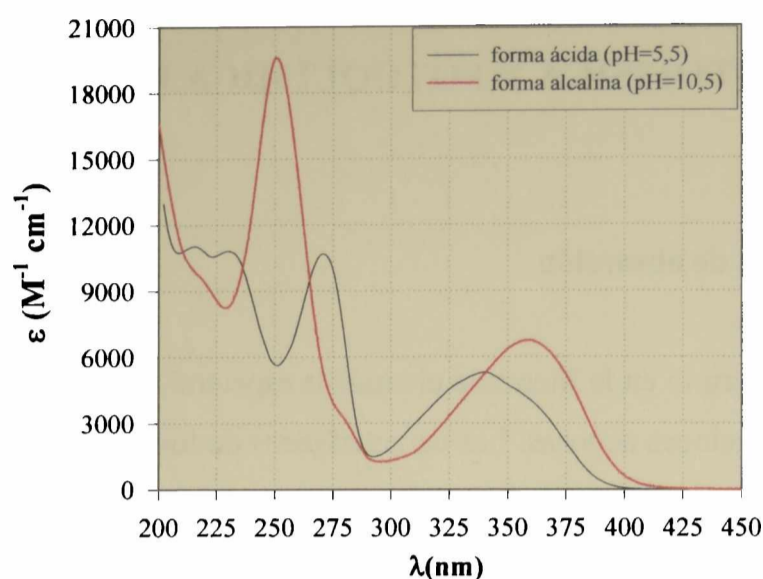


Figura 4.1: Espectros de absorción de PT en solución acuosa.

Por otra parte, el análisis espectrofotométrico del AF merece una descripción por separado, más detallada. Este compuesto, como se mencionó anteriormente, es una pterina en la cual pueden reconocerse tres porciones: una porción pterínica, otra de ácido glutámico (un aminoácido) y otra de ácido *p*-aminobenzoico o PABA (capítulo 2, figura 2.4). Los espectros de las formas ácida y alcalina del AF se muestran en la figura 4.2. La forma ácida del AF presenta carga neta -2 y la forma alcalina -3. Puede apreciarse que el espectro de la forma alcalina presenta tres bandas de absorción. Esta característica particular puede explicarse teniendo en cuenta al grupo bencénico sustituyente que presenta esta pterina. En efecto, las bandas con máximo en 255 y 350 nm se asignan al anillo pterínico, mientras que la banda con máximo en 285 nm puede ser asignada al PABA. En la forma ácida pareciera desaparecer una banda. En realidad, si se supone que la banda de 255 nm sufre un corrimiento similar al observado para otras pterinas al pasar de la forma ácida a la alcalina y que, por el contrario, la banda de 285 nm no se altera, ambas bandas deberían superponerse. El escaso aumento de los coeficientes de absorción de las bandas superpuestas respecto a los correspondientes a ambas bandas presentes en la forma alcalina, puede explicarse considerando que, tal como se observa para otras pterinas, la banda de 255 nm debe sufrir una pérdida de intensidad al pasar a la forma ácida^[8].

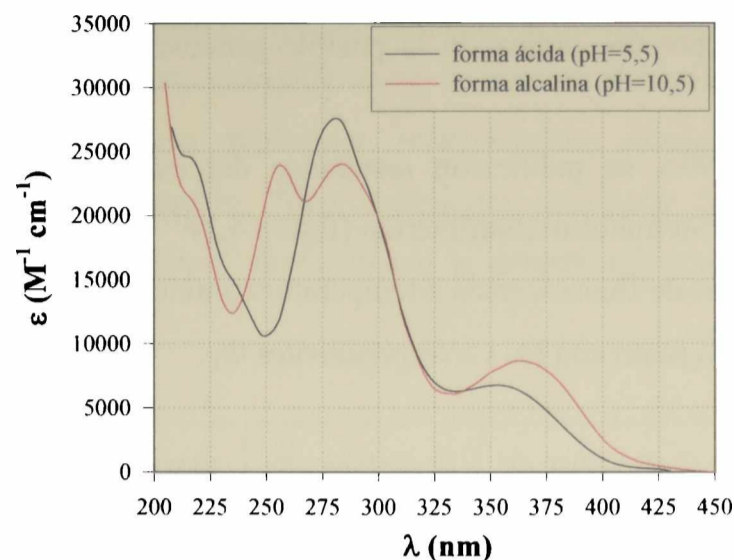


Figura 4.2: Espectros de absorción de AF en solución acuosa.

4.2 Conocimientos previos sobre la emisión de pterinas.

Los estudios sobre las propiedades fisicoquímicas, en particular, las propiedades fotofísicas de las pterinas y compuestos relacionados son recientes. En la década del '70 aparecen los primeros trabajos relacionados con la emisión de estos compuestos. Aaron y Winefordner publicaron en 1972^[9] los espectros de emisión fluorescente y fosforescente del AF en agua. El espectro de emisión es débil, mientras que la fosforescencia, que no se detecta a temperatura ambiente, se registra a 77 K.

El primer trabajo detallado y sistemático sobre el tema data de la década del '80^[10]. En esta publicación, realizada solamente sobre PT, se informa que dicho compuesto presenta emisión fluorescente mucho más fuerte que el AF y que el espectro de emisión es dependiente del pH. Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) a pH 10. Asimismo, en este artículo se muestra la dependencia con el pH de los espectros de fosforescencia a 77 K. 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, y los tiempos de vida para los decaimientos de los estados tripletes. En este trabajo, no se midieron los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ), no obstante, se detectó *quenching* de

los estados tripletes por O₂, indicando la posible generación de la mencionada especie excitada.

En el año 1996, se publicaron resultados del estudio fotofísico de otros dos derivados, la DPT y 6-tetrahidroxibutilpterina (figura 4.3)^[11]. 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 Φ_F .

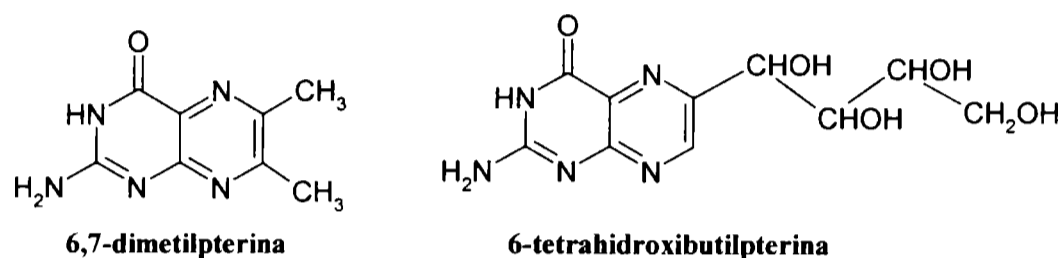


Figura 4.3: Estructura química de los compuestos estudiados por Neverov *et al.*

Más recientemente, en un proyecto conjunto entre el grupo de investigación en el cual se desarrolló el presente trabajo de tesis y el grupo de investigación del Prof. Dr. André Braun y la Prof. Dra. Esther Oliveros de la Universidad de Karlsruhe, se estudió la fluorescencia de un grupo de derivados pterínicos en solución acuosa^[2,7,12]. Estos estudios, que incluyeron experimentos estacionarios y resueltos en el tiempo, se realizaron sobre PT, CPT, FPT BPT, NPT y AF empleando la técnica *Single Photon Counting*. En los próximos párrafos se presentarán los resultados más relevantes de estos trabajos.

Todas las pterinas estudiadas presentan una importante emisión fluorescente, excepto el AF que tienen una fluorescencia de muy baja intensidad. Los espectros de emisión obtenidos excitando a 350 nm, mostraron una dependencia con el pH: los espectros de las formas alcalinas presentan un corrimiento de unos 15 nm a mayores λ respecto de los espectros de emisión de las correspondientes formas ácidas.

En la tabla 4.1 se listan los valores de Φ_F obtenidos excitando en la banda de menor energía (350 nm). Puede apreciarse que, en todos los casos, los valores correspondientes a las formas ácidas son mayores que los correspondientes valores para las formas alcalinas; y que además, presentan una fuerte dependencia con la naturaleza del sustituyente en la posición 6 del anillo de pterina. Es interesante remarcar que, el Φ_F del AF es mucho menor

comparado con el observado para el resto de las pterinas estudiadas. La hipótesis sugerida por los autores para explicar esta gran diferencia, se basa en el sustituyente del AF. Dicho sustituyente presenta un peso molecular relativamente elevado y posee muchas posibilidades de torsión y rotación. Por consiguiente, esta parte de la molécula podría actuar como un “*quencher interno*” favoreciendo la desactivación no radiativa del estado singlete excitado del AF.

Compuesto	Φ_F (pH=5,5)	Φ_F (pH=10,5)
^{12}PT	0,33	0,27
^{12}CPT	0,28	0,18
^{12}FPT	0,12	0,07
^{12}AF	<0,005	<0,005
^{7}BPT	0,36	0,29
^{7}NPT	0,38	0,31

Tabla 4.1: Valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las formas ácidas y alcalinas de algunos derivados pterínicos.

Se estudiaron los espectros de emisión obtenidos excitando a distintas longitudes de onda y los espectros de excitación. Del análisis detallado de estos resultados y teniendo en cuenta las características generales de los espectros de absorción, los autores concluyen que en las pterinas existen, al menos, dos estados excitados singletes, de los cuales sólo el de menor energía (S_1) emite y el de mayor energía (S_2), no emisor, decae a S_1 . Sin embargo, sólo una porción de las moléculas excitadas a S_2 decae a S_1 . Esto implica que el estado excitado S_2 posee otras vías de desactivación que compiten eficientemente con la conversión interna a S_1 , como se ve en la figura 4.4.

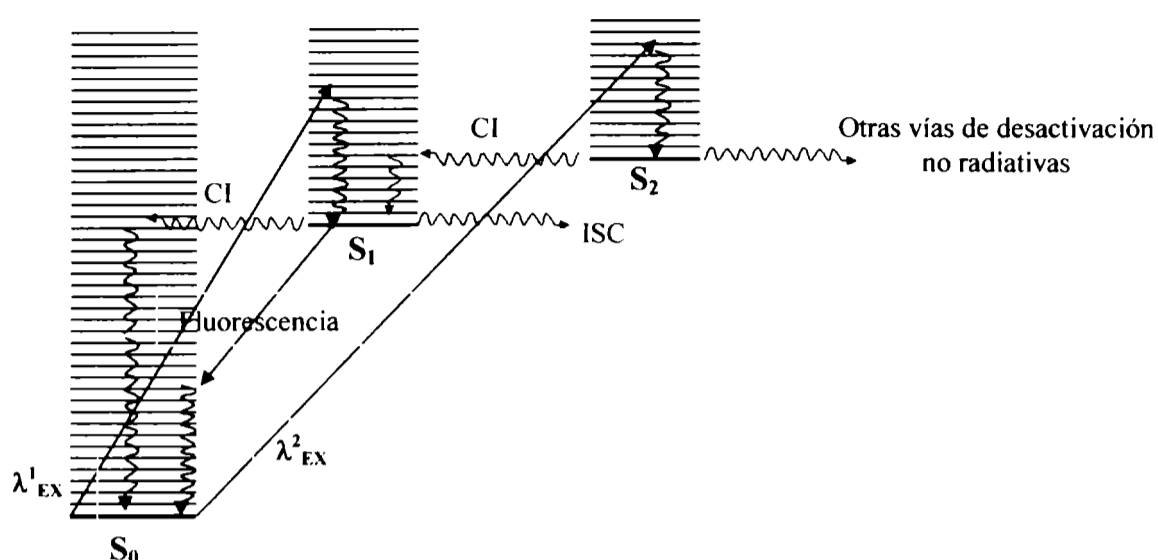


Figura 4.4: Diagrama de Jablonski que representa el estado electrónico fundamental y los dos estados electrónicos excitados de las pterinas, junto con las diferentes vías de desactivación. $\lambda^1_{EX}=310-390$ nm, y $\lambda^2_{EX}=250-290$ nm.

Se determinaron los valores de las constantes de disociación ácida de las especies excitadas (K_a^*) de varios derivados pterínicos (tabla 4.2). Comparando estos valores con los correspondientes a las constantes de disociación ácida obtenidas por titulación espectrofotométrica (K_a) (ver tabla 2.2, capítulo 2), puede apreciarse que, para la mayoría de los compuestos estudiados, no existen diferencias significativas entre ambos grupos de valores. En este punto, los autores proponen dos posibles hipótesis para explicar estos resultados: el valor de pK_a^* del equilibrio entre las dos formas ácido-base excitadas es igual al valor de pK_a de las especies en estado basal; o que la desactivación del estado S_1^* de la forma ácida (o alcalina) es mucho más rápida que su deprotonación (o protonación, según corresponda).

Compuesto	pK _a *
[¹²]PT	8,0±0,3
[¹²]CPT	7,7±0,2
[¹²]FPT	7,0±0,3
[⁷]NPT	7,6±0,4
[⁷]BPT	8,0±0,3

Tabla 4.2: Valores de pK_a* del equilibrio amida-fenolato en las pterinas, obtenidos a partir de la titulación espectrofluorométrica.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de *Single Photon Counting*, para las formas ácidas y básicas de PT, CPT, FPT, BPT, NPT y AF, y se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F)^[7,12]. En todos los casos se observó que los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la tabla 4.3 se listan los valores de los τ_F para las formas ácidas y alcalinas de los seis compuestos estudiados. Puede observarse que los τ_F para las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas. También es apreciable que se encuentran afectados por el tipo de sustituyente en la posición 6.

Compuesto	τ_F (ns)	
	(pH=5,5)	(pH=10,5)
[¹²]PT	7,6	5,0
[¹²]CPT	5,8	4,1
[¹²]FPT	7,9	2,2
[¹²]AF	7,0	3,5
[⁷]BPT	9,1	7,6
[⁷]NPT	8,9	7,4

Tabla 4.3: Tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de las formas ácida y alcalina de pterinas (error ± 0.4 ns).

Se observó una fuerte disminución de la fluorescencia de PT, CPT y FPT a pH superiores a 11^[12]. Este efecto fue atribuido al *quenching* de fluorescencia de la forma alcalina de estos compuestos por iones OH⁻. El análisis de Stern-Volmer sugirió que el

proceso de *quenching* por OH⁻ es de tipo dinámico. En la tabla 4.4 se listan las correspondientes constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q).

Compuesto	k_q (M ⁻¹ s ⁻¹)
¹² PT	$3,6 \times 10^9$
¹² CPT	$1,9 \times 10^9$
¹² FPT	$1,1 \times 10^{10}$

Tabla 4.4: Valores de las constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia de pterinas por anión OH⁻ (k_q).

Por último, se estudiaron procesos de *quenching* de fluorescencia por ciertos aniones. Este trabajo se realizó sobre cinco derivados pterínicos: PT, CPT, FPT, BPT y NPT^[2,7,12]. Los resultados presentados en este estudio muestran una dependencia importante con la naturaleza del anión estudiado, como así también con el pH. Los resultados muestran que la fluorescencia de la forma ácida de todos los compuestos estudiados, es desactivada por los aniones acetato y fosfato. En todos estos casos, el análisis de Stern-Volmer indica que el proceso de *quenching*, es de tipo dinámico. En la tabla 4.5 se listan los correspondientes valores de k_q . Por el contrario, los experimentos en medio alcalino, muestran que el proceso de *quenching* por estos dos aniones es mucho menos eficiente que el observado en medio ácido; con valores de k_q más de un orden de magnitud inferior. Por otro lado, no se detectó *quenching* de fluorescencia por otros aniones (cloruro, nitrato y sulfato) tanto para la forma ácida como alcalina.

Compuesto	Fosfato pH=6,2	Fosfato pH=10,5	Acetato pH=6,2
	k_q ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_q ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_q ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
$^{[12]}\text{PT}$	1,6	0,18	2,1
$^{[12]}\text{CPT}$	0,93	---	1,6
$^{[12]}\text{FPT}$	1,2	---	1,3
$^{[7]}\text{BPT}$	1,5	0,11	1,6
$^{[7]}\text{NPT}$	1,3	0,09	1,5

Tabla 4.5: Constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) de pterinas por fosfatos y acetatos.

Los fenómenos de *quenching* por aniones pueden afectar las medidas de la emisión de las pterinas y pueden, por lo tanto, alterar la sensibilidad de los diferentes métodos analíticos que utilizan dichas medidas. Los aniones que presentan un interés particular, son aquellos que pueden ser usados en distintos tipos de experimentos; por ejemplo, aquellos aniones que están presentes en eluyentes de uso común en técnicas cromatográficas, también aquellos usados para fijar la fuerza iónica, el pH, etc.

4.3 Aplicaciones de la fluorescencia de las pterinas.

4.3.1 Métodos analíticos para la determinación de pterinas.

La amplia distribución de las pterinas en la naturaleza y su importancia biológica, ha llevado, a lo largo de los últimos años, al desarrollo de numerosas técnicas analíticas de caracterización y cuantificación de diversos derivados de esta familia de compuestos. La elevada emisión fluorescente que presentan estos compuestos, ha sido una herramienta por demás útil para el desarrollo de muchos de los métodos de detección de pterinas^[13], ya sea en el campo de la bioquímica clínica, para su caracterización y cuantificación en diferentes fluidos biológicos; como así también en el campo de los alimentos.

En cromatografía en capa delgada (TLC) se utiliza la emisión de las pterinas para revelar las placas luego de las corridas. Esta técnica que fue utilizada en el presente trabajo

de tesis, será explicada con mayor detalle en el capítulo 8. En cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se utilizan detectores de fluorescencia para cuantificar pterinas en muy bajas concentraciones. Este método muy sensible, es empleado en fluidos biológicos tales como suero y orina.

4.3.2 Derivados pterínicos como marcadores fluorescentes.

La fluorescencia es una herramienta útil en el estudio de los ácidos nucleicos y su interacción con las proteínas. Una de las maneras de investigar diferentes aspectos de las propiedades fisicoquímicas del ADN; tales como, la cinética de interacción con otras biomoléculas y los cambios de estructura; es mediante el empleo de sondas de ADN que contienen grupos fluoróforos. Recientemente se han desarrollado algunos análogos estructurales de los nucleótidos del ADN^[14-16], en los cuales la base nitrogenada ha sido reemplazada por una molécula de un derivado pteridínico. Debido a la gran similitud entre el doble anillo pterínico y la guanina (figura 4.5), la incorporación de ciertos derivados pterínicos a moléculas de ADN no modifica la estructura de la macromolécula en forma apreciable, como lo demuestran medidas de temperaturas de fusión. Estas moléculas de ADN que contienen pterinas, presentan la fluorescencia característica de las mismas, herramienta por demás útil para proporcionar información sobre la estructura del ADN y su respuesta a interacciones con otras moléculas, tales como proteínas, etc. Por ejemplo, cualquier interacción de un compuesto con una molécula de ADN que contiene un derivado pterínico provoca un cambio en la fluorescencia de la misma con una alta sensibilidad^[16]. Esta nueva aplicación incrementa el interés en el estudio de las propiedades de fluorescencia de las pterinas y de compuestos relacionados.

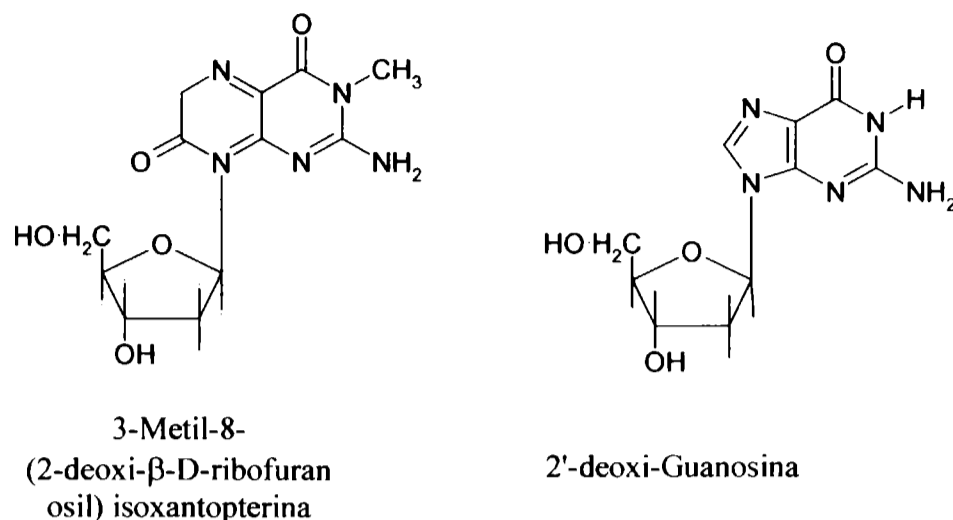


Figura 4.5: Comparación entre la estructura química de 2'-deoxi-Guanosina, con la de un análogo estructural donde se ha reemplazado la base púrica por un derivado pterínico.

4.3.3 Pterina como marcador de mutaciones específicas del ADN.

Existen numerosos tipos de alteraciones del ADN capaces de generar mutaciones, entre los cuales se encuentra la generación de sitios abásicos. Una molécula de ADN con un sitio abásico es una molécula que ha perdido una única base nitrogenada^[17]. La necesidad de detectar rápidamente este tipo de alteración, ha llevado al desarrollo de un gran número de técnicas. Entre ellas se encuentra el uso de pequeños compuestos fluorescentes (sintéticos o naturales) capaces de reconocer y unirse específicamente a los diferentes nucleótidos.

En trabajos muy recientes^[18] se ha demostrado la capacidad de PT de unirse a sitios abásicos presentes en oligonucleótidos sintetizados artificialmente (figura 4.6a). Esta interacción, que se genera por la unión de PT a la guanina por puentes de hidrógeno (figura 4.6b), produce cambios en la fluorescencia de PT. Por consiguiente, la emisión de este compuesto es una herramienta para la detección de sitios abásicos. Esta técnica podría aplicarse en la detección rápida de mutaciones presentes en genes.

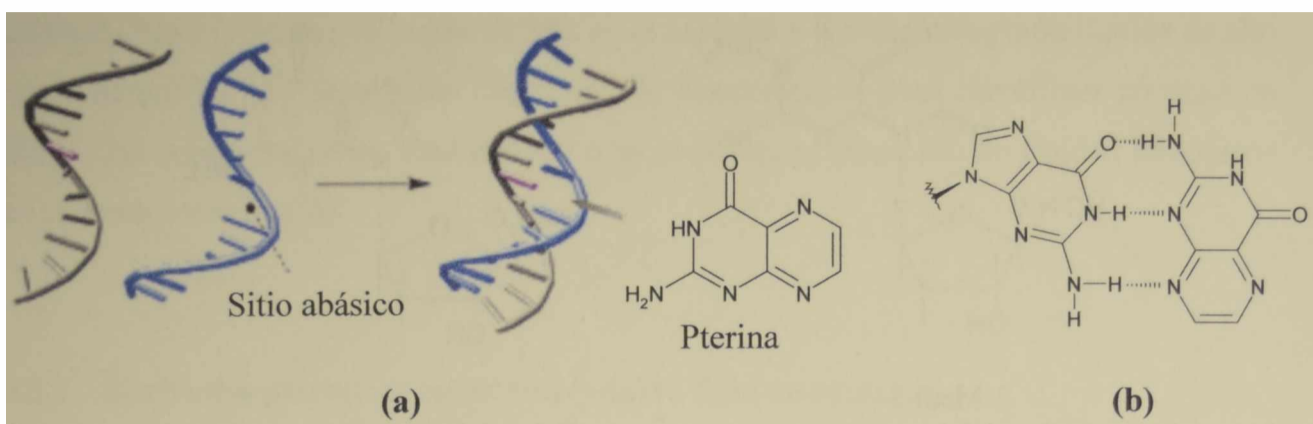


Figura 4.6: a) Ilustración esquemática de la interacción de una molécula de pterina con una doble hélice de ADN conteniendo un sitio abásico. b) Interacción por puente de hidrógenos entre una molécula de pterina con guanina.

4.4 Estudios previos sobre la producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por pterinas.

En el capítulo 1 se describieron los métodos de generación de $^1\text{O}_2$, y particularmente se detalló el método fotoquímico. En el año 1981 aparecieron los primeros trabajos en la literatura que sugerían la capacidad de algunos miembros de la familia de las pterinas para generar $^1\text{O}_2$ fotoquímicamente^[10,19]. Los autores Momzikoff *et. al.*, estudiaron reacciones de fotosensibilización en las cuales los sustratos eran diversos aminoácido y bases púricas, y los fotosensibilizadores eran PT e isoxantopterina. Sin embargo, en ese trabajo no se publicaron valores de los Φ_Δ . En el año 1995 se publicó otro trabajo en la literatura, donde también se sugería la capacidad de algunas pterinas para generar $^1\text{O}_2$ fotoquímicamente^[20]. En el año 1996 fue informado el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) en soluciones de DPT y 6-tetrahidroxibutilpterina (figura 4.3)^[11]. En este trabajo, la detección del $^1\text{O}_2$ se llevó a cabo midiendo la fosforescencia a 1270 nm del $^1\text{O}_2$ presente en soluciones de los compuestos estudiados en agua pesada (D_2O). Recientemente, en el año 2003, en nuestro laboratorio se realizaron estudios sistemáticos de la capacidad de producción de $^1\text{O}_2$ por parte de algunos derivados pterínicos. En particular, el estudio se llevó a cabo con soluciones acuosas de PT, CPT, FPT, AF, BPT y NPT. Los resultados de este estudio ponen en evidencia la elevada eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ por parte de estos compuestos (excepto el AF), alcanzando valores de

Φ_{Δ} incluso superiores a 0,40. Además, se observa que tanto la naturaleza del sustituyente en la posición 6 del anillo pterínico, como el pH afectan considerablemente la eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ (tabla 4.6).

En este estudio también se determinó la constante de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T) por los derivados pterínicos mencionados en el párrafo anterior. Los valores de k_T obtenidos para las correspondientes formas alcalinas se encuentran listados en la tabla 4.6. Puede apreciarse que el valor hallado para el AF es un orden de magnitud superior al del resto de los derivados pterínicos estudiados.

Compuesto	Φ_{Δ} (pD=5,5)	Φ_{Δ} (pD=10,5)	k_T ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (pD=10,5)
$^{[21]}\text{PT}$	0,18±0,02	0,30±0,02	2,9x10 ⁶
$^{[21]}\text{CPT}$	0,27±0,03	0,37±0,03	1,4x10 ⁶
$^{[21]}\text{FPT}$	0,45±0,05	0,47±0,05	1,4x10 ⁶
$^{[21]}\text{BPT}$	0,34±0,01	0,40±0,01	2,4x10 ⁶
$^{[21]}\text{NPT}$	0,23±0,01	0,34±0,01	2,3x10 ⁶
$^{[21]}\text{AF}$	≤ 0,02	≤ 0,02	3,0x10 ⁷

Tabla 4.6: Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) y constantes de velocidad de *quenching* total de oxígeno singlete por pterinas (k_T).

4.5 Conocimientos previos sobre la fotoquímica de pterinas.

Se sabe desde hace mucho tiempo que las pterinas oxidadas en solución acuosa son fotosensibles^[22,23]. Sin embargo, pocos grupos de investigación se han abocado al estudio de las reacciones fotoquímicas que sufren estos compuesto. En esta sección se resumen los primeros estudios que mostraron que el AF se oxida al ser irradiado con luz UV en presencia de O_2 , los trabajos del investigador alemán Wolfgang Pfliegerer y los estudios mucho más recientes realizados por el grupo de investigación en el cual se desarrolló el presente trabajo de tesis.

4.5.1 Fotoquímica de Biopterina y Neopterina.

El investigador alemán Wolfgang Pfeleiderer ha publicado numerosos trabajos sobre diversos aspectos químicos de las pterinas y las lumazinas. Este autor y sus colaboradores, han realizado diversos estudios en el área de la fotoquímica de compuestos estructuralmente muy relacionados; y en particular, puede citarse una publicación sobre biopterina (BPT) y neopterina (NPT)^[24]. En este trabajo, los autores muestran que la fotooxidación de BPT a CPT, que había sido descrita anteriormente^[25], ocurre en un proceso que involucra varias etapas. Esta secuencia de reacciones puede apreciarse en la figura 4.7.

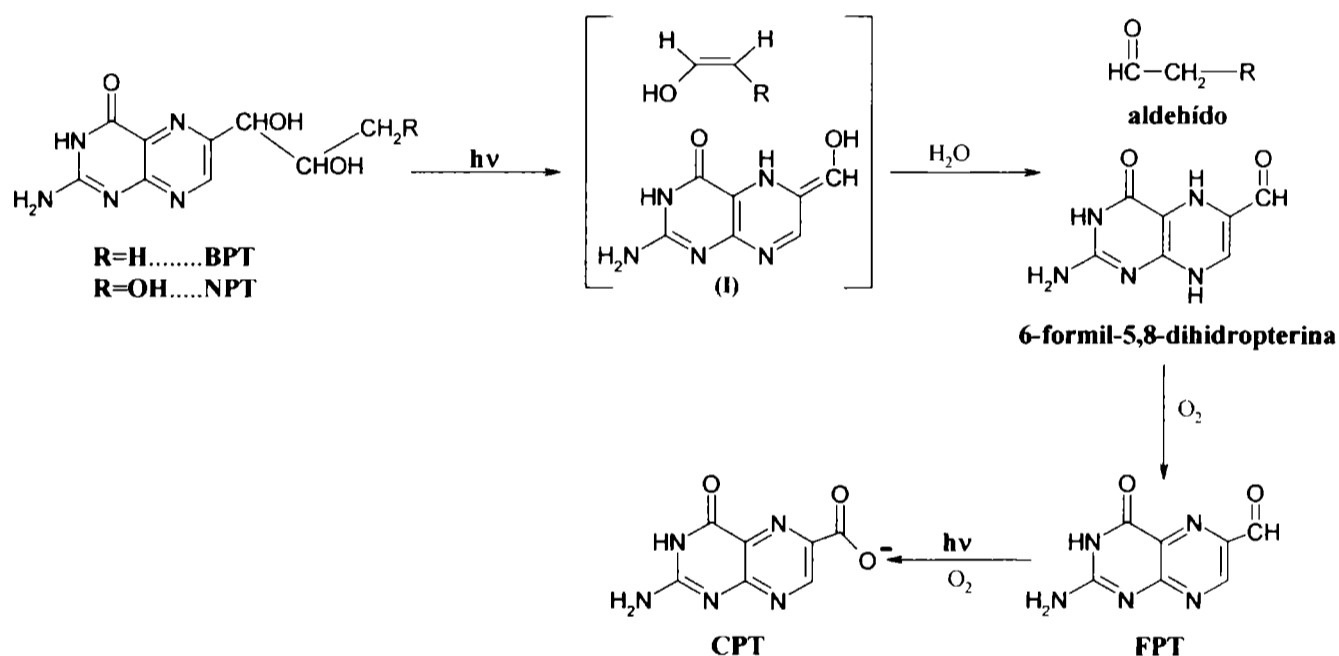


Figura 4.7: Fotólisis de BPT y NPT según esquema de reacciones propuesto por Pfeleiderer y colaboradores en 1977.

En una primera etapa, observada realizando la irradiación en condiciones anaeróbicas, BPT se escinde en su cadena lateral rindiendo dos fotoproductos. Uno de ellos, fue identificado mediante experimentos de TLC 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 oxidadas 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^[26].
- ✓ Este fotoproducto pudo ser preparado a partir de FPT mediante un proceso de fotorreducción en presencia de ácido 1,4-ciclohexadieno-1-carboxílico^[27,28].
- ✓ 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.

Pfleiderer y colaboradores propusieron que la reacción tiene lugar mediante un mecanismo de clivaje Norrish tipo II. Según esta hipótesis, inmediatamente después de la ruptura de la molécula de BPT, se formaría un intermediario (I, en el esquema de la figura 4.7) 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 FPT. Si la irradiación prosigue en presencia de O₂ este compuesto se oxida, a su vez, a CPT. Sin embargo, esa reacción fue estudiada en detalle recién mucho tiempo después (ver más adelante).

En esta publicación se informa el rendimiento cuántico de consumo de BPT solamente a pH 10 ($\Phi=0,11$). 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, sugiriendo que la fotólisis de la forma neutra (forma ácida) es más lenta, y que la forma catiónica es fotoestable.

NPT, por su parte, sigue una vía de fotodegradación similar a la observada para BPT, rindiendo 6-formil-5,8-dihidropterina y, posiblemente, glicaldehído. Sin embargo, en este caso, no fueron publicados los rendimientos cuánticos ni el efecto del pH sobre las reacciones involucradas.

En una publicación posterior, Pflleiderer, junto a otros autores describieron la degradación fotoquímica de otras dos polihidroalquilpterinas: 7-isobiopterina y 2-N,N-dimetilbiopterina (figura 4.8)^[29]. En ambos casos observaron procesos similares al observado en la degradación fotoquímica de BPT. 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 O₂.

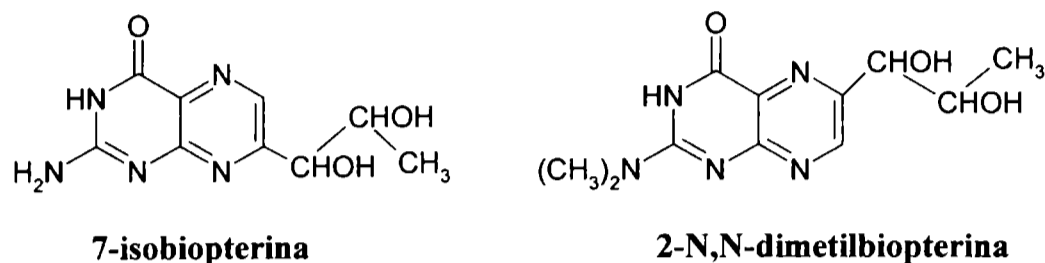


Figura 4.8: Estructura química de 2 polihidroxiálquilpterinas estudiadas por Pfeleiderer.

4.5.2 Fotoquímica del ácido fólico.

En 1944 se observó, por primera vez, que la luz UV convertía al AF, que es un compuesto no fluorescente, en otro fluorescente^[30]. Poco después, otro grupo de investigación descubrió que la luz solar provoca la liberación de una amina diazotable en soluciones de AF^[31]. En base a estos resultados propusieron el clivaje fotoinducido del AF, en un componente pterínico y ácido *p*-aminobenzoilglutámico (PABG).

Teniendo en cuenta estos estudios previos y con el propósito de obtener información para desarrollar un método analítico sensible para la determinación del AF, Lowry, Bessey y Crawford llevaron a cabo un estudio dirigido a la identificación de los productos de la fotólisis^[32]. Estos estudios fueron realizados irradiando AF en soluciones acuosas de ácido acético 0,01 M. A partir del análisis de estos experimentos, los autores infirieron que en la reacción de descomposición fotoquímica del AF 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 AF. En particular, se describió la presencia de FPT, CPT y PT. Para la identificación de estos fotoproductos se compararon los espectros de absorción y los espectros de emisión de las soluciones de AF irradiadas durante intervalos de tiempo crecientes, con la de los correspondientes patrones. A partir del análisis detallado de los resultados experimentales obtenidos por métodos indirectos, los

autores propusieron la secuencia de reacciones mostrada en la figura 4.9. 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 describe que en ausencia de O_2 las reacciones son mucho más lentas.

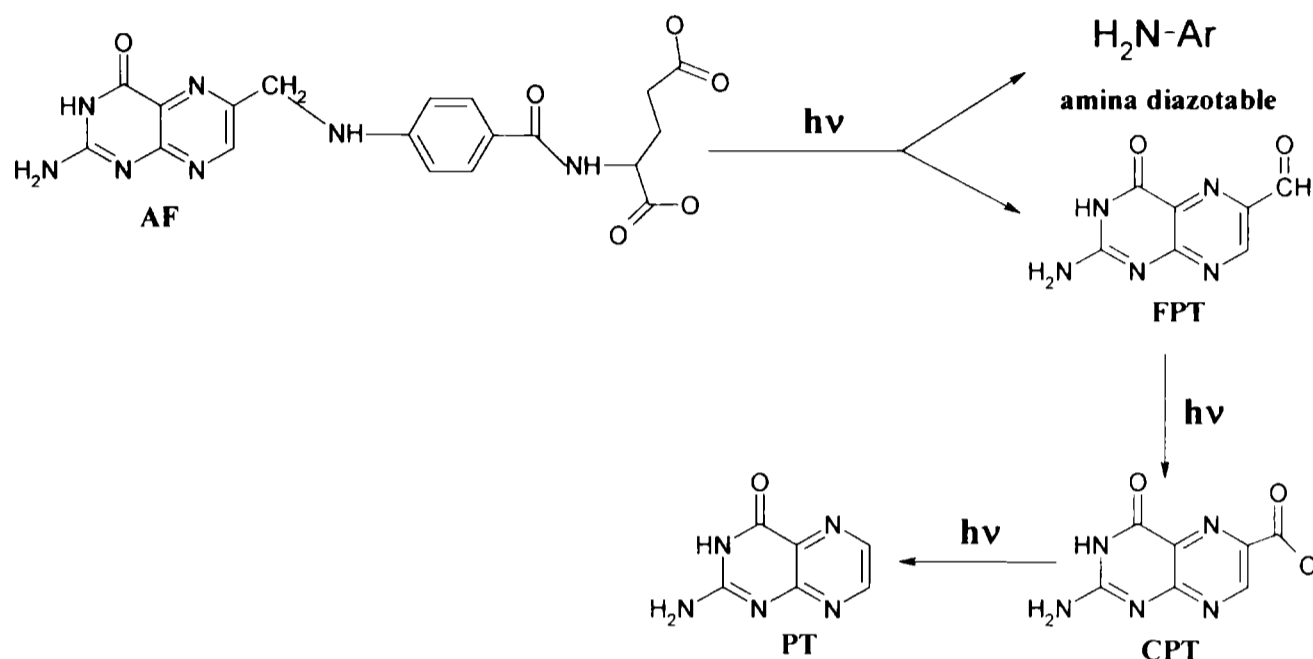


Figura 4.9: Esquema de reacciones propuesto por Lowry y colaboradores en 1949.

El esquema de reacciones propuesto sirvió como base de partida para futuras investigaciones. Mucho más recientemente, el grupo en el cual se realizó el presente trabajo de tesis, realizó estudios sistemáticos de la fotólisis del AF, empleando métodos de análisis más directos y modernos^[33,34]. Se evaluó la dependencia del pH y la participación del O_2 y sus especies reactivas en los mecanismos de fotólisis. Adicionalmente se determinaron parámetros cinéticos característicos de estas reacciones. A continuación se hará una breve descripción de los resultados obtenidos.

En la fotólisis del AF en medio ácido pueden distinguirse al menos tres etapas. En la etapa inicial de la fotólisis, cuando el AF absorbe casi la totalidad de la luz incidente (UV-A 350 nm) se excita y genera 1O_2 con un rendimiento cuántico muy bajo. Esta forma excitada del O_2 reacciona con el AF provocando su ruptura, dando lugar a la formación de FPT y PABG. Este proceso muestra una cinética de orden 0 con un rendimiento cuántico de consumo de AF (Φ_{AF}) igual a $2,5 \times 10^{-2}$.

En la segunda etapa, se observa una aceleración en el consumo del reactivo y en la formación de FPT. Debido a que FPT también genera $^1\text{O}_2$, pero con un rendimiento cuántico muchísimo mayor ($\Phi_{\Delta}=0,33$), 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. Esto explica el incremento en la velocidad de la transformación de AF en FPT al avanzar la fotólisis. El mecanismo de esta fotólisis está esquematizado en la figura 4.10.

Finalmente, puede reconocerse una tercera etapa en la cual tanto la concentración de AF como la de FPT decrecen con el tiempo de irradiación. En este período se observa un aumento continuo de la concentración de CPT. Sin embargo, el balance de masas realizado con las tres especies sugiere que este último compuesto es, a su vez, fotosensible.

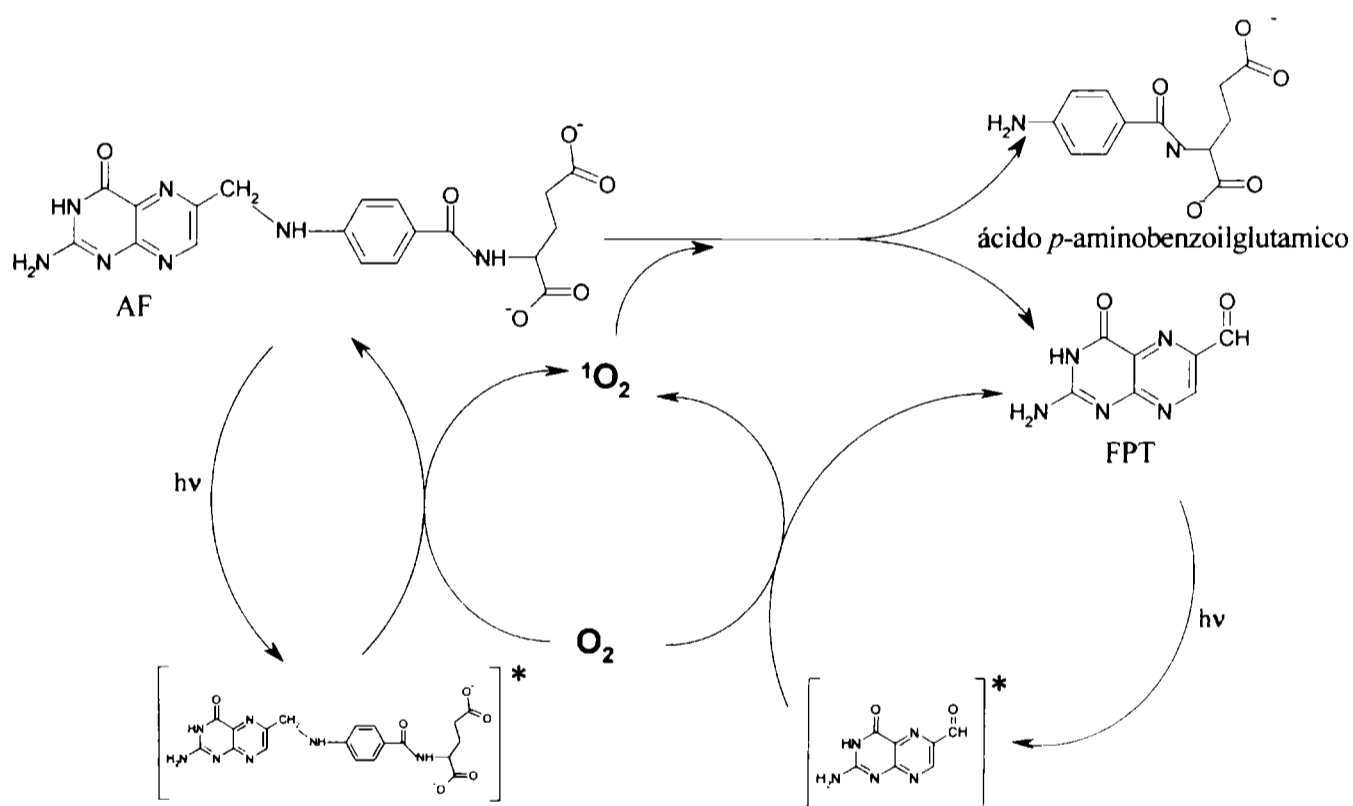


Figura 4.10: Esquema de reacciones propuesto para la fotólisis del AF en medio ácido. Las especies excitadas se indican con *.

Los resultados de la fotólisis del AF en soluciones acuosas alcalinas presentan similitudes y diferencias respecto de los resultados en medio ácido. En primer lugar, el rendimiento cuántico de consumo de AF ($\Phi_{\text{AF}}=5,1 \times 10^{-3}$) es significativamente menor que

el medido para la forma ácida ($\Phi_{AF}=2,5 \times 10^{-2}$). El mecanismo mostrado en la figura 4.10 fue también propuesto para la fotólisis de la forma alcalina del AF. Sin embargo, no todo el reactivo consumido se transforma en FPT, siendo el rendimiento cuántico de formación de este compuesto de sólo $2,9 \times 10^{-3}$. En las soluciones irradiadas se detectó la presencia de dos productos de reacción adicionales, 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**. El compuesto **A**, es un fotoproducto directo de la fotólisis del AF, formado a través de un mecanismo de reacción similar al de la formación de FPT; es decir, se trata de una fotooxidación en la cual el 1O_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 con el tiempo de irradiación, que puede ser explicado de la misma manera que en medio ácido. FPT en medio alcalino genera 1O_2 , con una eficiencia ($\Phi_{\Delta}=0,31$) similar a la que muestra en soluciones ácidas ($\Phi_{\Delta}=0,33$). El rendimiento cuántico de formación de 1O_2 del AF es, por su parte, muy pequeño. En consecuencia, cuando la concentración de FPT es lo suficientemente alta como para que la luz absorbida por él no sea despreciable, la velocidad de formación de 1O_2 aumenta y, por ende, su concentración en el medio. Esto explica el incremento en la velocidad de degradación del AF a través de las dos vías al avanzar la fotólisis.

La figura 4.11 muestra las vías de la fotodegradación del AF y el mecanismo que involucra al 1O_2 como especie activa del O_2 . Nótese que la diferencia fundamental con el esquema presentado en la figura 4.10, para la fotólisis en medio ácido, radica en que el AF reacciona por dos vías distintas con el 1O_2 .

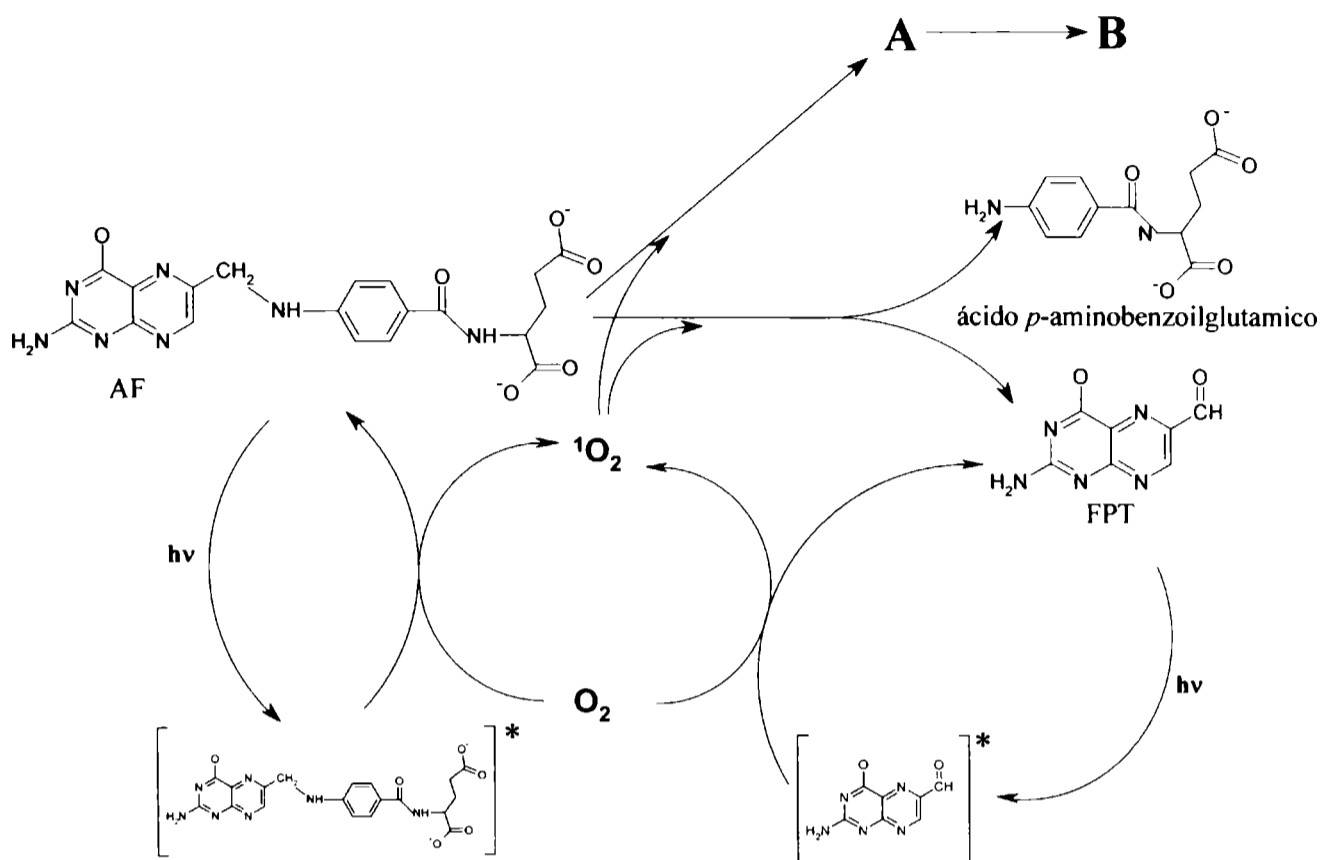


Figura 4.11: Esquema de reacciones propuesto para la fotólisis del AF en medio alcalino. Las especies excitadas se indican con *.

4.5.3 Fotoquímica de FPT en soluciones acuosas.

Por otro lado, también se estudió la fotólisis de FPT en soluciones acuosas ácidas y alcalinas^[1,34,35]. En ambos medios, la fotooxidación de FPT a CPT ocurre a través de un proceso que puede ser dividido en dos etapas. En una primera etapa, en la cual no participa el O_2 , 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 O_2 del medio formándose CPT que es el producto final. En la figura 4.12 se presenta el esquema de reacción para la forma ácida de FPT. El rendimiento cuántico de la reacción global de descomposición de FPT en medio ácido fue mayor ($\Phi_{FPT}=3,9 \times 10^{-2}$) que el observado en medio alcalino ($9,0 \times 10^{-3}$).

Debido a las características espectrales y a su reactividad fue propuesto que el compuesto rojo detectado tanto en medio ácido como en medio alcalino es el mismo; y que podría tratarse de un 6-acil-5,8-dihidropterina similar a los propuestos como fotoproductos

de la fotólisis de otros derivados pterínicos como BPT y NPT (ver sección 4.1). En particular, podría tratarse del derivado 6-carboxi-5,8-dihidropterina.

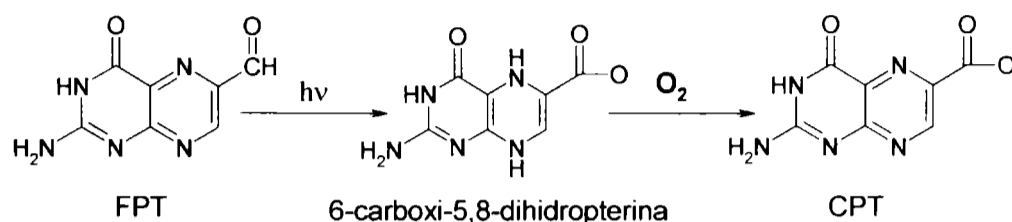


Figura 4.12: Fotólisis de FPT en medio ácido.

4.5.4 Fotoquímica de CPT en soluciones acuosas.

Los resultados de la fotólisis de CPT en medio ácido se encuentran resumidos en la figura 4.13^[35]. CPT 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 PT. Este cálculo arroja un valor cercano a 3×10^{-3} . Estos rendimientos cuánticos son mucho menores que los medidos en las fotólisis de AF y FPT. Este hecho explica la acumulación de CPT en dichas fotólisis y su relativa fotoestabilidad.

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 detalladas anteriormente.

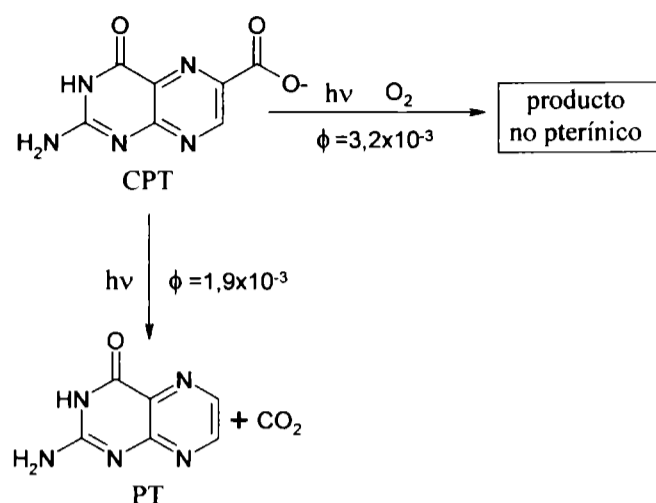


Figura 4.13: Fotólisis de CPT en soluciones acuosas ácidas.

En medio alcalino, CPT presenta un comportamiento particular. Este compuesto es fotoestable en condiciones anaeróbicas, mientras que se degrada fotoquímicamente en presencia de O₂. El análisis de las soluciones irradiadas revela que los fotoproductos han perdido la estructura básica de doble anillo común a todos los compuestos pterínicos. Por otra parte, el Φ_{CPT} es mucho menor que los observados para otros derivados pterínicos.

4.6 Referencias.

- [1] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" Tesis Doctoral (2001).
- [2] Lorente C.; "Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución acuosa" (2003).
- [3] Albert A.; *Biochem. J.*, **54**, 646 (1953).
- [4] Monópoli V. D., Thomas A. H. y Capparelli A. L.; *International Journal of Chemical Kinetics*, **32**, 231-237 (2000).
- [5] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **135**, 147-154 (2000).
- [6] Thomas A. H., Feliz M. R. y Capparelli A. L.; *Transition Metal Chemistry*, **21**, 317-321 (1996).
- [7] Lorente C., Capparelli A. L., Thomas A. H., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 167 (2004).
- [8] Thiéry-Cailly C., "C. R. Acad. Sc. Paris", Serie C, 250, (1968).
- [9] Aaron J. J. Y Winefordner J. D.; *Talanta*, **19**, 21 (1972).
- [10] Chahidi C., Aubailly M., Momzikoff A., Bazin M. Y Santus R.; *Photochem. Photobiol.*, **33**, 641, (1981).
- [11] Neverov K. V., Mironov E. A. Lyudnikova T. A., Krasnovsky Jr A. A. Y Kritsky, M. S., *Biokhim.*, **61**, 1627 (1996).
- [12] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 1 (2002).
- [13] McCormack J. J. y Newman R. A.; *Modern chromatographic Analysis of vitamins*, Edit. De Leenheer A. P. Lambert W. E. Y de Ruyter M. G., (1985).
- [14] Hawkins M. E., Pfeleiderer W., Balis F. M., Porter D. y Knutson J. R.; *Anal. Biochem.*, **244**, 86 (1997).
- [15] Hawkins M. E., Pfeleiderer W., Mazumder A., Pommier Y. G. y Balis F. M.; *Nucleic Acids Res.*, **23**,

- 2872 (1995).
- [16] Hawkins M. E., Pfeleiderer W., Jungmann O. y Balis F. M.. *Anal. Biochem.*, **298**, 231 (2001).
- [17] Yoshimoto K., Nishizawa S., Minagawa M. y Teramae N., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8982 (2003).
- [18] Yoshimoto K.; Xu C-Y; Nishizawa S.; Haga T; Satake H. y Teramae N. *Cemical Communications* (Cambridge, England) Issue 24, December 21, pp-2960 (2003).
- [19] Momzikoff A. y Santus R.; *C. R. Acad. Sci. Paris*, **293**, 15 (1981).
- [20] Ledbetter J. W., Pfeleiderer W., Freisheim J. H.; *Photochem. Photobiol.*, **62**, 71, (1995).
- [21] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Martínez C. G., Braun A. M. y Oliveros E.: *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 245 (2003).
- [22] Forrest H. S., Mitchell H. K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4865 (1955)
- [23] Patterson E. L., von Saltza M. H., Stockstad E. L. R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5871 (1956).
- [24] Mengel R., Pfeleiderer W. y Knappe W. R.; *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2817 (1977).
- [25] Forrest H. S. y Mitchell H. K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4865 (1955).
- [26] Lown W., Akhtar M. H. y McDaniel R. S.; *J. Org. Chem.*, **39**, 1998 (1974).
- [27] Knappe W. R. y Hemmerich P.; *Liebigs Ann. Chem.*, **1976**, 2037 (1976).
- [28] Knappe W. R.; *Z. Naturforsch.*, **32b**, 434 (1977).
- [29] Baur R., Kappel M., Mengel R. y Pfeleiderer W.; "Photochemistry of Pteridines" en "Chemistry and Biology of Pteridines". Edit., Kisliuk y Brown; Elsevier (1979).
- [30] Bloom E. S., Vandenbelt J. M., Binkley S. B., O'Dell B. L. y Pfiffner J. J.; *Science*, **100**, 295 (1944).
- [31] Stokstad E. L. R., Fordham D. y Grunigen A.; *J. Biol. Chem.*, **167**, 877 (1947).
- [32] Lowry O. H., Bessey O. A. y Crawford E. J.; *J. Biol. Chem.*, **180**, 389 (1949).
- [33] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **135**, 147 (2000).
- [34] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., García Einschlag F. S., Martino R., Baiocchi C., Pramauro E. y Capparelli A. L.; *Helvetica Chimica Acta*, **85**, 2300 (2002)
- [35] Suárez G., Cabrerizo F. M., Lorente C., Thomas A. H. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **132**, 53 (2000)

**PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS
EXPERIMENTALES**

ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA

Existen numerosas técnicas espectroscópicas que permiten estudiar los estados excitados de las moléculas orgánicas. En particular, los espectros de absorción y emisión de una molécula proveen información fundamental sobre la estructura, estado energético y dinámica de los estado excitados^[1-3]. En este capítulo se detallan los métodos espectroscópicos empleados para el estudio de los estados excitados de las pterinas en solución acuosa. También se explica que información se obtiene con cada técnica y cómo se analiza la misma.

5.1. Absorción.

5.1.1. Espectros de Absorción.

Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la luz incidente. Un espectro de absorción muestra qué longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas en el espectro dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados energéticos de una molécula^[1,2]. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto. Sin embargo, es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, formas ácido-base diferentes de una misma sustancia pueden ser identificadas claramente por las diferencias en sus espectros de absorción.

Para obtener un espectro de absorción se requiere de un equipo que posea una fuente de luz estable, con capacidad de variar la longitud de onda en forma continua en la región UV-visible del espectro electromagnético. Debe poseer también un detector capaz de responder linealmente con la intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra. La muestra puede encontrarse en fase gaseosa, líquida o sólida, pero usualmente

se encuentra en soluciones diluidas, contenidas en celdas de vidrio o cuarzo. La celda debe ser transparente a la radiación, por ello el uso de celdas de cuarzo es esencial para longitudes de onda menores que 300 nm. Si la muestra se encuentra en solución, debe realizarse una corrección por el solvente, debido a que el mismo puede presentar absorción UV-visible.

Los espectros de absorción se obtuvieron con espectrofotómetros *Cary 3* y *Cary 5* (*Varian*). Estos equipos permiten obtener espectros en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 900 nm. Son espectrofotómetros de barrido de doble haz y simple haz, respectivamente, provistos con programas adecuados para registrar y almacenar los espectros. Estos programas también promedian señales que permiten suavizar los espectros cuando la relación señal/ruido es desfavorable. Los espectros se realizaron utilizando agua como blanco. Se utilizaron celdas de cuarzo, y, según la absorbancia de la muestra, se eligieron celdas de diferentes caminos ópticos: 0,1; 0,2 o 1 cm.

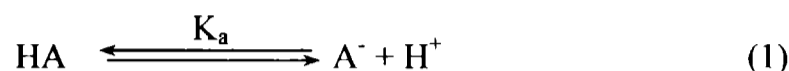
Además de brindar información sobre los estados excitados de las pterinas, los espectros de absorción en este trabajo fueron una herramienta fundamental para fijar condiciones experimentales: en ciertos experimentos se emplearon medidas de absorbancia para determinar la concentración de derivados pterínicos en solución, como así también para controlar la estabilidad de las soluciones almacenadas. Así mismo, los espectros de absorción se utilizaron para detectar y controlar cambios químicos como consecuencia de la irradiación o reacciones térmicas (ver sección 8.3.1, capítulo 8). Los cambios espectrales observados pueden ser indicativos de cambios químicos, y los espectros de absorción de las moléculas que aquí se estudian son muy sensibles a alteraciones en su estructura química.

5.1.2. Titulación espectrofotométricas.

Entre los numerosos métodos analíticos diseñados para el estudio de los equilibrios ácido-base y la determinación de sus respectivas constantes de disociación ácida (K_a), se destaca la titulación espectrofotométrica. Esta técnica se basa, 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^[4-6]. A continuación se describirán las

consideraciones generales, junto con la deducción de las ecuaciones empleadas en una titulación espectrofotométrica:

El equilibrio ácido-base que presentan las pterinas (ver capítulo 2) puede representarse mediante la siguiente reacción.



donde HA representa a la forma ácida y A⁻ a la forma alcalina; y K_a es la constante de equilibrio de esta reacción o constante de disociación ácida.

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 (ver deducción matemática en los párrafos siguientes):

$$A_T = 10^{-4} \cdot \{b + (a - b) \cdot [K_a / (K_a + 10^{(-x)})]\} \quad (2)$$

donde A_T es la absorbancia de la solución a una longitud de onda determinada; a y b son los coeficientes de absorción 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.

La ecuación 3 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 alcalina de la molécula cuya K_a se quiere averiguar, pueden plantearse las siguientes ecuaciones:

$$A_{HA} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] \quad (3)$$

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

$$A_T = A_{HA} + A_{A^-} = \epsilon_{HA} \cdot [HA] + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (5)$$

donde A_{HA} y A_{A^-} son las absorbancias de las formas ácida y alcalina respectivamente, ϵ_{HA} y ϵ_{A^-} son los coeficientes de absorción molar de las formas ácida y alcalina, respectivamente y, por último, $[HA]$ y $[A^-]$ son las correspondientes concentraciones molares.

La constante de disociación ácida de equilibrio representado en la ecuación (1) viene dada por la siguiente expresión:

$$K_a = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad (6)$$

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

$$C = [HA] + [A^-] \quad (7)$$

despejando $[HA]$ de (7) y reemplazándolo en (5) se obtiene:

$$A_T = \epsilon_{HA} \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_{A^-} \cdot [A^-] \quad (8)$$

despejando $[HA]$ de (7), reemplazándolo en (6) y luego despejando $[A^-]$ se obtiene una expresión que relaciona $[A^-]$ y C.

$$[A^-] = C \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (9)$$

reemplazando esta expresión (9) en (8) se obtiene:

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

reordenando los términos se obtiene:

$$A_T = C [\epsilon_{HA} + (\epsilon_{A^-} - \epsilon_{HA}) \cdot K_a / (K_a + 10^{-pH})] \quad (11)$$

reemplazando en la ecuación (11) 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 (2).

En el presente trabajo de tesis, los valores de K_a de los derivados pterínicos estudiados fueron determinados mediante la técnica de titulación espectrofotométrica; es por esto que en esta sección se expondrán los detalles técnicos de este procedimiento experimental.

Se prepararon soluciones de concentración conocida (solución madre), pesando cantidades adecuadas de la sustancia en estudio y luego disolviéndola en soluciones acuosas de Na(OH) diluida (pH \approx 11). Esto favorece la disolución, debido a que en medio alcalino, tal como se explicó en el capítulo 2, todas las pterinas presentan al menos un grupo ionizado (fenolato) y, por ende, su solubilidad es mayor que en soluciones ácidas o ligeramente ácidas. La concentración de la solución madre se ajustó de manera tal que la

absorbancia de las soluciones fuera adecuada para realizar las medidas en el espectrofotómetro (*Cary3, Varian*). Típicamente, se prepararon soluciones de concentración 100 μM , las cuales presentan valores de absorbancia comprendidos en el intervalo entre 0,1-1,5, dependiendo de la naturaleza del compuesto estudiado.

La solución madre se dividió en dos fracciones, una de las cuales se mantuvo a pH 11 y la otra se llevó a pH 4 mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución acuosa de HCl (6N). Para realizar esta operación se preparó la solución de Na(OH) 3M por pesada, usando Na(OH) en granallas, provisto por *Merck* (la solución resultante no fue titulada, pues esta operación no es necesaria a los fines de este trabajo). Por su parte, se preparó la solución de HCl 6N a partir de solución concentrada comercial provista por *Merck*. 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.

Luego se realizó una mezcla de ambas soluciones en proporciones definidas, para ir ajustando el pH a un valor deseado, este valor se registró con un medidor de pH (marca *Metrhom*, provisto de un electrodo de vidrio combinado). Una vez alcanzado el pH deseado se tomó el espectro de absorción de la solución. Repitiendo este procedimiento, mezclando las soluciones en proporciones diferentes, se prepararon sucesivas alícuotas de pH diferentes, y a cada una de las cuales se le registró el espectro de absorción. Se trabajó sobre la misma alícuota en tanto y en cuanto no hubiese sufrido cambios inducidos por la luz de análisis del espectrofotómetro. Este tipo de cambios es importante en soluciones de derivados pterínicos muy fotosensibles. De esta manera, mediante la mezcla de las soluciones madres de distinto pH en distintas proporciones, se logra modificar el pH de la solución en un amplio intervalo, sin modificar la concentración de la sustancia cuya K_a se quiere determinar.

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 la mayoría de las medidas, se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Cuando se trabajó con soluciones de

concentración mayor a la habitual (100 μM), se recurrió al uso de celdas de 0,2 cm de camino óptico.

Posteriormente, se graficaron los espectros de absorción obtenidos. Se analizaron los puntos isobésticos con el fin de evaluar la cantidad de formas ácido-base presentes en el intervalo de pH estudiado. También se determinaron las zonas del espectro donde se producían los mayores cambios en la absorbancia de las soluciones al variar el pH. Se realizaron gráficos de absorbancia en función del pH a distintas longitudes de onda, las cuales se escogieron dentro de las zonas de mayor cambio de absorbancia (figura 5.1). Sobre la base de estos resultados experimentales, se realizó el ajuste no lineal empleando la ecuación 2 (estos cálculos se realizaron con el programa informático *SigmaPlot*, versión 8.0), que permitió obtener los valores de los parámetros a, b y K_a .

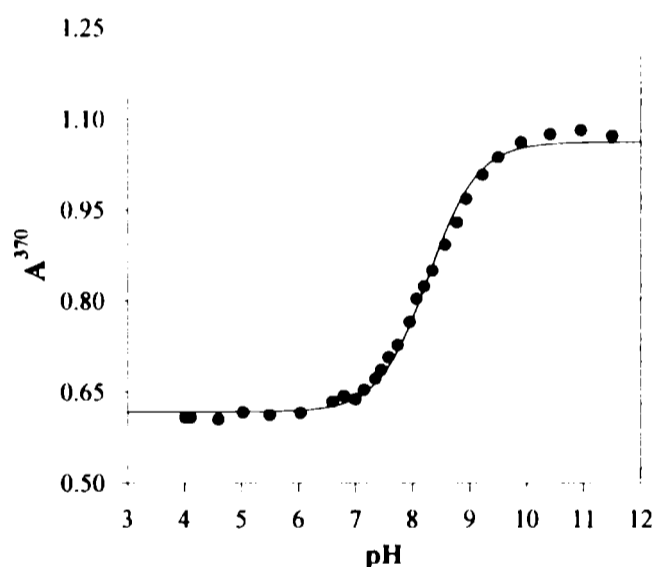


Figura 5.1: Curva de titulación obtenida para MPT. Las medidas de la absorbancia fueron realizadas a 370 nm. La línea continua muestra la absorbancia calculada a partir del ajuste no lineal realizado empleando la ecuación 2.

5.2. Fluorescencia.

5.2.1. Espectros de emisión.

Un espectro de emisión es un registro de intensidad de la emisión como función de la longitud de onda de la luz emitida. Los espectros de emisión son muy variables y dependen de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma está

disuelta^[1-3]. Los espectros de emisión se observan cuando una molécula excitada pierde el exceso de energía radiativamente. Puede estimarse la diferencia de energía que existe entre los estados involucrados en la transición. Si bien los espectros de absorción como los de emisión dan información relacionada con los niveles de energía de las moléculas, existen consideraciones prácticas a tener en cuenta para elegir entre una u otra técnica.

Como se explicó en el capítulo 1, hay dos formas de emitir la radiación: *fluorescencia* y *fosforescencia*. Ambas pueden distinguirse experimentalmente observando el tiempo de vida del estado excitado. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de interrumpir la irradiación (10^{-9} - 10^{-6} seg.), mientras que la fosforescencia se prolonga durante un período de tiempo más largo que el observado para la fluorescencia.

Se observa característicamente que la radiación de fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la correspondiente a la radiación incidente. Esta pérdida de energía, fenómeno conocido como corrimiento o desplazamiento de Stokes, se debe a una serie de fenómenos fisicoquímicos como: disipación de energía vibracional, redistribución de electrones en moléculas del solvente, re-orientación de las moléculas de solvente e interacciones entre la molécula absorbente y las moléculas del solvente^[1-3].

Ocasionalmente la molécula excitada puede, por reordenamiento electrónico, sufrir cambios que le permiten alcanzar un estado triplete. Las propiedades de una molécula en el estado triplete excitado difieren considerablemente de las propiedades de la misma en estado singlete. Por otra parte una transición triplete-singlete resulta muy poco probable, sin embargo, usualmente ocurre por un proceso denominado "*cruzamiento intersistemas*". A pesar de que estas transiciones ($T_1 \rightarrow S_0$) son menos probables, ocurren y la emisión resultante se denomina fosforescencia. Sin embargo, el tiempo para que la población de moléculas en estado T_1 se desexcite y regrese al estado basal S_0 es mayor que desde un singlete excitado.

Para obtener un espectro de emisión se necesita un equipo con una fuente de luz UV-visible. La longitud de onda de excitación se selecciona haciendo pasar el haz de luz por un monocromador de excitación. La muestra, que se coloca en celdas de cuarzo, recibe la radiación de excitación en una cara de la misma, y emite por fluorescencia. La radiación emitida se observa perpendicularmente a la radiación de excitación, en un segundo monocromador de emisión que la dispersa y cada longitud de onda transmitida es detectada por un detector.

Para obtener los espectros de emisión se utilizó un equipo *Single Photon Counting FL900CDT* (*Edinburgh Analytical Instruments*). Este equipo puede realizar medidas de estado estacionario (espectros de emisión, espectros de excitación), como así también, medidas resueltas en el tiempo (determinación de tiempos de vida de estados excitados). El equipo cuenta con dos lámparas diferentes: una pulsada y otra estacionaria. Para realizar los espectros de emisión utiliza la lámpara estacionaria de alta presión de Xenón (419 Kw).

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en soluciones acuosas. Se empleó una celda de cuarzo de 1 cm longitud de camino óptico. La temperatura de las muestras ($24,0 \pm 0,2$ °C) se reguló con la ayuda de un dispositivo de circulación de agua conectado a un termostato. Se registraron los espectros de emisión corregidos (el equipo corrige automáticamente la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión) entre 360 y 650 nm, excitando con luz de longitud de onda correspondiente a la banda de menor energía de la pterinas (350 nm). Sin embargo, algunos experimentos se realizaron excitando las muestras con otras longitudes de onda, con el objetivo de estudiar la influencia de la longitud de onda de excitación sobre los espectros de emisión.

Todas las medidas realizadas en el equipo *Single Photon Counting* utilizado en el presente trabajo se realizaron en el *Instituto Engler Bunte de la Universidad de Karlsruhe*, en el marco de un convenio de colaboración entre dicho Instituto y el grupo de Cinética y Fotoquímica del *Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas*, INIFTA (SECyT-BMFB).

También se realizaron medidas de emisión empleando un espectrofluorómetro *Perkin-Elmer LS50B*. Con este equipo, se realizaron medidas de fluorescencia en estado estacionario. Se registraron espectros de emisión. Estas medidas se emplearon en experimentos preliminares que permitieron luego diseñar los estudios sistemáticos con la técnica *Single Photon Counting*. En todos los experimentos realizados con el equipo *Perkin-Elmer LS50B* se utilizaron celdas para fluorescencia de 1 cm x 1 cm y de 1 cm x 0,4 cm. La luz de excitación utilizada fue de 340 nm, el ancho de rendija 0,4 cm.

5.2.2. Espectros de excitación.

Los espectros de excitación registran la intensidad de la emisión a una frecuencia dada como función de la longitud de onda de la luz de excitación. La excitación se realiza con luz de longitud de onda variable e intensidad fija.

El espectro de excitación se puede presentar representando el rendimiento cuántico de emisión relativo a cada longitud de onda de excitación. Generalmente, la mayoría de las moléculas fluorescentes tienen rendimientos cuánticos y espectros de emisión independientes de la longitud de onda de excitación. En consecuencia, el espectro de excitación de una molécula fluorescente se superpone con su espectro de absorción^[1-3].

El equipo empleado en la determinación de los espectros de excitación de las pterinas en solución acuosa fue el *Single Photon Counting*. La presencia de los dos monocromadores permite el registro de los dos diferentes tipos de espectros. Como se detalló en la sección anterior el espectro de emisión de una muestra se registra manteniendo el monocromador de excitación en una longitud de onda fija. Por el contrario, para obtener el espectro de excitación debe mantenerse el monocromador de emisión a una longitud de onda fija a la cual emite la muestra, que generalmente coincide, o está muy próxima, con el máximo de emisión. El movimiento del monocromador de excitación permite seleccionar la longitud de onda de la radiación absorbida por la muestra. Así puede medirse la intensidad de emisión a una longitud de onda dada como función de la longitud de onda de excitación.

La intensidad de la luz incidente varía con la longitud de onda debido a que la lámpara no provee una misma intensidad de luz en todo su espectro de emisión. Entonces los espectros de excitación resultan distorsionados por dicho motivo. Por lo tanto, debe realizarse una corrección de la señal de intensidad de la emisión de la muestra transformándola en una señal proporcional al número de fotones incidentes. Para ello se usan referencias, a modo de contadores de fotones, como rodamina B, fluoresceína o bisulfato de quinina, según el intervalo de longitudes de onda necesario. El máximo de emisión y el rendimiento cuántico de emisión de estas referencias es independiente de la longitud de onda de la luz incidente, en determinadas zonas del espectro, por lo que proveen una emisión, a longitud de onda constante, proporcional al flujo de fotones de la luz incidente.

Los espectros de excitación de los derivados pterínicos estudiados se tomaron empleando como referencia rodamina B en etilenglicol (3 g/l). Este compuesto es adecuado para ser utilizado como referencia en el intervalo comprendido entre 220 y 600 nm^[1]. Los espectros se obtuvieron excitando con luz entre 230 y 440 nm, y se registró la emisión a 450 nm, longitud de onda cercana al máximo de emisión de las pterinas en solución acuosa.

5.2.3. Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

En fotoquímica existen dos leyes fundamentales. La primera ley fue formulada por Grotthuss y Draper y dice que *sólo la luz absorbida por una molécula puede producir cambio fotoquímico en la misma*. Se enfatiza luz absorbida, es decir, que la luz que simplemente pasa por el sistema no produce cambio alguno. La evolución de la teoría cuántica llevó a Stark y Einstein a complementar esta ley, originando la segunda ley de la fotoquímica: *si una especie absorbe radiación, por cada cuanto de energía absorbido se excita una molécula*. Esto indica que un solo fotón es responsable del cambio fotoquímico en una molécula. Sobre la base de estas dos leyes fundamentales puede definirse el término rendimiento cuántico.

Los rendimientos cuánticos dan cuenta de la eficiencia de un proceso en términos de la cantidad de energía lumínica absorbida. El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico, como la fluorescencia (Φ_F), puede expresarse en términos del número de moléculas fluorescentes respecto de los fotones de luz absorbidos:

$$\Phi_F = \frac{\text{Nro moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}{\text{Nro de cuantos absorbidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen}} \quad (12)$$

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida (I_A) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente (I_F):

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (13)$$

El Φ_F de especies moleculares (d) puede ser determinado experimentalmente por comparación de la intensidad de fluorescencia, I_F , medida como el área debajo del espectro de fluorescencia corregido (I_d) y la intensidad de fluorescencia, medida de la misma forma, de una solución de una referencia de rendimiento cuántico conocido (I_{st}). Como la cantidad de fotones absorbidos por la muestra y la referencia puede ser distinta, debe realizarse una corrección teniendo en cuenta las absorbancias de ambas sustancias a la longitud de onda de excitación (A_d y A_{st} , respectivamente) Utilizando el mismo equipo, en idénticas condiciones (longitud de onda de excitación, celda, abertura de las rendijas, temperatura, etc.) el Φ_F se determina con la ecuación:

$$\Phi_d = [(A_{st} \cdot I_d \cdot n_d^2) / (A_d \cdot I_{st} \cdot n_{st}^2)] \Phi_{st} \quad (14)$$

donde n es el índice de refracción del solvente. En todos los experimentos realizados para este trabajo de tesis se utilizó el mismo solvente (agua) por lo cual el factor n_d^2/n_{st}^2 es igual a 1. Esta ecuación es válida sólo para soluciones diluidas, con absorbancia no mayor a 0,10. De lo contrario, A debe reemplazarse por $1-10^{-A}$.

Se utilizó el mismo equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)* que se describió anteriormente, con la lámpara estacionaria. Los Φ_F fueron determinados a partir de los espectros de fluorescencia corregidos obtenidos por excitación a 350 nm, usando como referencia *bisulfato de quinina* (Riedel-deHaen) en solución acuosa de H_2SO_4 0.5 M ($\Phi_F=0,546$)^[7,8]. El espectro de fluorescencia de la referencia se muestra en la figura 5.2. Para evitar efectos de filtro interno la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación se fijó en un valor menor a 0,10.

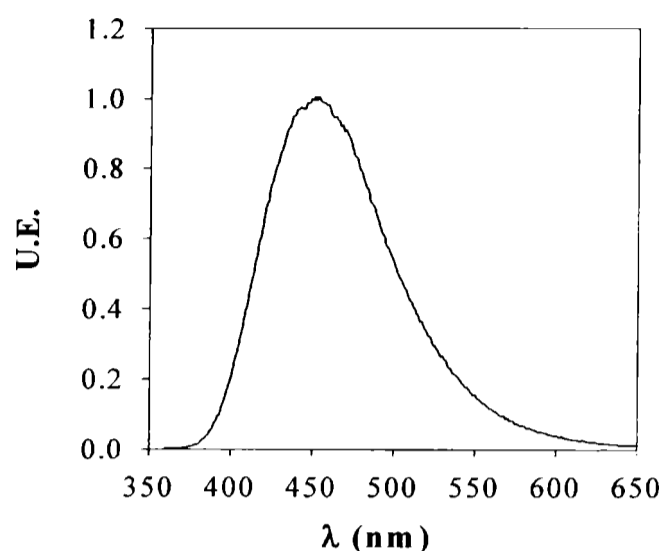


Figura 5.2: espectro de emisión normalizado de sulfato de quinina en solución acuosa de H_2SO_4 0,5 M.

Los Φ_F a longitudes de onda diferentes (Φ_F^λ) se calcularon a partir de los espectros de excitación y de los Φ_F a 350 nm (Φ_F^{350}), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Phi_F^\lambda = \Phi_F^{350} \cdot (I_{(\lambda)} / I_{(350)}) \cdot [(1-10^{-A_{(350)}}) / (1-10^{-A_{(\lambda)}})] \quad (15)$$

Aquí $I_{(\lambda)}$ y $I_{(350)}$ son las intensidades de la emisión medidas a 450 nm excitando a 350 nm y a λ , respectivamente, obtenidos de los espectros de excitación; $A_{(\lambda)}$ y $A_{(350)}$ las absorbancias de la solución a 350 nm y λ , respectivamente.

5.2.4. Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia.

El tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) de una sustancia representa el tiempo promedio en que una población de moléculas excitadas disminuye a $1/e$ de su valor inicial^[1,2]. Además, como se explicará más adelante, la determinación del τ_F proporciona valiosa información en procesos de *quenching*. Por ejemplo, permite obtener información sobre la frecuencia de colisión con las moléculas *quenchers*, la fracción de energía transferida y la extensión de reacción en el estado estacionario.

Para realizar las medidas de este parámetro se necesitan equipos electrónicos y detectores de muy alta velocidad, porque sus valores son del orden del nanosegundo. La técnica consiste en excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de longitud de onda apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz provoca la población del estado singlete excitado. Si consideramos solamente un proceso radiativo, la velocidad con que decrece el número de moléculas en el estado excitado puede describirse con la siguiente ecuación:

$$\frac{d(N^*)}{dt} = -k_F N^* \quad (16)$$

donde k_F es el coeficiente de velocidad de emisión espontánea y N^* el número de moléculas en el estado excitado. Al resolver esta ecuación, se obtiene:

$$N^*_t = N^*_o e^{(-k_F t)} \quad (17)$$

donde N^*_t y N^*_o son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo t y 0 , respectivamente. Por ello se espera que la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, tenga un decaimiento exponencial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el τ_F se define como el tiempo requerido para que la intensidad de fluorescencia alcance $1/e$ de su valor inicial. Es decir:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (18)$$

Para las medidas de τ_F se utilizó el equipo *Single Photon Counting*, descrito anteriormente en este mismo capítulo. Para los estudios resueltos en el tiempo este equipo utiliza una lámpara pulsada de nitrógeno (pureza > 99,9995), a 1,3 bar, y alimentada con una tensión de 6,3 kV y una frecuencia de repetición de 40 kHz. En estas condiciones emite, por cada pulso, una intensidad del orden de 10^{10} fotones. El alcance del equipo es 500 ps – 500 μ s, pero para las medidas del presente trabajo se utilizó una resolución de 0 - 100 ns. Los decaimientos se monitorearon a 450 nm y la luz de excitación fue 350 nm. Los τ_F se obtuvieron del decaimiento monoexponencial observado luego de la deconvolución

de la señal de la lámpara, mediante el uso de software provisto por *Edinburgh Analytical Instruments*.

5.2.5. Titulación espectrofluorométricas.

Esta técnica será utilizada en el presente trabajo de tesis, con el objeto de obtener mayor información sobre los equilibrios ácido-base en los que están involucrados los estados electrónicamente excitados (S_1^*) de las pterinas. En particular, se utilizará para calcular los valores de las constantes de disociación de dicho equilibrio (K_a^*). La titulación espectrofluorométrica se basa, fundamentalmente, en el análisis de la variación de la intensidad de emisión (I_F) de una solución de la sustancia estudiada cuando se cambia el pH de la misma sin cambiar su concentración. Haciendo consideraciones análogas a las de la sección 5.1.2 (titulación espectrofotométrica) puede deducirse la siguiente expresión que relaciona a la intensidad total de fluorescencia como una función del pH:

$$I_F = I_a + (I_b - I_a) \cdot [K_a^* / (K_a^* + [H^+])] \quad (19)$$

donde I_a e I_b son las intensidades de fluorescencia de la forma ácida y de la forma alcalina respectivamente, K_a^* es la constante de disociación.

El procedimiento general para realizar las titulaciones espectrofluorométricas de los derivados pterínicos estudiados en el presente trabajo de tesis se detalla a continuación: Se preparó una solución inicial con pH=12 y concentración tal que la absorbancia a 350 nm (A^{350}) fuera menor a 0,12. Se varió el pH agregando alícuotas de solución de HCl o NaOH de volumen despreciable. En este punto, se utilizó el mismo procedimiento explicado en la sección 5.1.2 para la titulación espectrofotométrica. Por lo tanto, se trabajó en condiciones de concentración y fuerza iónica constante. Se obtuvieron los espectros de emisión de las pterinas en soluciones a distintos pH. Para calcular la intensidad de la emisión fluorescente (I_F) de cada espectro, los mismos se integraron tomando como límite de integración el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 370 y 600 nm. La excitación se realizó

a la λ_{EX} en la cual se encuentra el punto isobésitico entre ambas formas ácido-base de cada pterina.

En este punto es importante ampliar la discusión acerca del λ_{EX} . En las secciones anteriores se mencionó en varias oportunidades que la λ_{EX} empleada generalmente es 350 nm. La absorbancia a 350 nm de las soluciones de pterinas varía con el pH, debido a que las distintas formas ácido-base de cada pterina presentan diferentes coeficientes de absorción molar a dicha longitud de onda. Por consiguiente, para poder analizar la dependencia de la I_F como una función del pH sería necesario realizar una corrección por absorbancia. Esta corrección puede evitarse excitando a una longitud de onda donde ambas formas ácido-base posean el mismo valor del coeficiente de absorción molar, esto es, en el punto isobésitico.

En la figura 5.3 se muestra, como ejemplo, la variación de I_F de una solución acuosa de MPT, como una función del pH (en el intervalo comprendido entre 4 y 10,5). En la misma figura se muestra el ajuste no lineal de los datos experimentales, calculado a partir de la ecuación 19. En esta curva pueden reconocerse tres regiones de pH. En primer lugar, existe un intercalo de pH en el cual sólo está presente la forma ácida del compuesto. En esta zona de pH no hay variaciones en el espectro de emisión y, por ende, en el valor de su integral. En segundo lugar, existe una zona de pH en la cual sólo está presente la forma básica. Por último, existe un intervalo intermedio, en el cual coexisten las dos formas ácido-base. En este punto la intensidad de la emisión fluorescente toma valores intermedios.

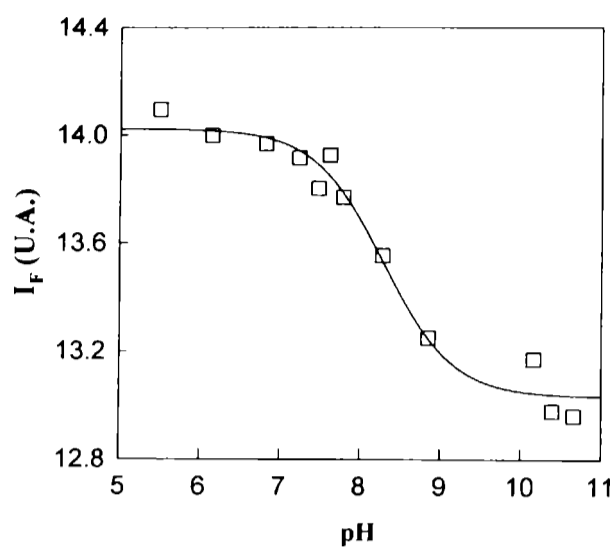


Figura 5.3: Variación de la intensidad de fluorescencia de MPT en solución acuosa como función del pH ($\lambda_{EX} = 349$ nm). En línea continua se observa la intensidad de fluorescencia calculada ajustando los datos experimentales con la ecuación (19).

5.3 Referencias.

- [1] Lakowicz J. R., "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*", Plenum Press. Lakowicz, (1983).
- [2] Gilbert A. y Baggott J. "*Essentials of Molecular Photochemistry*", Blackwell Science (1991).
- [3] Turro N. J. "*Modern Molecular Photochemistry*", University Science Books (1991).
- [4] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" Tesis Doctoral (2001).
- [5] Skoog D. A. y Leary J.J.; "Análisis instrumental", 4^a Ed. McGraw Hill (1997).
- [6] Ewing G. W., "Instrumentales de análisis químico", Ed. Mc Graw Hill (1978).
- [7] Eaton D. F., "*Handbook of organic photochemistry*", ed. J. C. Scaiano, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989, capítulo 8. Eaton, (1989).
- [8] Meech S. R. and Phillips D., *J. Photochem.*, **23**, 193 (1993).

QUENCHING DE FLUORESCENCIA

El fenómeno de *quenching* de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. El *quenching* puede ser resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y *quenching* por colisiones^[1]. El *quenching* de fluorescencia provee evidencia de interacciones moleculares.

Los procesos de *quenching* pueden clasificarse en dos grupos: “*quenching colisional* ó *dinámico*”, cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y *quencher*), y “*quenching estático*”, cuando es el resultado de formación de complejos.

Ambos tipos de desactivación requieren de contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula *quencher*. Este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes. En solución, el proceso difusional limita la velocidad con que se encuentran ambas moléculas (especie excitada y *quencher*) pero hace prolongado el encuentro pudiendo ocurrir cientos de choques antes de separarse.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como *quenchers* de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos de *quenching* colisional está dado por el O₂ molecular. Por ello muy frecuentemente es necesario eliminar el O₂ disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) o rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F). Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, bromato, yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas *quenchers*, se debe identificar aquéllas de interés para cada molécula fluorescente en particular.

6.1. *Quenching* dinámico o por colisiones.

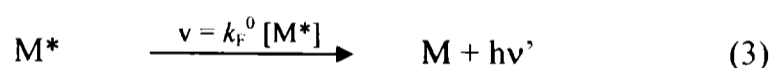
Los procesos de *quenching* dinámico, están relacionados con las colisiones (encuentros difusivos) entre el fluoróforo y el *quencher* durante el tiempo de vida del

estado excitado del fluoróforo; por lo tanto, son procesos dependientes del tiempo. La relación de Stern-Volmer presentada en la ecuación 1 describe este tipo de procesos^[1-3]:

$$I_F^0/I_F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (1)$$

donde I_F^0 e I_F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del *quencher* respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del *quencher*, k_q es la constante bimolecular de quenching y τ_F^0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

Esta ecuación puede deducirse planteando el estado estacionario de la fluorescencia de una molécula excitada en presencia de un *quencher*. La molécula *quencher* puede ser cualquiera, pero debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la concentración del estado excitado, y por consiguiente, de la emisión fluorescente, se deba a una única interacción entre la molécula emisora y ella. Para realizar el análisis de este estado estacionario debemos considerar cuatro etapas: la etapa de absorción de radiación (ecuación 2), la etapa de emisión fluorescente (ecuación 3), la tercera etapa que involucra todos los procesos de desactivación distintos de *quenching* (ecuación 4) y la etapa de desactivación por *quenching* (ecuación 5):



donde P_A es la velocidad de absorción de fotones, k_F^0 es la constante de fluorescencia intrínseca, k_i representa cada una de las constantes de velocidad de los procesos de desactivación distintos de *quenching* y k_q es la constante bimolecular de *quenching*.

Teniendo en cuenta las ecuaciones 2 a 5 planteadas anteriormente, puede escribirse la siguiente expresión:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = P_A - k_F^0 [M^*] - \sum k_i [M^*] - k_q [Q] [M^*] \quad (6)$$

Bajo condiciones de irradiación continua y asumiendo condiciones de estado estacionario, puede suponerse que $-d[M^*]/dt \approx 0$. Reordenando la ecuación 6 obtenemos la siguiente expresión:

$$[M^*] = \frac{P_A}{k_F^0 + \sum k_i + k_q [Q]} \quad (7)$$

Por otra parte, el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) está dado por:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{k_F^0 + \sum k_i + k_q [Q]} = \frac{k_F^0}{k_F + k_q [Q]} \quad (8)$$

donde k_F definida en el capítulo anterior como el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de M^* ($k_F^0 + \sum k_i$), excepto k_q . Debe observarse que Φ_F disminuye en una cantidad proporcional a la concentración del *quencher*. Se obtiene el valor máximo de Φ_F^0 en ausencia de *quencher*. La relación Φ_F^0/Φ_F está dada por:

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = \frac{k_F^0}{k_F} \frac{k_F + k_q [Q]}{k_F^0} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F} \quad (9)$$

Esta ecuación indica que la relación de los Φ_F es linealmente dependiente de la concentración del *quencher*, siendo la ordenada al origen igual a 1. Esta relación se denomina *relación de Stern-Volmer*.

La determinación de Φ_F requiere del conocimiento de la intensidad de luz absorbida. Sin embargo, si se realizan medidas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración del *quencher*, bajo idénticas condiciones de geometría de irradiación, concentración de molécula fluorescente, intensidad de excitación, longitud de onda y sensibilidad de detector, entonces la luz absorbida es idéntica para cada medida. Bajo dichas circunstancias, la relación Φ_F^0/Φ_F es igual a la relación de intensidades de emisión fluorescente. Reemplazando en la ecuación (9), se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F} \quad (10)$$

Así una gráfica de I_F^0/I_F versus $[Q]$ (gráfica de Stern-Volmer) debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje I_F^0/I_F . La pendiente de dicha gráfica se denomina constante de Stern-Volmer (K_{SV}), y es igual a $k_q/k_F = \tau_F^0 k_q$. En esta última expresión τ_F^0 es el parámetro τ_F definido en el capítulo anterior. Sin embargo, en los experimentos de *quenching* se le suele agregar el superíndice ⁰ para diferenciarlo de los τ_F en presencia de *quencher*.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite obtener información muy importante. Por ejemplo, la determinación de K_{SV} es un método indirecto para obtener el valor de τ_F^0 si se conoce k_q , o por el contrario, puede determinarse k_q si se conocen los τ_F^0 . Por otro lado, una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, si la gráfica de Stern-Volmer no es lineal puede suponerse la presencia de dos poblaciones distintas de fluoroforos.

Es importante remarcar que una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de *quenching* estudiado sea de tipo dinámico. Como se explicará a continuación, un proceso de *quenching* de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer. Debido a ello, debe recurrirse a otras medidas, que serán expuestas más adelante, para distinguir entre ambos tipos de *quenching*.

6.2. *Quenching* estático.

Los procesos de *quenching* también pueden ocurrir como producto de la formación de complejos no fluorescentes de los estados electrónicos fundamentales del fluoróforo y el *quencher*. Cuando este complejo absorbe luz, inmediatamente retorna a su estado basal sin emitir (figura 6.1).

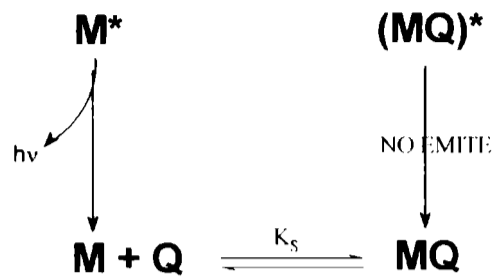


Figura 6.1: Proceso de quenching estático por formación de un complejo, donde: M es el fluoróforo, Q es el *quencher*, MQ es el complejo formado entre M y Q, M^* es el estado excitado (emisor) del fluoróforo y $(MQ)^*$ es el estado excitado (no emisor) del complejo.

La dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F) con la concentración de *quencher* puede deducirse considerando la constante de asociación (K_S):

$$K_S = \frac{[MQ]}{[M] \cdot [Q]} \quad (11)$$

donde $[MQ]$ es la concentración del complejo y $[M]$ es la concentración del fluoróforo libre, que no forma parte del complejo. Si el complejo MQ no emite, la relación de intensidades I_F^0/I_F será igual a la relación de concentraciones $[M]_0 / [M]$, donde $[M]_0$ es la concentración total del fluoróforo.

$$[M]_0 = [M] + [MQ] \quad (12)$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene:

$$K_S = \frac{[M]_0 - [M]}{[M] \cdot [Q]} = \frac{[M]_0}{[M] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (13)$$

$$\Rightarrow \frac{[M]_0}{[M]} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_S [Q] \quad (14)$$

Puede apreciarse que, tal como se dijo, un proceso de *quenching* estático también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal. Sin embargo, en este caso, K_{SV} es igual a K_S .

6.3. Metodología para diferenciar tipos de *quenching*.

Existen varios métodos tendientes a distinguir entre un proceso de *quenching* dinámico y uno estático. Entre ellos se encuentran el estudio de la dependencia del *quenching* con la temperatura y la viscosidad de medio. Sin embargo, el método más conveniente para este propósito es el análisis de la dependencia de los τ_F con la concentración del *quencher*.

Puede deducirse rápidamente que, si el *quenching* es dinámico el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de *quencher* (τ_F^0/τ_F) es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F^0/Φ_F o I_F^0/I_F). Por consiguiente, puede escribirse la siguiente ecuación para describir la dependencia de los τ_F y/o I_F con la concentración de *quencher*:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (15)$$

Si por el contrario, existe un *quenching* estático una fracción del compuesto emisor se encuentra “secuestrada” formando parte del complejo no emisor. Por lo tanto, la fluorescencia observada proviene del fluoróforo “libre”. Esta fracción no ha sido alterada, por lo que, el τ_F que se mide es igual al tiempo de vida en ausencia del *quencher* (τ_F^0). En definitiva, el cociente τ_F^0/τ_F será independiente de la concentración del *quencher*, e igual a 1 como lo indica la siguiente ecuación:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = 1 \quad (16)$$

Puede apreciarse que, midiendo τ_F a distintas concentraciones del *quencher* y luego graficando τ_F^0/τ_F versus $[Q]$, puede diferenciarse claramente entre un proceso de *quenching* de tipo dinámico y otro estático. En el primer caso se obtendrán gráficas lineales con

pendientes idénticas a las constantes K_{SV} encontradas en las gráficas de Stern-Volmer obtenidas de las medidas de intensidad de fluorescencia (I_F). En el segundo caso, se obtendrá una línea horizontal. Ambos comportamientos están representados en la figura 6.2. Este método fue el empleado en el presente trabajo de tesis para analizar los procesos de *quenching* estudiados.

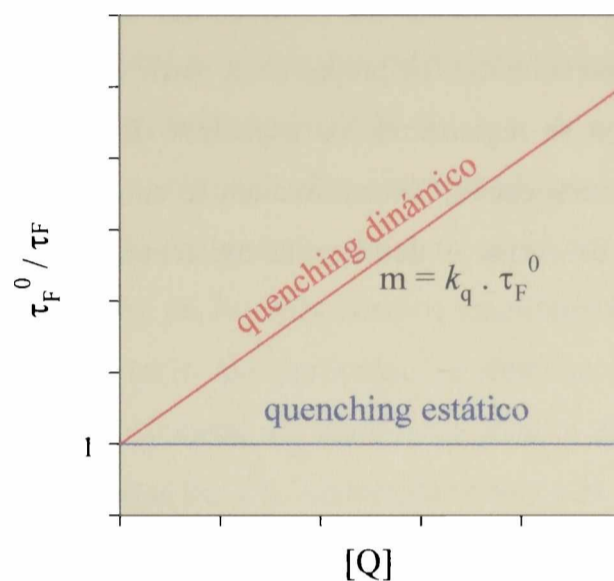


Figura 6.2: Representación de Stern-Volmer a partir de tiempos de vida de fluorescencia para quenching dinámico y quenching estático.

En el capítulo 4 se presentaron algunos resultados que ponen en evidencia la existencia de procesos de *quenching* de fluorescencia de pterinas por diferentes aniones (hidroxilos, fosfatos, acetatos). Estos resultados sugieren que existe una interacción entre el estado singlete excitado de las pterinas estudiadas y algunos aniones. Sobre la base de estos resultados, fue necesario desarrollar un estudio sistemático con los derivados pterínicos estudiados en el presente trabajo de tesis, con el objeto de obtener mayor información sobre el comportamiento de los mismos y establecer las condiciones óptimas de trabajo en los diferentes experimentos. Para esto se realizaron estudios preliminares de *quenching* de fluorescencia, utilizando el espectrofluorómetro Perkin-Elmer detallado en el capítulo anterior. En este estudio previo se buscó la presencia de procesos de *quenching* realizando un gran número de experimentos cambiando el derivado pterínico, el *quencher* (anión), su concentración y las condiciones de pH. Luego se realizó un estudio sistemático,

con el equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)*, donde se midieron los espectros de emisión y los τ_F en soluciones de pterinas a diferentes concentraciones de aniones. Los resultados de estos estudios se presentan en el capítulo 11.

Las soluciones se prepararon a partir de soluciones madres de la pterina en estudio, a las que se les ajustó el pH al valor final y agua al mismo pH. Se mezcló 1 ml de la solución madre de pterina con 2 ml de una solución del anión a diferente concentración y del mismo pH. Esta última solución fue preparada a partir de la solución madre del anión y agua. En todos los casos se registraron los espectros de absorción antes y después de realizar la medida de fluorescencia. De esta manera se controló la estabilidad de cada una de las soluciones para descartar o detectar la existencia de cambios químicos en las mismas.

6.4. Referencias.

- [1] Lakowicz J. R., "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*", Plenum Press. Lakowicz, (1983).
- [2] Turro N. J. "*Modern Molecular Photochemistry*", University Science Books (1991).
- [3] Gilbert A. y Baggott J. "*Essentials of Molecular Photochemistry*", Blackwell Science (1991).

ESTUDIOS SOBRE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

En este capítulo se describen los diferentes métodos utilizados para la detección y cuantificación de algunas especies reactivas del oxígeno (ERO). En particular se describen las técnicas usadas para la determinación de los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) y para la cuantificación de H_2O_2 .

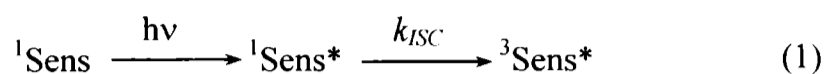
Asimismo se describen metodologías que permiten evaluar, por un lado, la reactividad de las pterinas frente a una serie de especies reactivas y, por otro, evaluar la participación de dichas especies en los mecanismos implicados en las foto-oxidaciones estudiadas en este trabajo de tesis. En particular, se detallan las técnicas usadas para determinar las constantes de velocidad de *quenching* total y de *quenching* químico de oxígeno singlete (1O_2) por pterinas (k_T y k_r respectivamente) y se detallan los fundamentos de los experimentos de irradiación realizados en D_2O . Adicionalmente se describen los fundamentos de las fotólisis realizadas en presencia de secuestradores selectivos de radicales hidroxilos (HO^{\cdot}).

7.1 Oxígeno singlete.

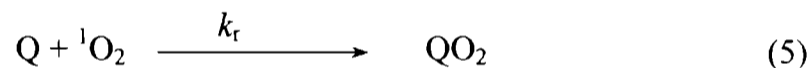
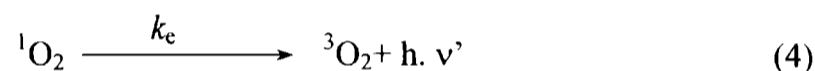
En el capítulo 3 se expusieron las características generales del 1O_2 , junto con las diferentes vías de producción. En particular se describió el mecanismo de generación fotosensibilizada de 1O_2 , el cual consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada al O_2 ^[1]. Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el O_2 queda en su estado excitado singlete (1O_2). Como parte de este trabajo de tesis, se investigó la capacidad que tienen las pterinas excitadas de generar 1O_2 , es por esto que en el presente capítulo se describirá el método experimental utilizado para la determinación de rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 (Φ_{Δ}).

El posible sensibilizador (1Sens) es, en este caso, una molécula de pterina. Éste absorbe luz UV-A y se genera un estado excitado singlete ($^1Sens^*$), el cual, mediante un cruzamiento intersistemas, genera cierta proporción de moléculas en estado triplete

($^3\text{Sens}^*$) de mayor tiempo de vida (ecuación 1). Este estado triplete del sensibilizador puede transferir su energía hacia el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) disuelto en el medio (ecuación 2).



La desactivación del $^1\text{O}_2$ puede ocurrir en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz) (ecuaciones 3 y 4). En presencia de otra sustancia capaz de actuar como *quencher* (Q), deben considerarse el *quenching* químico o físico (ecuaciones 5 y 6). Cabe aclarar que el rendimiento cuántico de fosforescencia es casi siempre despreciable respecto al rendimiento cuántico de desactivación por el solvente.



7.1.1. Método de detección de oxígeno singlete.

El fundamento de la técnica empleada consiste en la medida de la luminiscencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm, producido durante la irradiación continua de una solución de la sustancia que se quiere investigar^[2].

Como se describió anteriormente, el reemplazo del agua común por agua deuterada, o agua pesada (D_2O), disminuye la velocidad de desactivación del estado singlete aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen. El resultado es un tiempo de vida mucho mayor en D_2O que en H_2O (de 3 a 4 μs en H_2O a 62 μs en D_2O ^[3,4]). Los estudios se realizan en soluciones preparadas en agua deuterada, D_2O (Euriso-top, CAE, Saclay, France de 99,9 % de pureza isotópica), como

solvente, en el cual se obtienen señales mayores que usando agua común, aumentando así la sensibilidad del método significativamente^[5-7].

El pD ($-\log [D^+]$) fue medido con un pH-meter Schott CG 743P en combinación con un electrodo Blue Line 0,14 pH (Schott). Los valores de pD se calcularon aplicando la siguiente corrección a cada medida:

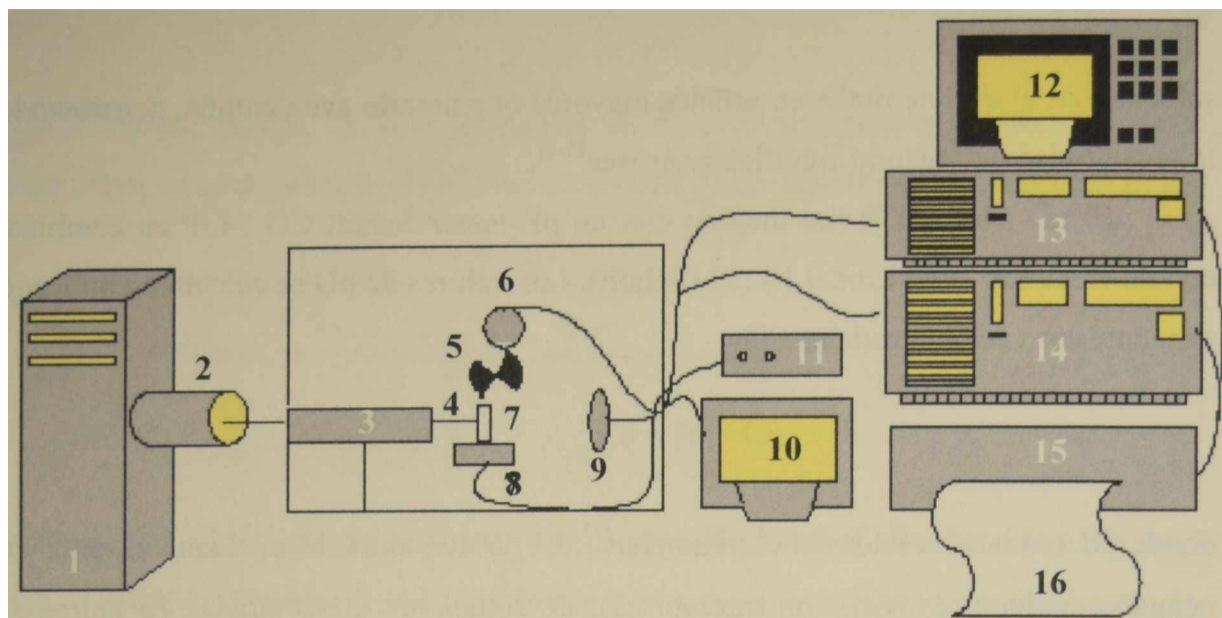
$$pD = pH + 0,4 \quad (7)$$

donde pH es el valor leído en el pH-meter^[8]. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes (μ l), con micropipeta, de soluciones concentradas de hidróxido de sodio deuterado, NaOD (CEA) y de ácido clorhídrico deuterado, DCl (Aldrich, 99,5%). Las soluciones a estudiar se prepararon de modo tal que la absorbancia a la longitud de onda de excitación fue siempre mayor a 0,6.

En el esquema 1 están representados los componentes principales del equipo utilizado en esta técnica y en la figura 7.1 se muestran fotografías del mismo. 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 B204, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. 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. El haz 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 fotomultiplicador de infrarrojo cercano (NIR marca Hamamatsu) ubicado en ángulo recto respecto al haz incidente. Este dispositivo de detección trabaja a -80 °C y para esto, consta de un sistema de refrigeración que emplea nitrógeno líquido para alcanzar dicha temperatura. El detector está conectado a dos amplificadores (lock-in) los cuales envían, cada uno, una señal a un registrador Y-t y a un osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz.^[9-11].

La longitud de onda de excitación se elige teniendo en cuenta los máximos de absorción de los sensibilizadores a estudiar y el espectro de emisión de la lámpara de excitación. Para las pterinas se utilizó, en todos los casos, luz de longitud de onda de 367 nm. La potencia de la luz incidente (F_0 , mW) se midió por medio de una termopila (Laser instrumentation, model 154).



Esquema 1: Esquema del equipo utilizado para las determinaciones de $^1\text{O}_2$, donde: 1_ Lámpara Xe/Hg Osram de 1kW. 2_ Filtro de agua. 3_ Monocromador ISA Jobin-Yvon B204, de 6 nm de ancho de banda. 4_ Luz incidente. 5_ Chopper calibrado a 11 Hz. 6_ Filtro tipo cut-off de 1000 nm, filtro de interferencia de 1271 nm y fotomultiplicador de infrarrojo cercano (NIR, marca Hamamatsu) enfriado con nitrógeno líquido. 7_ Celda de cuarzo de 1x1 cm. 8_ Agitador magnético. 9_ Detector del radiómetro. 10_ Radiómetro. 11_ Controlador del agitador magnético. 12_ Osciloscopio digital HP 54602B, 150 Mz. 13_ Amplificador 1 (lock-in). 14_ Amplificador 2 (lock-in). 15_ Registrador Y-t. 16_ Señal impresa.

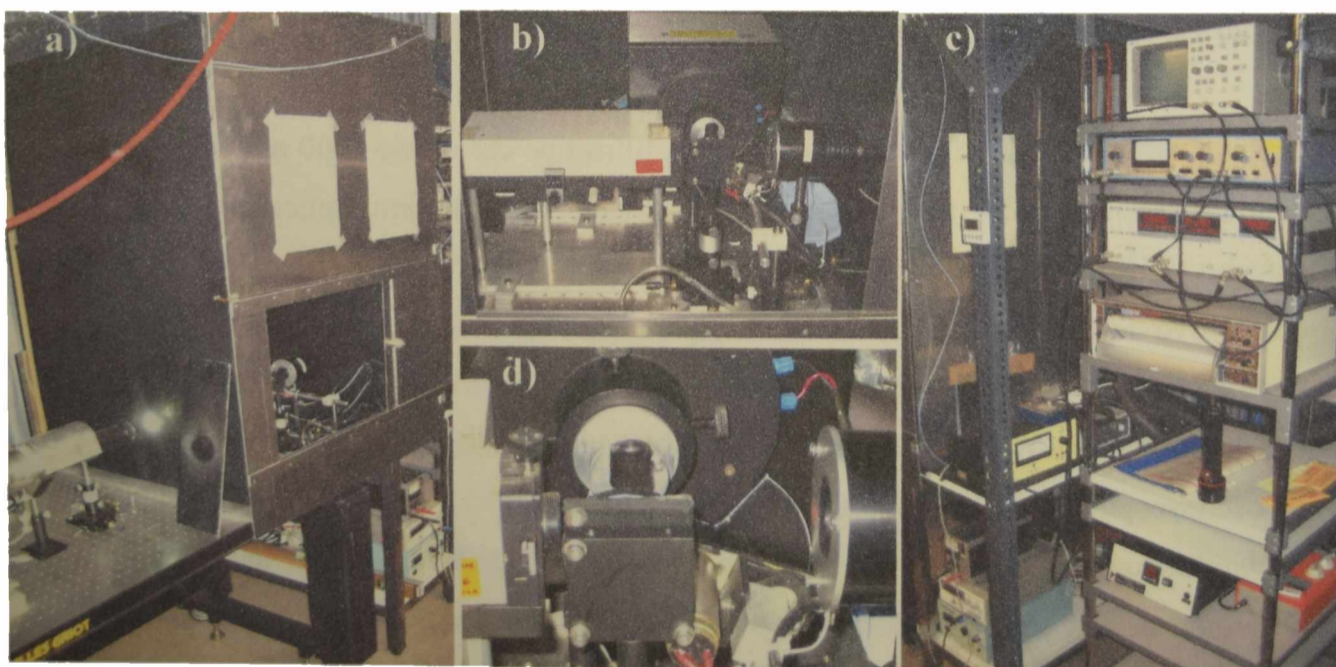


Figura 7.1: Fotografías del equipo utilizado para la determinación de $^1\text{O}_2$. a) Muestra la lámpara de excitación, junto con una visión lateral de la caja negra de irradiación. b) Muestra el interior de la caja negra de irradiación. c) Muestra el equipamiento de operación del equipo y de registro de la señal d) Ampliación de la figura b).

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. Sistemáticamente se registraron señales durante nueve minutos totales repartidos en tres minutos para cada una de las tres etapas de la medida: se controla la línea de base tres minutos, se irradia durante tres minutos y se vuelve a controlar la línea de base tres minutos más. Además se tomaron los espectros de absorción antes y después de la irradiación en un espectrofotómetro Cary 5 (Varian). Este control se realizó para determinar si durante la iluminación de la muestra se producía transformación química de la misma. Cada señal es amplificada y registrada. Se obtienen dos registros de cada señal, debido a que, como se mencionó anteriormente, el equipo cuenta con dos amplificadores (Figura 7.2, corresponde a dos registros, rojo y azul, de la misma señal).

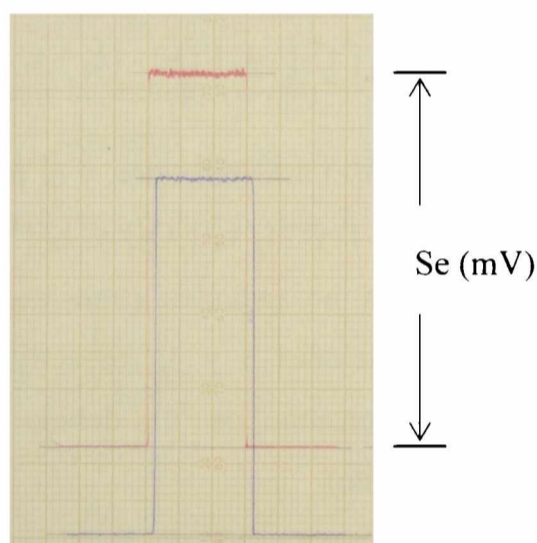


Figura 7.2: Registros de una señal de $^1\text{O}_2$.

Dado un conjunto de condiciones experimentales (longitud de onda de excitación, absorbancia de la solución a analizar a dicha longitud de onda, solvente, etc.) la diferencia entre el voltaje proveniente del detector, en presencia y ausencia de luz, es proporcional a la concentración de estado estacionario de $^1\text{O}_2$ presente en la solución durante la irradiación. La obtención de este parámetro (Se), se muestra esquemáticamente en la Figura 7.2.

Para determinar el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) de una sustancia a un determinado pD, debe compararse el parámetro Se correspondiente a la

muestra en estudio, con la señal correspondiente al compuesto de referencia (Se^R), cuyo Φ_{Δ} es perfectamente conocido.

7.1.2. Determinación del 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. Bajo condiciones de irradiación continua, teniendo en cuenta las ecuaciones 1 a 6 planteadas anteriormente y que Q representa al sensibilizador (Sens), puede escribirse la siguiente expresión:

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = \Phi_{\Delta} \cdot P_a - k_d [^1O_2] - k_e [^1O_2] - (k_q + k_r) [\text{Sens}] [^1O_2] \quad (7)$$

donde P_a es la luz absorbida por el sensibilizador, y el producto $\Phi_{\Delta} \cdot P_a$ es la velocidad de generación de 1O_2 (ecuaciones 1 y 2). $k_d [^1O_2]$ y $k_e [^1O_2]$ representan la velocidad de desactivación de 1O_2 en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz) (ecuaciones 3 y 4, respectivamente). $(k_r + k_q) [\text{Sens}] [^1O_2]$ representan la velocidad de consumo de 1O_2 debido al *quenching* químico y físico (ecuaciones 5 y 6, respectivamente).

Teniendo en cuenta la aproximación del estado estacionario, puede suponerse que $d[^1O_2]/dt \approx 0$. Reordenando la ecuación 7 y despreciando el producto $k_e [^1O_2]$ (por ser mucho menor que el producto $k_d [^1O_2]$), se obtiene la siguiente expresión para la concentración de estado estacionario de 1O_2 :

$$[^1O_2] = \frac{\Phi_{\Delta} \cdot P_a}{k_d + (k_q + k_r) [\text{Sens}]} \quad (9)$$

Como ya se dijo, la señal obtenida para cada sustancia es proporcional a la cantidad de 1O_2 que se genera. Esta señal depende de las características del equipo, el sensibilizador y el medio. Esta correlación se presenta en la siguiente ecuación:

$$Se = C k_e (1/n^2) [^1O_2] = C k_e (1/n^2) P_o (1 \cdot 10^{-A}) \Phi_{\Delta}^S \frac{1}{k_d + (k_q + k_r) [\text{Sens}]} \quad (10)$$

donde C es un factor de proporcionalidad que incluye la geometría y factores electrónicos del sistema de detección; P_0 es la tasa de fotones incidentes; A la absorbancia del sensibilizador a la longitud de onda de excitación (así el producto $P_0 (1-10^{-A})$ representa la tasa de fotones absorbidos por el sensibilizador, es decir P_a); Φ_{Δ}^S es el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 por el sensibilizador; k_e es la constante de desactivación radiativa del 1O_2 ; $(1/k_d)$ el tiempo de vida del 1O_2 y n el índice de refracción del medio.

Se utilizaron como referencias sustancias con rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 conocidos (Φ_{Δ}^R). Se prepararon soluciones de las referencias en agua deuterada (D_2O), con una absorbancia y un pD iguales a los de la solución de la sustancia cuyo rendimiento cuántico (Φ_{Δ}^S) se quiere determinar. De acuerdo al pD se utilizaron dos referencias diferentes: para el medio alcalino se eligió rosa de bengala (RB), y para medio ácido 1H-fenalen-1-ona (fenalenona) (ver figura 7.3). La longitud de onda de excitación fue 367 nm para todas las pterinas y la fenalenona ($\Phi_{\Delta}^R = 0,975$, en D_2O)^[11]. Para el RB se irradió a 547 nm ($\Phi_{\Delta}^R = 0,76$ en D_2O)^[12,13]. Los valores de absorbancia se fijaron entre 0,6 y 1,6. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorescencia de 1 cm por 1 cm.

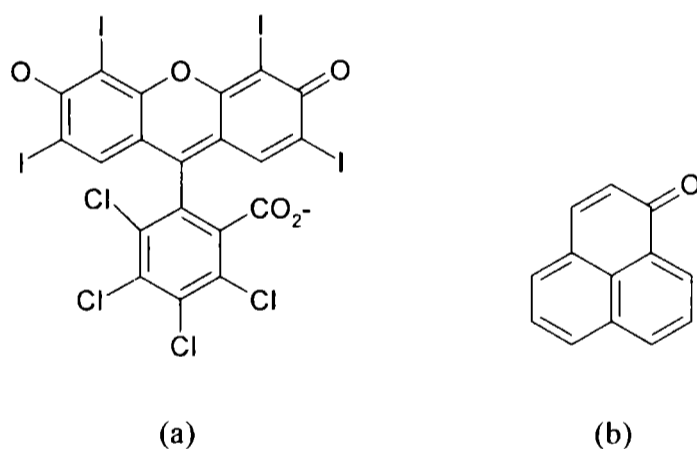


Figura 7.3: Estructura química de los fotosensibilizadores utilizados. a) Rosa de bengala y b) Fenalenona.

Si las señales luminosas son monitoreadas usando soluciones ópticamente comparables de la muestra y la referencia, la relación entre las señales de la emisión fosforescente del 1O_2 de la muestra (Se^S) y la referencia (Se^R) es proporcional a la relación entre los rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 . Entonces el cociente entre la magnitud de ambas señales estará dado por la Ecuación (11):

$$\frac{Se^S}{Se^R} = \frac{\Phi_{\Delta}^S}{\Phi_{\Delta}^R} \frac{k_d}{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])} \frac{P_0^S (1 - 10^{-A_S})}{P_0^R (1 - 10^{-A_R})} \quad (11)$$

donde el superíndice ^S se refiere al sensibilizador en estudio y el superíndice ^R se refiere a la referencia; k_T^S es la constante bimolecular de *quenching* total de ¹O₂ por el sensibilizador ($k_T^S = k_q^S + k_r^S$). La desactivación del ¹O₂ por la referencia no fue considerada porque para las dos referencias utilizadas este fenómeno es despreciable. Los términos k_e , n y C se mantienen constantes en ambas medidas y por lo tanto se anulan al formular el cociente.

Debido a la diferencia entre la intensidad de la luz incidente (P_0) a las longitudes de onda de excitación de la muestra y la referencia (λ^S y λ^R), a causa del espectro de emisión de la lámpara, es necesario introducir el factor de corrección P_0^S / P_0^R . Este factor puede escribirse como $F_0^S \cdot \lambda^S / F_0^R \cdot \lambda^R$. La potencia de la luz incidente, F_0 , se mide con una termopila *Laser Instrumentation* modelo 154. El otro factor que está presente en la ecuación (11), $[(1 - 10^{-A_S}) / (1 - 10^{-A_R})]$, se origina en la diferente cantidad de fotones absorbidos por la muestra y por la referencia. Sin embargo, como se trabajó en condiciones tales que la absorbancia de ambas soluciones fue igual para cada experimento, este factor puede simplificarse.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y despejando Φ_{Δ}^S de la Ecuación (11), se obtiene:

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \frac{F_0^R \cdot \lambda^R}{F_0^S \cdot \lambda^S} \frac{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])}{k_d} \quad (12)$$

En aquellos casos en los cuales la referencia y la muestra se excitan a la misma longitud de onda, la Ecuación (12) se reduce a:

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \frac{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])}{k_d} \quad (13)$$

En el presente trabajo de tesis, como ya se mencionó, se utilizaron dos referencias según el pD. En las medidas realizadas en medio ácido se empleó fenalenona como referencia y, en este caso, la muestra y la referencia se excitaron a 367 nm. Para los cálculos se empleó la Ecuación (13). En medio alcalino, en cambio, se utilizó RB como

referencia, y, en este caso, la referencia se excitó a 547 nm (debido a que a 367 nm su coeficiente de extinción molar es muy bajo) y la muestra a 367 nm. Por esta razón, no puede eliminarse el factor que corrige la diferencia de intensidad a diferentes longitudes de onda, entonces se utilizó la Ecuación (12).

Está claro, que para calcular los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}^S) es necesario conocer la constante bimolecular de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T^S). De lo contrario, se determina un rendimiento cuántico aparente ($\Phi_{\Delta}^{\text{ap}}$) dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\Delta}^{\text{ap}} = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{\text{Se}^S}{\text{Se}^R} \cdot \frac{F_0^R \cdot \lambda^R}{F_0^X \cdot \lambda^X} \quad (14)$$

donde:

$$\Phi_{\Delta}^{\text{ap}} = \Phi_{\Delta}^S \cdot \frac{k_d}{(k_d + k_T^S [\text{Sens}])} \quad (15)$$

7.1.3. Determinación de la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$.

Las constantes de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T) se determinaron por análisis de Stern-Volmer del *quenching* de $^1\text{O}_2$ ^[14]. Para este propósito se trabajó con el mismo equipo y en las mismas condiciones a las usadas para las medidas de producción de $^1\text{O}_2$, descritas en la sección anterior. En este caso, para la producción fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$ se utilizó RB como sensibilizador. En todos los casos la longitud de onda de excitación fue 547 nm. En esta región del espectro las pterinas no absorben la radiación incidente. Se mantuvo constante la concentración de RB y se varió la concentración de pterinas. La concentración de RB fue tal que el *quenching* de $^1\text{O}_2$ por ella misma es despreciable comparado con la desactivación por el solvente.

Se realizó el análisis de Stern-Volmer, en una gráfica de la relación entre las señales en ausencia (S_e^0) y en presencia (S_e) de *quencher* versus la concentración del

mismo, de acuerdo a la ecuación (16) y de la pendiente de la grafica se calculó el valor de k_T :

$$S_e^0 / (S_e) = \Phi_e^0 / \Phi_e = 1 + k_T \tau_A^0 [Q] \quad (16)$$

En el presente trabajo los *quenchers* utilizados fueron 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT), 6,7-dimetilpterina (DPT) y ácido N-metil fólico (MAF). Como ejemplo, en la figura 7.4, se presentan los resultados observados para MPT, en D₂O a pD 10.5.

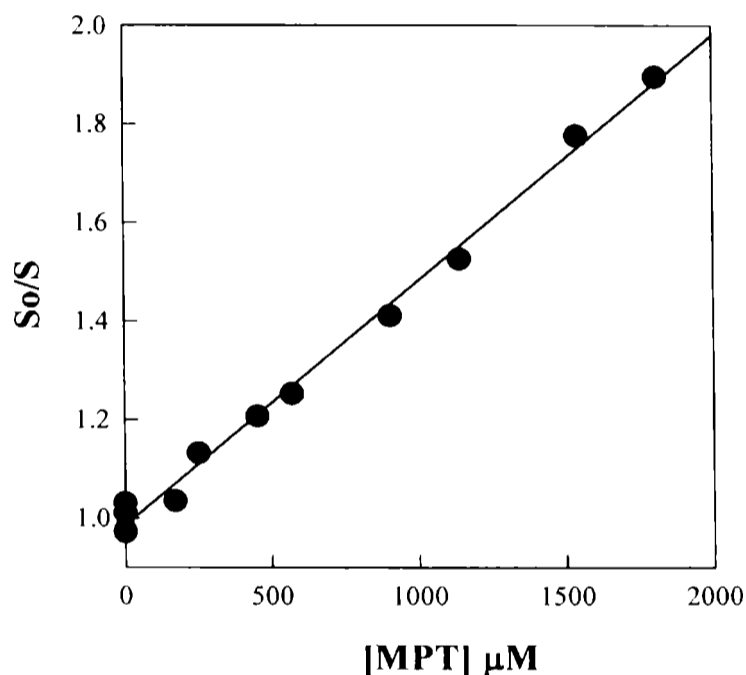


Figura 7.4: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de la emisión infrarroja del ¹O₂ por MPT en D₂O (se usó RB como sensibilizador, λ_{EX}=547 nm; pD=10,5).

7.1.4. Determinación de la constante de velocidad de la reacción química entre las pterinas y el ¹O₂.

Para determinar el valor de k_T de las diferentes pterinas estudiadas, se realizaron grupos de experimentos irradiando soluciones acuosas conteniendo mezclas de la pterina en estudio (Q) y RB, que actuó como sensibilizador de ¹O₂ (Sens). En estos experimentos,

la longitud de onda de excitación fue de 547 nm. En el capítulo 10 donde se muestran los espectros de absorción de las pterinas estudiadas en este trabajo de tesis, se muestra que estos compuestos no poseen bandas de absorción en esta región del espectro. De esta manera, irradiando a 547nm, el único componente de la mezcla capaz de absorber la radiación incidente es el RB. Para cada grupo de experimentos, la concentración de Q y de RB se mantuvo constante y se determinó la evolución de la concentración de Q con el tiempo de irradiación. La concentración de pterinas se midió por HPLC.

La velocidad de desaparición del compuesto Q por reacción con $^1\text{O}_2$ producido por sensibilización, esta dada por la ecuación (17):

$$-\frac{d[\text{Q}]}{dt} = k_r [\text{Q}] [^1\text{O}_2] \quad (17)$$

Considerando que los productos de la reacción no producen ningún tipo de interferencia, se puede estimar la concentración en estado estacionario del $^1\text{O}_2$ por medio de la siguiente reacción:

$$[^1\text{O}_2] = \frac{\Phi_{\Delta}^S \cdot P_a}{k_d + k_T^S [\text{Sens}] + k_T^Q [\text{Q}]} \quad (18)$$

donde P_a ($\text{E l}^{-1}\text{s}^{-1}$) es la intensidad de fotones absorbidos por el sensibilizador, Φ_{Δ}^S es el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ del sensibilizador, k_d es la constante de velocidad de desactivación de $^1\text{O}_2$ no-radiativa, $[\text{Sens}]$ es la concentración del sensibilizador, k_T^S es la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por el sensibilizador y k_T^Q es la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por Q.

Reemplazando en la ecuación 17 la expresión de $[^1\text{O}_2]$ dada por la ecuación 18, se obtiene:

$$-\frac{d[\text{Q}]}{dt} = P_a \Phi_{\Delta}^S \frac{k_r [\text{Q}]}{k_d + k_T^S [\text{Sens}] + k_T^Q [\text{Q}]} \quad (19)$$

Si la velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ es despreciable comparada con la desactivación por el solvente ($k_d \gg k_T^S [\text{Sens}]$), integrando la ecuación (19) se obtiene:

mismo, de acuerdo a la ecuación (16) y de la pendiente de la grafica se calculó el valor de k_T :

$$S_e^0 / (S_e) = \Phi_e^0 / \Phi_e = 1 + k_T \tau_{\Delta}^0 [Q] \quad (16)$$

En el presente trabajo los *quenchers* utilizados fueron 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT), 6,7-dimetilpterina (DPT) y ácido N-metil fólico (MAF). Como ejemplo, en la figura 7.4, se presentan los resultados observados para MPT, en D₂O a pD 10,5.

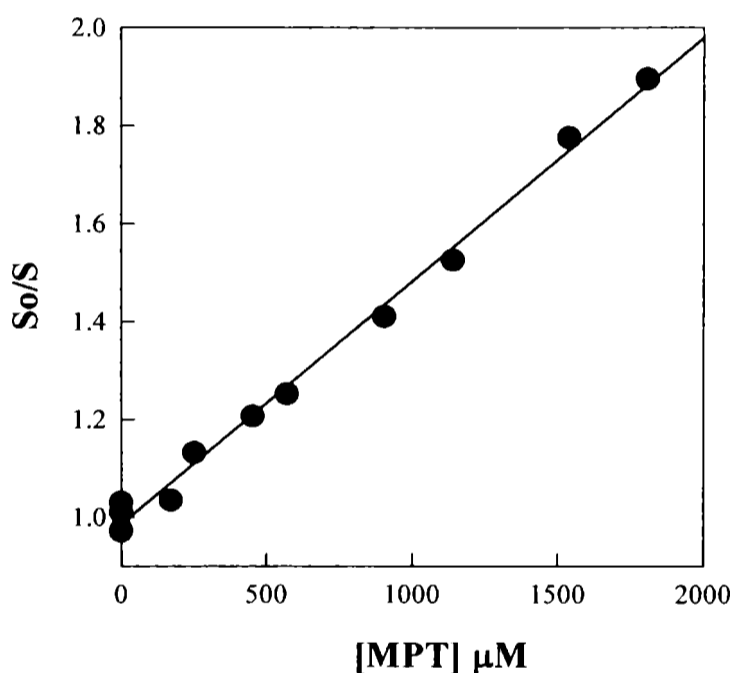


Figura 7.4: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de la emisión infrarroja del ¹O₂ por MPT en D₂O (se usó RB como sensibilizador, λ_{EX}=547 nm; pD=10,5).

7.1.4. Determinación de la constante de velocidad de la reacción química entre las pterinas y el ¹O₂.

Para determinar el valor de k_r de las diferentes pterinas estudiadas, se realizaron grupos de experimentos irradiando soluciones acuosas conteniendo mezclas de la pterina en estudio (Q) y RB, que actuó como sensibilizador de ¹O₂ (Sens). En estos experimentos,

la longitud de onda de excitación fue de 547 nm. En el capítulo 10 donde se muestran los espectros de absorción de las pterinas estudiadas en este trabajo de tesis, se muestra que estos compuestos no poseen bandas de absorción en esta región del espectro. De esta manera, irradiando a 547nm, el único componente de la mezcla capaz de absorber la radiación incidente es el RB. Para cada grupo de experimentos, la concentración de Q y de RB se mantuvo constante y se determinó la evolución de la concentración de Q con el tiempo de irradiación. La concentración de pterinas se midió por HPLC.

La velocidad de desaparición del compuesto Q por reacción con $^1\text{O}_2$ producido por sensibilización, esta dada por la ecuación (17):

$$-\frac{d[Q]}{dt} = k_r [Q] [^1\text{O}_2] \quad (17)$$

Considerando que los productos de la reacción no producen ningún tipo de interferencia, se puede estimar la concentración en estado estacionario del $^1\text{O}_2$ por medio de la siguiente reacción:

$$[^1\text{O}_2] = \frac{\Phi_{\Delta}^S \cdot P_a}{k_d + k_T^S [\text{Sens}] + k_T^Q [Q]} \quad (18)$$

donde P_a ($\text{E l}^{-1}\text{s}^{-1}$) es la intensidad de fotones absorbidos por el sensibilizador, Φ_{Δ}^S es el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ del sensibilizador, k_d es la constante de velocidad de desactivación de $^1\text{O}_2$ no-radiativa, $[\text{Sens}]$ es la concentración del sensibilizador, k_T^S es la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por el sensibilizador y k_T^Q es la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por Q.

Reemplazando en la ecuación 17 la expresión de $[^1\text{O}_2]$ dada por la ecuación 18, se obtiene:

$$-\frac{d[Q]}{dt} = P_a \Phi_{\Delta}^S \frac{k_r [Q]}{k_d + k_T^S [\text{Sens}] + k_T^Q [Q]} \quad (19)$$

Si la velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ es despreciable comparada con la desactivación por el solvente ($k_d \gg k_T^S [\text{Sens}]$), integrando la ecuación (19) se obtiene:

$$f([Q]) = \ln([Q]/[Q]_0) - (k_T^Q/k_d) ([Q]_0 - [Q]) = - P_a \Phi_{\Delta}^S (k_r/k_d) t \quad (20)$$

El gráfico $f([Q])$ en función del tiempo de irradiación debería ser lineal, y de la pendiente de la recta puede calcularse k_r si se conoce el Φ_{Δ} del sensibilizador utilizado.

Para la determinación de k_r , se realizaron grupos de experimentos irradiando ($\lambda_{EX}=547$ nm) soluciones acuosas (H_2O o D_2O) conteniendo el compuesto en estudio ($Q=PT, MPT, DPT, HPT, MAF, AF$ y APT) y RB. La concentraciones de las pterinas se mantuvo dentro del intervalo comprendido entre 100 y 1000 μM . Todas las determinaciones se realizaron en soluciones alcalinas ($pD=10,5$). El rendimiento cuántico de producción de 1O_2 del RB (Φ_{Δ}^S) es de 0,75^[12,13].

La evolución de la concentración de Q con el tiempo de irradiación se monitoreó con un equipo HPLC (*Hewlett Packard Series 1100*) con columna *LiChro CART 125-4 RP 17* (5 μM). Como solvente de corrida se utilizaron soluciones acuosas de fosfato de potasio 20 mM ($pH = 5,5$) y EDTA 2,5 mM.

Las soluciones fueron irradiadas en celdas espectroscópicas de cuarzo de 1 cm x 1 cm, bajo continua agitación magnética, usando el mismo banco óptico y sistema de irradiación que el descrito en la sección 7.1.1. La intensidad de luz emitida por la lámpara (P_o), a la longitud de onda de excitación del sensibilizador (547 nm), se determinó por actinometría, usando Aberchrome 540 como actinómetro^[15]. Se obtuvieron valores de $P_o=2,7(\pm 0,2) \times 10^{-6}$ E $l^{-1}s^{-1}$ a 547 nm. La ley de Lambert-Beer correlaciona el valor de la intensidad de fotones absorbidos por el sensibilizador (P_a) con la intensidad de fotones emitidos por la lámpara (P_o). Usando la siguiente ecuación se calculó P_a :

$$P_a = P_o (1 - 10^{-A}) \quad (21)$$

donde A es la absorbancia del sensibilizador a la longitud de onda de excitación.

Como ejemplo, en la figura 7.4 se presentan los resultados obtenidos para una solución de AF (100 μM). Se irradiaron mezclas de AF y RB, en D_2O a pD 10,5. En la figura 7.5a se observa la evolución de la concentración de AF en función del tiempo de irradiación. En la figura 7.5b se muestra la grafica de $f([Q])$ en función del tiempo de irradiación.

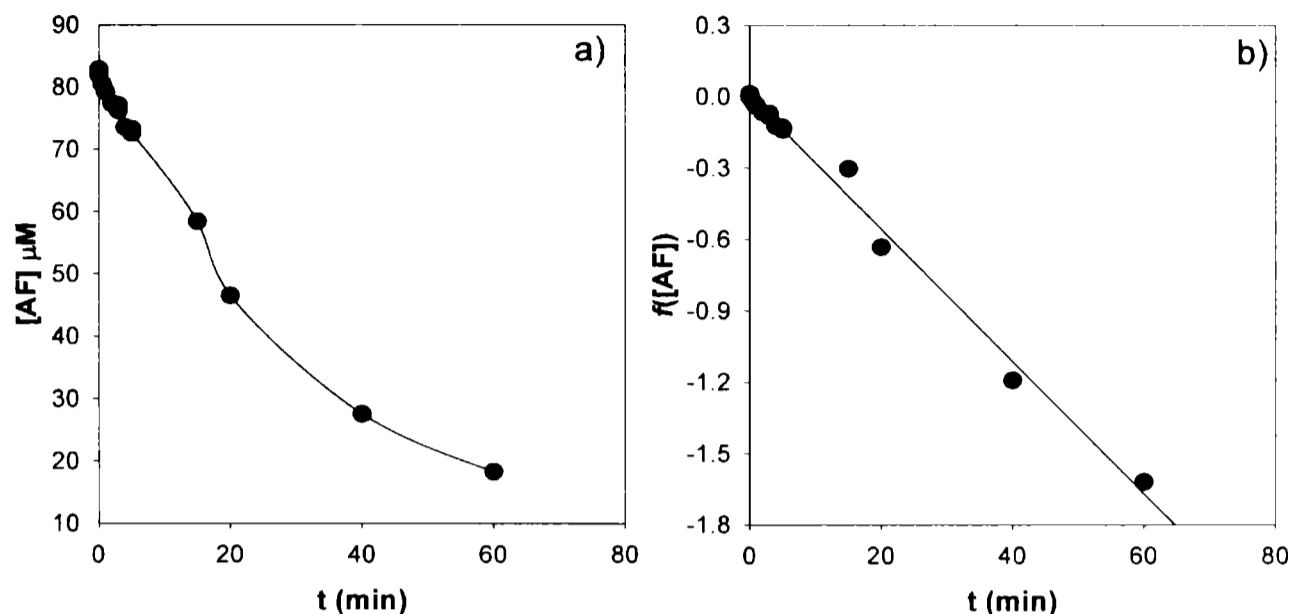


Figura 7.5: Oxidación fotosensibilizada de AF en solución alcalina en D₂O ([AF]₀=100 μM; pD=10,4), equilibrada con aire. Sensibilizador: RB (λ_{EX}=547 nm). La concentración de AF se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de AF con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([AF])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20)).

7.1.5. Fotólisis en agua deuterada.

Tal como se mostrará más adelante (Capítulo 12) varios de los compuestos estudiados son relativamente buenos productores de ¹O₂. Debido a que, como se explicó anteriormente (capítulo 3), el ¹O₂ es una especie muy reactiva, es interesante investigar la participación del mismo en los mecanismos de las fotooxidaciones investigados.

Como se mencionó anteriormente, el tiempo de vida media (τ_Δ) del ¹O₂ en H₂O (3,7 μs), es mucho menor que el τ_Δ observado en D₂O (62(±3) μs)^[3,4]. Bajo condiciones experimentales de irradiación continua de un sensibilizador (por ejemplo, un derivado pterínico), la [¹O₂] en estado estacionario será aproximadamente 16 veces mayor en D₂O que en H₂O (ver ecuación 18, sección 7.1.4). Por consiguiente, aquellas reacciones en las cuales participa el ¹O₂ como reactivo, aumentarán su velocidad en D₂O en un factor aproximadamente 16. La técnica descrita en esta sección se basa en la comparación de fotólisis realizadas en H₂O con fotólisis realizadas en D₂O.

Se prepararon dos grupos soluciones del compuesto en estudio (PT, MPT y HPT); para un grupo se utilizó H₂O como solvente y para el otro, D₂O. Se irradiaron los dos grupos de soluciones bajo las mismas condiciones experimentales. El efecto del D₂O se evaluó por espectrofotometría UV-visible, análisis por HPLC y determinación de la concentración de H₂O₂.

Como se explicó en el capítulo 5, el análisis espectrofotométrico es muy útil para comparar la naturaleza de los procesos químicos que ocurren en ambas fotólisis. En primer lugar, mediante esta técnica, se registran los espectros de absorción, DE y DEN. De esta manera puede compararse la posición y la intensidad relativa de los máximos y mínimos de absorción. En segundo lugar, esta técnica se utiliza para comparar la evolución de la absorbancia con el tiempo de irradiación. Para esto, se debe elegir una región del espectro donde los productos de la fotólisis no absorban la radiación incidente. Comparando las velocidades de cambio de la absorbancia observada en los dos medios (H₂O y D₂O) se puede evaluar si existe o no un incremento en la velocidad.

En la figura 7.6 se comparan los espectros DEN calculados a partir de los espectros de absorción de una fotólisis de una solución de MPT (150μM; pH=10,5) en D₂O y en H₂O.

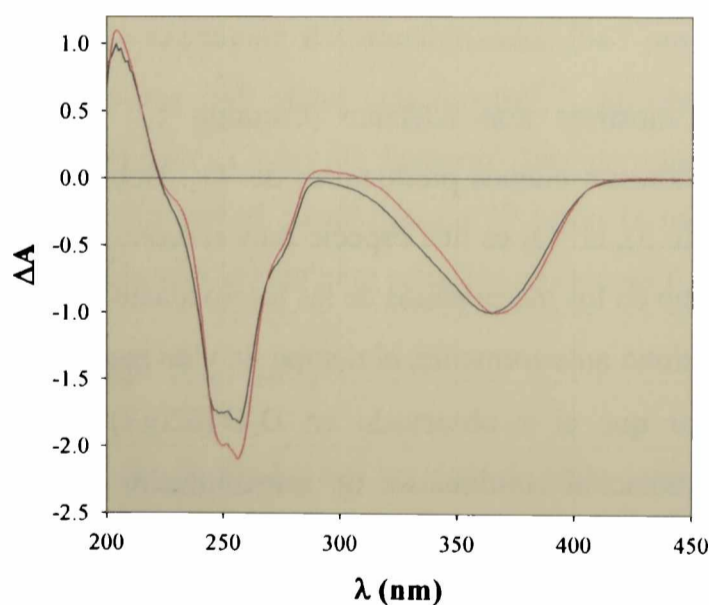


Figura 7.6: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de MPT inicial ($[MPT]_0=150\mu M$; pH=10,5) al espectro obtenido después de 90 minutos de irradiación en H₂O; El espectro DEN () se obtuvo restando el espectro de MPT inicial ($[MPT]_0=150\mu M$; pH=10,5) al espectro obtenido después de 90 minutos de irradiación en D₂O.

Análogamente, en la figura 7.7 se muestran los resultados obtenidos por HPLC de la experiencia detallada en el párrafo anterior. En esta figura se muestra la variación de la concentración de MPT en función del tiempo de irradiación. En este ejemplo en particular, se puede ver que existe un incremento en la velocidad de consumo de MPT cuando la fotólisis se realiza en D₂O comparada con la fotólisis en H₂O.

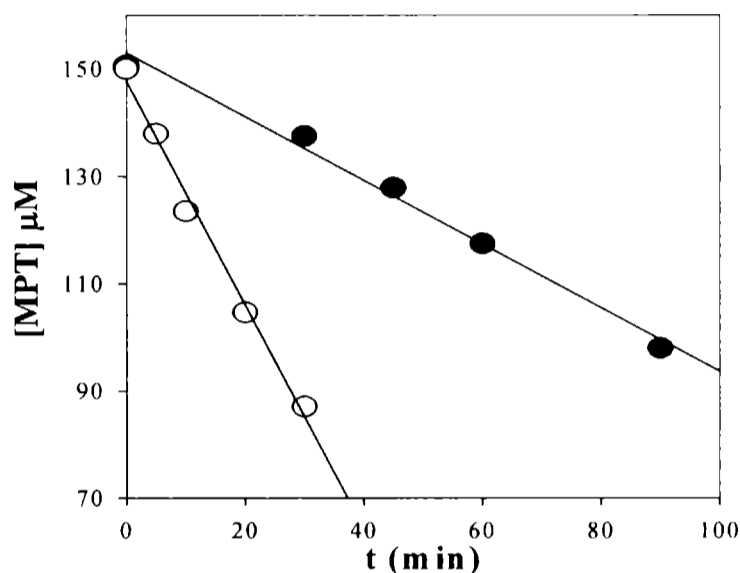
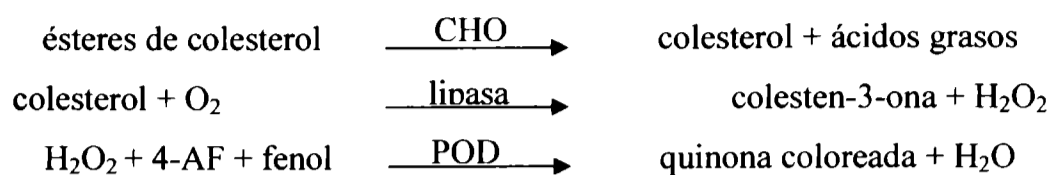


Figure 7.7. Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=150\mu\text{M}$) con el tiempo de irradiación. Los experimentos se desarrollaron en presencia de O₂ (soluciones equilibradas con aire). (○) Fotólisis en D₂O (pD=10,5) y (●) fotólisis en H₂O (pH=10,5). La concentración de MPT se analizó por HPLC.

7.2. Peróxido de hidrógeno.

Para la determinación de H₂O₂ en solución acuosa se utilizó el kit comercial “COLESTAT enzimático” provisto por laboratorios Wiener. Este kit está diseñado para la determinación de colesterol en suero o plasma, pero puede ser utilizado para cuantificar H₂O₂ en soluciones que no posean sustancias que puedan interferir en la determinación. En el esquema 2 se muestran las reacciones que emplea el método para generar un producto coloreado^[16,17], que puede ser detectado fácilmente con un espectrofotómetro.

La última reacción muestra que el compuesto coloreado que se forma presenta una relación mol a mol con el H₂O₂ presente en la solución. Por otro lado cada una de las otras dos reacciones están catalizadas por su correspondiente enzima, y cada una presentan una actividad específica para sus respectivos sustratos, con lo cual es de esperar que otros tipos de sustancias presentes en la solución no generen interferencias.



Esquema 2

donde: CHOD, lipasa y POD representan a las enzimas colesterol oxidasa, lipasa fungal y peroxidasa, respectivamente. 4-AF es 4-aminofenazona.

En éste método, la determinación de H₂O₂ se hace por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 505nm debida a la presencia del producto final (quinona coloreada). Con estos resultados y usando la correspondiente curva de calibración que correlaciona la intensidad de la banda de absorción a 505nm en función de la concentración de H₂O₂ en el medio, se puede cuantificar el H₂O₂ presente en cada muestra a estudiar. Para poder aplicarlo como método cualitativo y cuantitativo en la determinación de H₂O₂ en las soluciones acuosas de pterinas irradiadas, se hicieron los experimentos de control necesarios (ver más adelante), mostrando que verdaderamente no existe ningún tipo de interferencia.

7.2.1. Preparación del reactivo de trabajo.

Para el uso de los reactivos provistos y para la preparación del reactivo de trabajo es importante tener en cuenta ciertos requisitos:

- ✓ El *reactivo de trabajo* se prepara colocando en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de reactivo 4-AF y 5 partes de reactivo *fenol* y llevar a 100 partes con agua destilada. Luego se agregan 2 partes de las *enzimas* previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Pueden prepararse distintas cantidades respetando las proporciones establecidas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de evitar que el reactivo Fenol deteriore las enzimas, provocando una alteración en la calidad del

reactivo de trabajo.

De esta manera, se prepara un *reactivo de trabajo* cuya composición es:

Lipasa.....	≥ 6000 U/l
CHOD.....	≥ 60 U/l
POD.....	≥ 400 U/l
4-AF.....	1.25 mM
fenol.....	2.75 mM
pH.....	7.4 ± 0.1 (a T° amb.)

- ✓ Una vez preparado el reactivo de trabajo, se puede almacenar en frasco de vidrio color caramelo y conservar en refrigerador, presentando una estabilidad de aproximadamente 1 mes a partir del momento de su preparación. Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada por el fabricante. Se debe evitar que los reactivos estén expuestos a temperaturas elevadas durante períodos de tiempo prolongados.

7.2.2. Metodología de trabajo.

Las determinaciones de H₂O₂ generada, en soluciones acuosas de pterinas, en función del tiempo de irradiación se hicieron usando un espectrofotómetro (Cary 3, Varian), micropipetas, pipetas y material volumétrico adecuado y cubetas espectrofotométricas de caras paralelas para medir absorbancia.

La técnica indica que las condiciones de reacción deben ser:

1. Volumen de muestra: 20 µl
2. Volumen de reactivo de trabajo: 2 ml
3. Volumen final de reacción: 2,02 ml
4. Tiempo de reacción: 15 minutos (T=37°C) o 30 minutos (T=25°C)
5. Lectura de absorbancia a 505 nm.

Debido a que las muestras de pterinas irradiadas producen H₂O₂ en muy baja concentración, fue necesario introducir algunas modificaciones en cuanto a la relación de

volúmenes de muestra y reactivo de trabajo, de manera de aumentar la sensibilidad en la determinación de H_2O_2 generada en la fotólisis. Por lo tanto, en algunos casos se agregó 200 μl de muestra irradiada y en otros hasta 1 ml, siendo el volumen final de reacción siempre 2,2 mililitros.

Los valores de absorbancia a 505 nm obtenidos para cada muestra, tanto las muestras irradiadas como las correspondientes a las soluciones de H_2O_2 preparadas para realizar la curva de calibración, fueron corregidos por el valor de absorbancia a la misma longitud de onda del blanco de reacción. Para el caso de las soluciones irradiadas el blanco se preparó mezclando el reactivo colorimétrico de trabajo con la solución de pterina, antes de comenzar la irradiación (en idénticas proporciones a las usadas para la determinación de H_2O_2 en las soluciones irradiadas).

El agregado de volúmenes de muestra mayores a 200 μl puede introducir cambios considerables en el pH de la mezcla de reacción dado que las soluciones irradiadas poseen $\text{pH}=5,5\pm 0,5$ (en medio ácido) y $\text{pH}=10,5\pm 0,5$ (en medio alcalino). Estos valores de pH están dos o tres unidades de pH alejadas del valor del pH del reactivo de trabajo ($7,4 \pm 0,1$ a $T^\circ \text{amb.}$). La importancia de controlar el pH se debe a que la actividad de las mismas tiene una fuerte dependencia con el pH del medio en el cual están presentes. Las enzimas presentan su mayor actividad cuando se trabaja en condiciones de pH óptimo y sufren una fuerte desactivación cuando se trabaja a pH muy alejados del óptimo.

Para verificar que el agregado de grandes volúmenes de solución de pterinas con pH muy diferente al del reactivo de trabajo no produjera alguna alteración en la actividad enzimática, se realizaron los controles necesarios. Para esto se compararon los valores de las determinaciones hechas sobre alícuotas en las condiciones de pH de fotólisis, con los valores hallados sobre muestras irradiadas en las mismas condiciones de pH (ácidas o alcalinas según corresponda) pero que previamente a realizar la mezcla para la reacción colorimétrica, se llevo a pH 7. En todas las condiciones de trabajo se comprobó que no es necesario llevar a pH 7 las soluciones irradiadas dado que los valores observados en ambos casos fueron los mismos. Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado.

7.2.3. Curva de calibración.

Para construir la curva de calibración, se prepararon soluciones acuosas de H_2O_2 de distinta concentración. La determinación de dichas concentraciones se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. Se hicieron los cálculos para preparar soluciones de H_2O_2 a partir del reactivo comercial *Panreac* (110 vol.) de concentración aproximada 10M, luego se tomaron los espectros para obtener los valores de Absorbancia a 254 nm, donde el $\epsilon=17,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A partir del valor de absorbancia a 254 nm medido y usando el ϵ a 254 nm se calcularon las concentraciones usando la ecuación de Lambert-Beer. Para que las medidas espectrofotométricas no introduzcan errores significativos en la determinación de la concentración de H_2O_2 se fijó 0,03 como límite para el valor de absorbancia a 254nm. Este valor corresponde a una solución de H_2O_2 de $1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$
- b. Para preparar soluciones más diluidas, se partió de soluciones de H_2O_2 de valores de absorbancia a 254 nm entre 0,1 y 1, y luego se realizaron distintas diluciones (1/100, 1/1000, etc.) logrando así soluciones de H_2O_2 de distintas concentraciones.

Luego se tomaron muestras de 200 μl y se las hizo reaccionar con 2 ml del reactivo de trabajo. Se las incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la A^{505} (figura 7.8a). Se graficó la absorbancia medida como una función de la concentración de H_2O_2 (M) (figura 7.8b) y se obtuvo una correlación lineal entre ambos parámetros en el intervalo de trabajo (valores de absorbancias hasta 0,7). De la curva de calibración (A^{505} vs. $[\text{H}_2\text{O}_2]$) se obtuvo el valor de la pendiente (F) y se usó F para transformar los valores de A^{505} de las muestras irradiadas en valores de concentración molar de H_2O_2 .

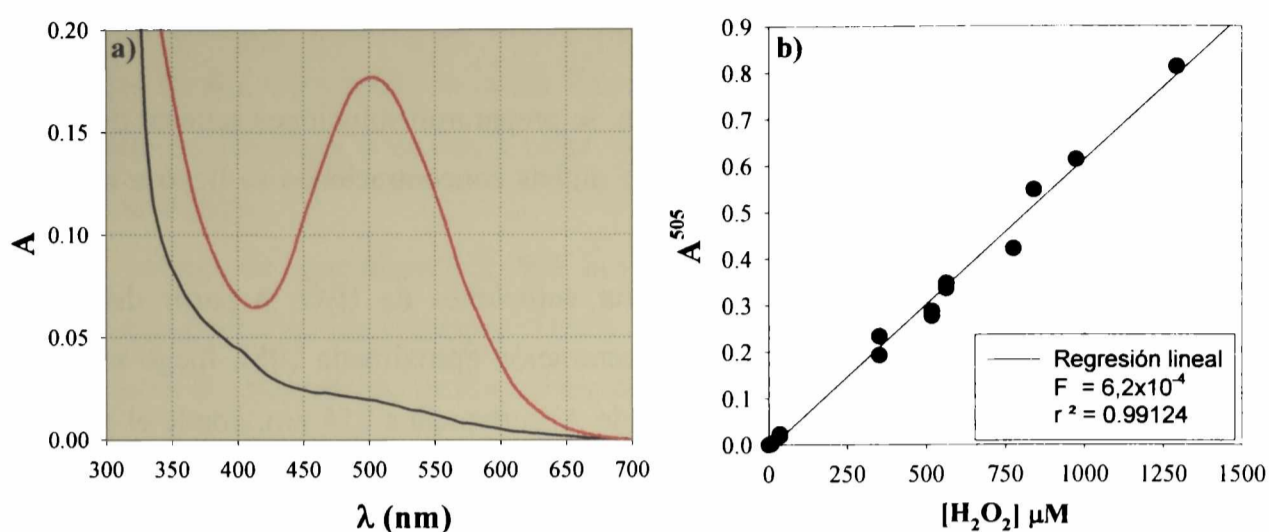


Figura 7.8: a) (—) Espectro de absorción del complejo coloreado correspondiente una solución de $[H_2O_2]=5,7 \times 10^{-4}$ M. (—) Espectro de absorción correspondiente al blanco (reactivo de trabajo). b) Curva de calibración (A^{505} vs. $[H_2O_2]$).

7.3. Radical hidroxilo:

7.3.1. Fotólisis realizadas en presencia de secuestradores de radical hidroxilo.

Cuando se trabaja con secuestradores selectivos de alguna especie intermediara de una reacción química, es factible ver la participación que esa especie tiene en la reacción. Si participa de la misma, al existir en el medio de reacción un secuestrador selectivo en una elevada concentración relativa, el intermediario reaccionará, preferentemente, con el secuestrador y la reacción en estudio se verá inhibida. Por otro lado, si dicha especie reactiva no participa en la reacción, los resultados obtenidos en presencia de secuestradores selectivos deben ser idénticos a los obtenidos en ausencia del mismo.

Para investigar la participación del radical hidroxilo (HO^\cdot) en los mecanismos de fotodegradación de pterinas, se realizaron experimentos de fotólisis en presencia de secuestradores selectivos de esta especie reactiva. En particular, se usaron dos secuestradores selectivos diferentes: 2-propanol y etanol. Estos alcoholes presentan una elevada reactividad con HO^\cdot ^[18].

Se irradiaron soluciones acuosas del compuesto en estudio (MPT, HPT o PT). Las fotólisis se realizaron tanto en medio ácido (pH=5,5) como en medio alcalino (pH=10,5).

Se emplearon diferentes concentraciones relativas de alcoholes y pterinas, donde el alcohol se encontró en exceso, en un orden de 100 a 1000 veces más concentrado que las pterinas (100 a 1 y 1000 a 1). Se registraron los espectros de absorción de las soluciones irradiadas en función del tiempo de irradiación y se calcularon los espectros DE y DEN. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos en ausencia de secuestradores.

A modo de ejemplo se presentan los resultados del estudio realizado con una solución de HPT (350 μM) en presencia de 2-propanol (350 mM), en condiciones de pH 10,5.

En la figura 7.9 se muestran los espectros DEN de la fotólisis en presencia y en ausencia del alcohol 2-propanol. La figura muestra que los espectros DEN son coincidentes en los dos grupos de experimentos. Esto significa que en ambos casos, la naturaleza de los procesos químicos que están ocurriendo, tanto en presencia como en ausencia del secuestrador de HO^\cdot , es el mismo.

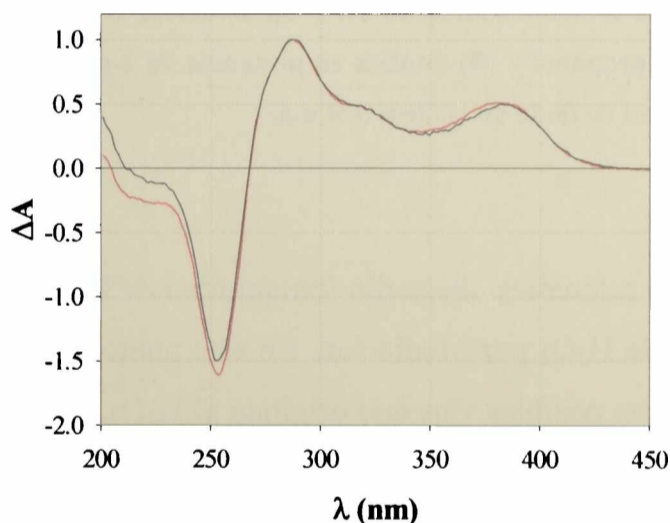


Figura 7.9: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de (HPT) inicial al espectro obtenido después de 7 minutos de irradiación en ausencia de 2-propanol; El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido luego de 7 minutos de irradiación en presencia de 2-propanol.

Por otro lado, las figuras 7.10a y 7.10b muestran la evolución de la absorbancia (λ 254 y 374nm, respectivamente) con el tiempo de irradiación de soluciones en presencia y ausencia de 2-propanol. Claramente se puede ver, que en este ejemplo no se detectaron

diferencias significativas. Esto sugiere que el HO \cdot no participa en el mecanismo de degradación fotoquímica de HPT en medio alcalino (ver capítulo 15).

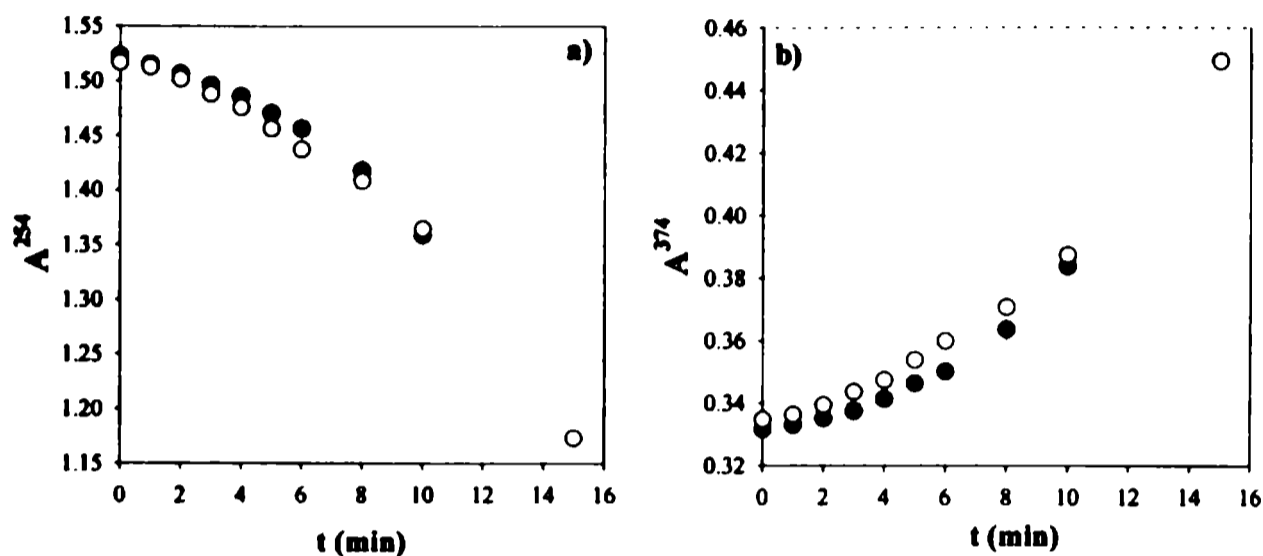
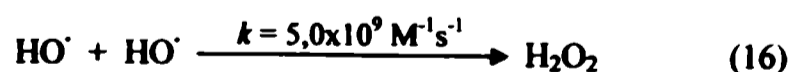


Figura 7.10: Evolución de la absorbancia de HPT en solución, con el tiempo de irradiación. (○) Fotólisis en ausencia de 2-propanol y (●) fotólisis en presencia de 2-propanol. a) Longitud de onda de análisis 254 nm. b) Longitud de onda de análisis 374 nm.

En los capítulos referentes al estudio fotoquímico de los compuestos analizados, se describe la formación de H₂O₂ por irradiación. En este punto es interesante aportar mayor información acerca de las posibles vías que originan el H₂O₂. Es de conocimiento general, que existen numerosas vías de reacción química a partir de las cuales puede generarse esta especie. En particular, la reacción de recombinación entre dos radicales HO \cdot genera H₂O₂^[19,20].



Sobre la base de lo detallado en el párrafo anterior, pueden utilizarse los experimentos de fotólisis en presencia de alcoholes para estudiar si el H₂O₂ generada durante la fotólisis se origina a partir de los radicales HO \cdot . Para esto, se midió la concentración de H₂O₂ generada en función del tiempo de irradiación de soluciones de pterinas en presencia de los alcoholes (2-propanol y/o etanol) y estos resultados se

compararon con la velocidad de formación de H_2O_2 en ausencia de alcoholes. Nuevamente, si la vía de formación de H_2O_2 es independiente de los radicales HO^\cdot , debería observarse la misma velocidad de producción de H_2O_2 tanto en presencia como en ausencia de alcoholes. De lo contrario, si la vía de formación de H_2O_2 es por medio de la reacción (16), entonces la velocidad de formación de H_2O_2 en los experimentos en presencia de alcoholes debería ser mucho menor (o cero) que la observada en las fotólisis en ausencia de alcoholes.

Como ejemplo, en la figura 7.11 se presentan los resultados obtenidos durante la irradiación de una solución de HPT ($350 \mu\text{M}$, $\text{pH}=10,2$) en presencia de 2-propanol (350mM). En este caso, la velocidad de producción de H_2O_2 promedio fue de $11 \pm 2 \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 4 minutos de irradiación. Este valor fue similar, dentro del error experimental, al observado para la fotólisis de HPT en idénticas condiciones, pero en ausencia del secuestrador del radical HO^\cdot (velocidad promedio de $14 \pm 2 \mu\text{M}/\text{min}$). Estos resultados, que se discuten en el capítulo 14, indican que el radical HO^\cdot no participa en el proceso oxidativo de formación de H_2O_2 .

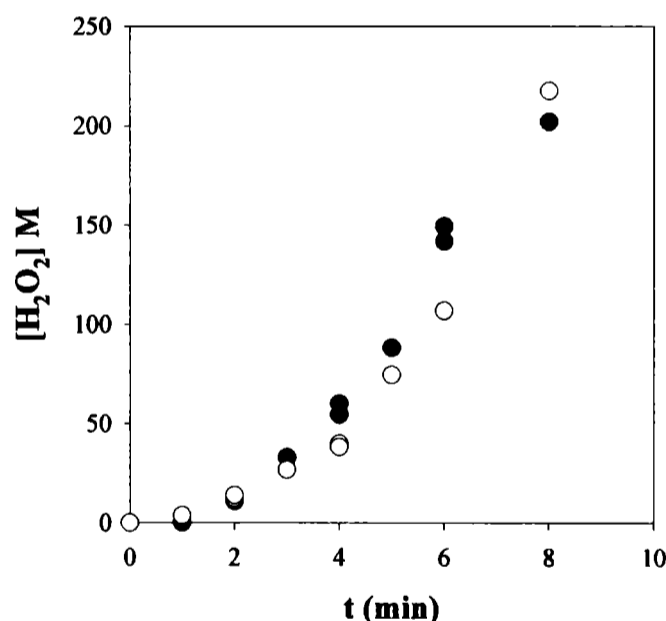


Figura 7.11: a) Concentración de H_2O_2 presente en soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0=350 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) irradiadas a distintos tiempos. (○) Fotólisis en ausencia de 2-propanol y (●) fotólisis en presencia de 2-propanol (350mM).

7.4 Referencias.

- [1] Foote C. S.; *Photochem. Photobiol*, **54**, 659 (1991).
- [2] a) Krasnovsky A. A., Jr.; *Biophysics*, **24**, 769, (1979). b) Kahn A. U.; *Chem. Phys. Lett.*, **72**, 112, (1980).
- [3] C. S. Foote, E. L. Clennan, in 'Active Oxygen in Chemistry', Eds. C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg and J. F. Liebman, Chalmers & Hall, New York, 1995, vol. 2, ch. 4
- [4] Martínez L. A., Martínez C. G., Klopotek B. B., Lang J., Neuner A., Braun A. M., Oliveros E.; *J. Photochem. Photobiol. B*, **57**, 94 (2000).
- [5] Hurst J. R. y Schuster G. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5756, (1983).
- [6] Schmidt W., Galland P., Senger H. y Furuya M.; *Planta*, **182**, 375 (1990).
- [7] Rodgers (1973).
- [8] Salomaa P. Schaleger L. L. y Long F. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1, (1964)
- [9] Aminian-Sagha. T., Nasini G., Caronna T., Braun A. M., Oliveros E.; *Helv. Chim. Acta*, **75**, 531 (1992).
- [10] Braun A. M., Oliveros E.; *Pure Appl. Chem*, **62**, 1467 (1990).
- [11] Oliveros E., Suardi-Murasecco P., Aminian-Sagha T., Braun A. M.; *Helv. Chim. Acta*, **74**, 79 (1991).
- [12] Murasecco-Suardi P., Gassmann E., Braun A. M., Oliveros E.; *Helv. Chim. Acta*, **70**, 1760 (1977).
- [13] Neckers D. C.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **47**, 1.21 (1979).
- [14] Tournaire C., Croux S., Maurette M.-T., Beck I., Hocquaux M., Braun A. M., Oliveros E.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **19**, 205 (1993).
- [15] Braun A. M., Maurette M. T., Oliveros E.; 'Photochemical Technology', translated by D. Ollis and N. Serpone, Wiley, Chichester, 1991, ch. 2 and references cited therein.
- [16] Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S. G., Richmond W., Fu P. C.; *Clin. Chem.*, **20**, 470 (1974).
- [17] Flegg H. M., *Ann. Clin. Biochem.*, **10**, 79 (1973).
- [18] Janata E.; *Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, **114**, 731 (2002).
- [19] García Einschlag F. S. "Fotodegradación de compuestos nitroaromáticos mediante la técnica de UV/H₂O₂" (2001)
- [20] Field R.J., Noyes R. y Postlewhaite D.; *J. Phys. Chem*, **70**, 223 (1976)

FOTÓLISIS ESTACIONARIA

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 el fentosegundo, 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 o estacionaras*. Esta convención será respetada en este trabajo; de esta manera, cuando se mencione, por ejemplo, “la fotólisis continua de 6-hidroximetilpterina (HPT)” se estará haciendo referencia a los experimentos en los cuales HPT es convertido en fotoproductos mediante la irradiación continua de luz.

En este capítulo, se describirán las técnicas y los procedimientos que se emplearon para llevar a cabo el estudio fotoquímico de pterinas en solución acuosa, bajo irradiación continua con luz UV-A de 350nm. La metodología general empleada en cada uno de los experimentos de fotólisis estacionaria puede resumirse en cuatro etapas básicas, que serán analizadas en detalle:

- 8.1 Preparación y control de la solución a irradiar.
- 8.2 Irradiación de la muestra durante distintos períodos de tiempo.
- 8.3 Estudio de las soluciones irradiadas mediante técnicas analíticas.
- 8.4 Análisis de los resultados.

8.1 Preparación y control de las soluciones a irradiar.

Las soluciones se prepararon pesando cantidades adecuadas del compuesto sólido, y luego disolviéndolo en soluciones acuosas de Na(OH) diluidas, para favorecer la disolución (ver sección 5.1.2, capítulo 5). Posteriormente, se ajustó 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 llevó al volumen final mediante el empleo de matraces.

Las soluciones se conservaron en el refrigerador a pH = 11 y se verificó la estabilidad de las mismas, tomando los espectros de absorción antes de cada medida.

Las distintas formas ácido-base de las pterinas difieren entre sí en su comportamiento fotoquímico. Por ende, fue conveniente realizar los experimentos de fotólisis estacionaria en condiciones tales que existiera una sola forma ácido-base del compuesto en estudio. Asumiendo que las pterinas en agua poseen valores de pK_a cercanos a 8 (capítulo 2) puede deducirse que ajustando el pH en un valor mayor a 10, más del 99 % de las moléculas de los derivados pterínicos estarán en su forma alcalina. Por el contrario, fijándolo en un valor menor que 6 más del 99 % estarán en su forma ácida. Por otro lado, el pH no debe ser menor que 4, para evitar la presencia de otras formas ácido-base (ver capítulo 2). En particular, para AF y MAF el pH no debe ser menor a 5,0, para evitar la protonación de los grupos carboxilos.

El pH de las soluciones acuosas se ajustó agregando pequeños volúmenes (microlitros) de soluciones concentradas de HCl o NaOH. Las medidas de pH se realizaron con medidores de pH provistos de un electrodo de vidrio combinado (pH-meter Metrom y pH-meter Schott CG 843P). La calibración de los equipos se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00; 10,00 y 12,00. En este punto, es importante destacar que no se utilizaron soluciones reguladoras para ajustar el pH de las soluciones debido a que, como se comprobará en el capítulo 11, ciertos *buffers* son capaces de desactivar los estados singlete excitados de las pterinas^[1].

La concentración de cada solución así preparada, quedó determinada por las condiciones de la experiencia o de la técnica en la cual sería utilizada. En muchos casos se detectaron reacciones fotoquímicas secundarias; es decir, reacciones fotoquímicas que sufren los fotoproductos que se originan en la fotólisis del reactivo. Debido a esto, cuando fue posible, se trabajó con soluciones con concentraciones lo suficientemente altas como para que el reactivo absorba más del 99% de la radiación. Bajo estas condiciones experimentales; que se denominarán, de ahora en adelante, *condiciones de absorción total de luz*; la solución inicial posee $A > 2$ a la longitud de onda de excitación. Por consiguiente, la luz que reciben los fotoproductos de la reacción es despreciable durante un cierto período de tiempo, evitando así su fotodegradación (fotólisis secundaria). La mayor parte de los experimentos de fotólisis realizados en este trabajo de tesis se llevó a cabo empleando valores de concentraciones comprendidas entre 100 μM y 350 μM .

Algunos experimentos de fotólisis se realizaron con soluciones libres de O_2 . Este tipo de experiencias se realizó para determinar cuál es la participación de este gas en la reacción fotoquímica estudiada. Para eliminar el O_2 se trabajó con celdas de cuarzo de 1 cm x 1 cm que tiene una tapa, de cierre hermético, con un tapón de silicona (figura 8.1). A través del tapón superior, se pincharon dos agujas; actuando, una como vía de entrada y otra como vía de salida. Mediante este dispositivo las soluciones fueron burbujeadas con gases inertes (He o Ar) durante, al menos, 20 minutos. Luego, las aberturas fueron cubiertas con parafilm.

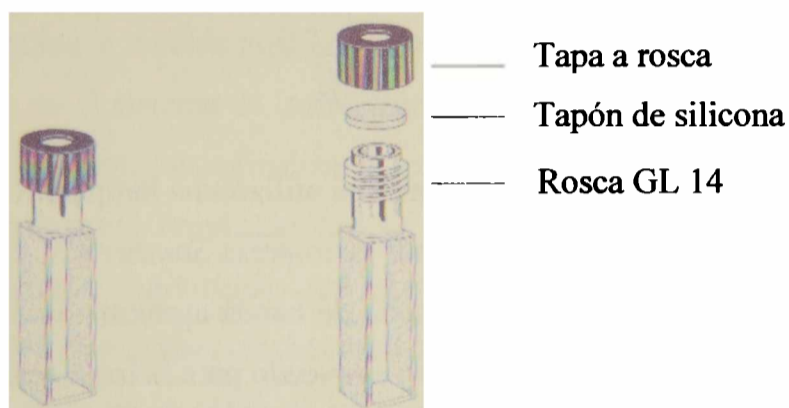


Figura 8.1: Celda empleada en los experimentos de fotólisis continua de pterinas (figura extraída del catálogo de venta de la compañía Hellma).

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, usando un espectrofotómetro Cary 3; y se lo comparó con los espectros correspondientes a soluciones de patrones comerciales. Se controló la posición de los máximos y mínimos de absorción, y que la intensidad de las bandas fuera la correcta considerando la concentración. Como espectros de referencia se tomaron los de las titulaciones espectrofotométricas (ver capítulo 5 y 10).

La mayor parte de los experimentos fue realizada empleando soluciones de partida que contenían un único compuesto. Sin embargo, en algunos experimentos se partió de mezclas pues se quería analizar, por ejemplo, como influía la presencia de uno de ellos en la reacción de fotodegradación 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 si se las mantiene congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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.

8.2 Condiciones de irradiación.

Para la irradiación de las soluciones se utilizó una lámpara *Rayonet Photochemical Reactor Lamp*, RPR 3500 A fabricada por la empresa *Southern N. E. Ultraviolet Co.* Esta lámpara emite luz de 350 nm con un ancho de banda aproximado de 20 nm. En la figura 8.2 se muestra un esquema del dispositivo empleado para la irradiación de las soluciones.

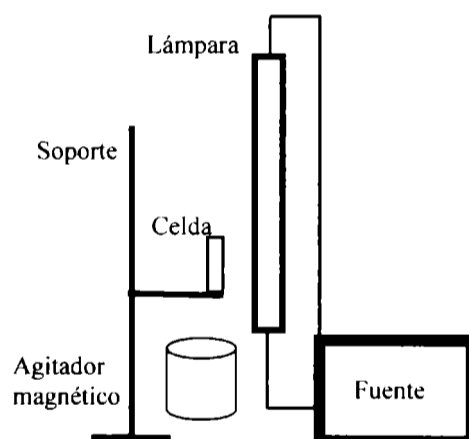


Figura 8.2: Esquema del dispositivo empleado para realizar los experimentos de irradiación continua.

Las soluciones contenidas en las celdas se homogeneizaron usando un agitador magnético. De esta manera se logró una mejor distribución de los reactivos y fotoproductos en el seno de la solución, evitando 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, en la mayoría de los casos, se

mantuvo invariable la posición relativa de la celda respecto de la lámpara, entre distintos experimentos de fotólisis. Esto permitió una comparación directa entre resultados de distintos experimentos.

En cada experimento de fotólisis, se extrajeron muestras a distintos tiempos de irradiación, para su análisis. Con este fin se adoptaron dos procedimientos generales:

- ✓ El primer procedimiento es el que se llevó a cabo cuando la técnica analítica utilizada no modifica la composición de la solución (por ejemplo, espectrofotometría). La solución se introduce en la celda, es irradiada durante un cierto tiempo, se suspende la irradiación y se realiza la medida analítica correspondiente. Posteriormente, se vuelve a introducir la celda en el sistema de irradiación y se irradia nuevamente la solución. Se procede así, sucesivamente hasta finalizar la experiencia.
- ✓ El segundo procedimiento empleado se usó en aquellos casos donde las soluciones irradiadas se analizaron con técnicas que modifica la composición de las mismas (por ejemplo, HPLC, determinación colorimétrica de H_2O_2 , etc.). Para esto, se introduce una alícuota de la solución en la celda de irradiación, sobre la que se deja incidir la luz durante un tiempo y por último, se retira la totalidad de la muestra para su análisis. Posteriormente, se vuelve a cargar la celda con solución madre sin irradiar y se repite la secuencia de pasos descritos anteriormente. Típicamente el volumen de cada muestra estuvo entre 3 y 4 ml que es la capacidad de las celdas usadas.

8.3 Técnicas para el análisis de las soluciones irradiadas.

En el estudio de las reacciones fotoquímicas que surgen las pterinas se emplearon principalmente cinco técnicas para analizar las soluciones irradiadas en forma continua: espectrofotometría, cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), medida electroquímica del O_2 disuelto y determinación colorimétrica de H_2O_2 . Las cuatro primeras técnicas serán descritas detalladamente en este capítulo, mientras que la técnica colorimétrica para la cuantificación de H_2O_2 se expondrá en el capítulo 7, conjuntamente con la descripción de otras técnicas empleadas para determinar la capacidad que tienen las pterinas de generar otras especies reactivas de oxígeno. Este conjunto de técnicas fue utilizado en la identificación y caracterización de productos de

reacción, en la cuantificación de reactivos y productos, necesario para la determinación de parámetros tales como los rendimientos cuánticos de consumo de reactivos y generación de productos, y para obtener información sobre los mecanismos de reacción involucrados.

8.3.1 Espectrofotometría.

Este tipo de análisis se realizó con un espectrofotómetro Cary 3 (Varian) y celdas de cuarzo de camino óptico adecuado para cada caso particular. Se registraron los espectros de absorción de las soluciones irradiadas, a distintos intervalos de tiempos. El análisis directo de estos datos permite decidir, en primer lugar, si existen cambios espectrales producidos por la irradiación o no. Si los espectros presentan cambios, esto indica la presencia de modificaciones químicas en la solución, y por ende, que se ha producido una reacción fotoquímica. Por otro lado, si luego de irradiar la solución, no se observan cambios espectrales, se concluye que el o los solutos presentes en la solución de partida son 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.

A partir de los espectros de las soluciones tomados a distintos tiempos de irradiación, 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.

Por otro lado, se obtuvieron los espectros diferencia experimentales (que serán llamados “espectros DE o EDE”). Para obtener los distintos espectros DE se procedió de la siguiente manera: a cada espectro absoluto obtenido durante una fotólisis ($E(t=t_n)$) se le restó 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 cada fotólisis se graficaron y analizaron. Fundamentalmente en este análisis se tiene en cuenta la presencia y constancia en el tiempo de puntos isobécticos. Está claro que, mientras ocurra un único proceso, se mantendrán constantes los puntos isobécticos.

En las figuras 8.3 y 8.4 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en una fotólisis de HPT en medio alcalino. En la figura 8.3.a se observan los espectros de absorción absolutos tomados cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos. Puede observarse que existen puntos isobécticos que se mantienen sin variaciones durante este período. En la figura 8.3.b, donde se muestran los correspondientes espectros DE, la constancia de los puntos isobécticos se aprecia mejor. De este análisis se puede deducir que en este ejemplo se observa un único proceso fotoquímico durante los primeros 30 minutos. En la figura 8.4 puede observarse que luego de este primer período los puntos isobécticos 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.

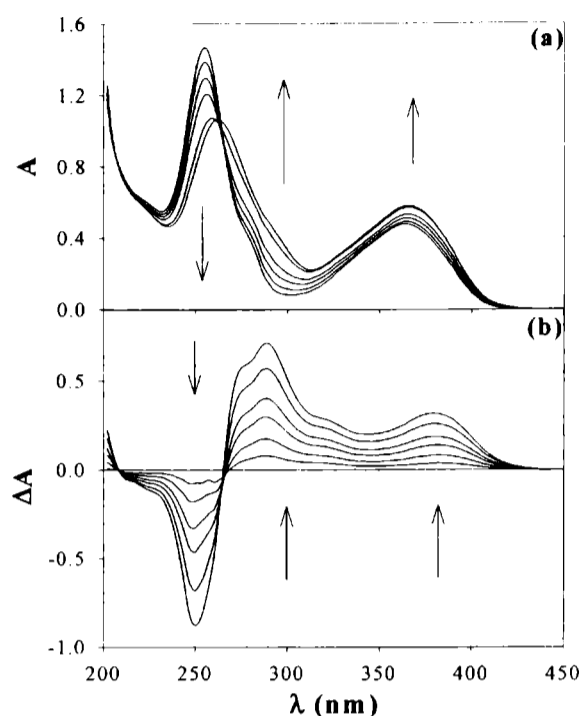


Figura 8.3: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT ($[HPT]_0=150 \mu M$, $pH=10,5$) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 5 minutos y las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros 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 experimentales 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 DE fueron normalizados dividiendo por la absorbancia de uno de sus máximos o mínimos de absorbancia.

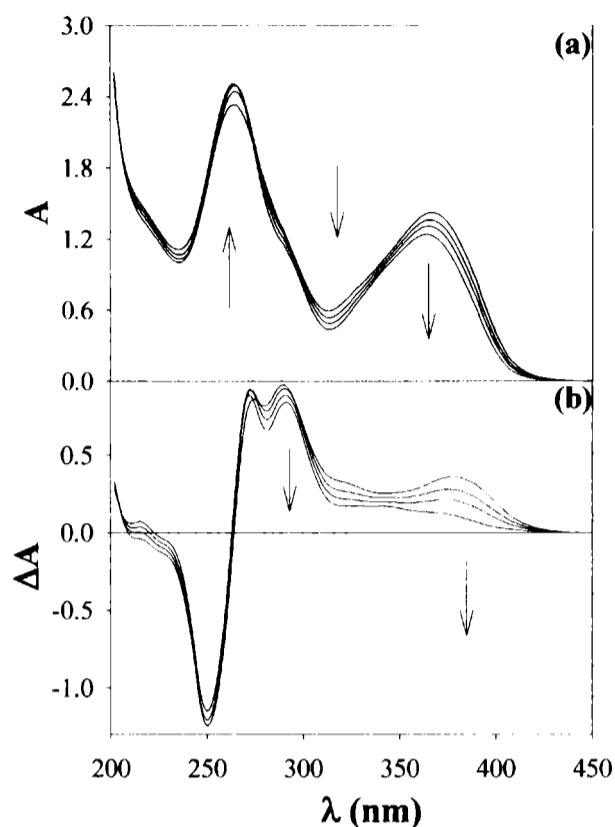


Figura 8.4: Resultados obtenidos en el mismo experimento de la figura 8.3, pero a tiempos de irradiación mayores. a) Espectros de absorción. b) Espectros DE correspondientes.

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 8.5 se muestran los espectros DEN correspondientes a los espectros DE graficados en las figuras 8.3.b y 8.4.b. En la figura 8.5.a se observa que, como era de esperar, los espectros DEN dentro de los primeros 30 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 8.5.a que los espectros correspondientes a 5 y 10 minutos presentan diferencias considerables con respecto a los demás.

En la figura 8.5.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.

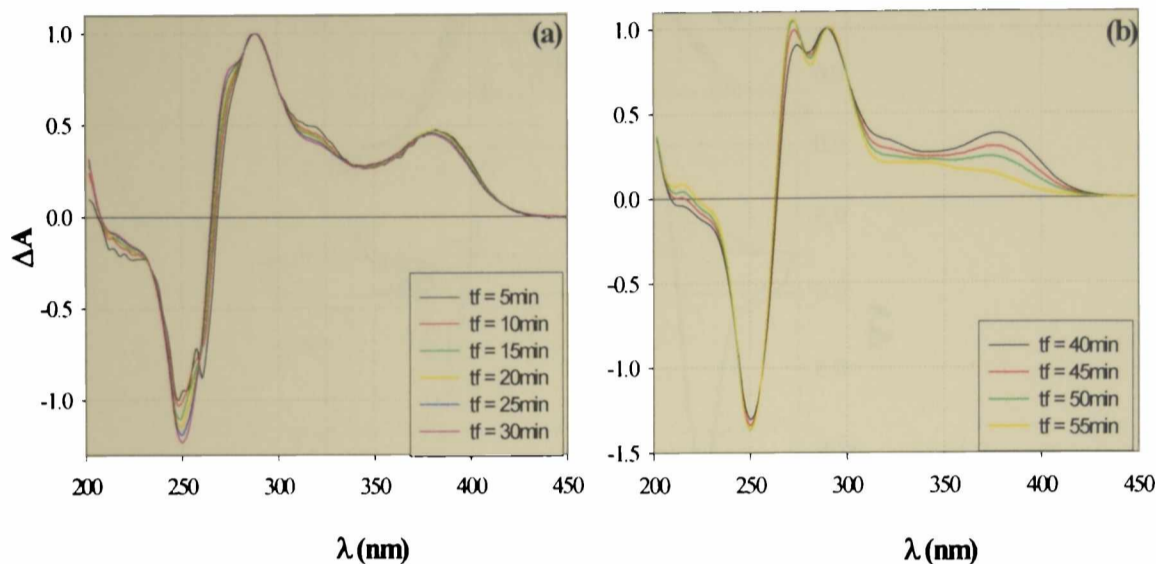


Figura 8.5: a) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 8.3.b. b) Espectros DEN obtenidos a partir de los espectros DE de la figura 8.4.b.

8.3.2. Identificación de productos mediante el 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 del producto 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).

Siguiendo con el experimento de fotólisis de HPT en medio alcalino y si

suponemos que una solución 100 μM de HPT se transforma completamente en FPT, cuando la reacción se complete, el resultado será una solución 100 μM de FPT. 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 HPT se transformara en FPT, 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.

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 algunos 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.

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.

8.3.3. Cromatografía en capa delgada.

La cromatografía en capa delgada de partición (TLC), que es usada habitualmente para separar mezclas de compuestos polares, ha sido descrita como adecuada para la separación de derivados pterínicos^[2,3]. Empleando como base dicha técnica, 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 y 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 más información para la identificación de fotoproductos (*TLC analítica*). En segundo lugar, se empleó una variación de esta técnica para aislar cantidades significativas de los productos de reacción (*TLC 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.

TLC analítica.

Para desarrollar este tipo de experiencias, se utilizaron dos clases de placas cromatográficas diferente a las que de ahora en adelante denominaremos de *Tipo I* y *Tipo II*. Las placas Tipo I, son placas de DEAE-celulosa de 100 μm de espesor, marca *Whatman*. Por otro lado, las placas Tipo II, son placas de celulosa de 250 μm de espesor con marcador fluorescente, marca *Sigma-Aldrich*.

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, la separación de las manchas en el punto de siembra, etc. Como fase móvil se utilizaron soluciones acuosas de NH_4Cl de distinta concentración. 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). En estos experimentos se determinaron 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 ensayo cromatográfico. 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 cada experimento se sembró sobre la misma placa cromatográfica, pero en distintas calles, una alícuota de la solución irradiada (≈ 20 gotas desde tubo capilar de vidrio) junto con soluciones patrón del reactivo y de los posibles productos de reacción. Para el revelado de las placas Tipo I, se aprovechó la fuerte emisión fluorescente que presentan las pterinas al ser irradiadas con luz UV-A (350 nm). De esta manera, cuando se expone una placa, previamente sembrada con algún derivado pterínico, 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 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 último, aquellas sustancias incoloras y no fluorescentes se revelaron usando las placas Tipo II con indicador fluorescente citadas anteriormente. En estas placas, el revelado se hace irradiando con luz de 254 nm; que es donde absorbe el marcador fluorescente que forma parte de la placa; y las manchas se observan oscuras sobre un fondo fluorescente.

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. Cuando se consideró necesario se realizaron corridas utilizando otro tipo de solventes.

TLC preparativa.

Para esta modalidad, se emplearon las placas semi-preparativas Tipo II (placas de celulosa, de 250 μM de espesor, con indicador fluorescente-*Sigma-Aldrich*). La mayor cantidad de fase estacionaria por unidad de área permite aumentar el volumen de muestra sembrada sin perder la capacidad de separación. Como se mencionó anteriormente, 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. 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.

En estos experimentos se irradiaron 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 rota-vapor. Típicamente se evaporó el agua de las soluciones fijando la temperatura entre 20 y 25 °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 sembrar una solución de mayor concentración. 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; esto es, la misma cantidad de sustancias reveladas y con los mismos valores de R_f .

Luego de realizar la correspondiente corrida cromatográfica, cada una de las bandas obtenidas fue recortada de la placa y raspada para recoger el sólido en un tubo de ensayo. 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 μ m), 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.

8.3.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Esta técnica posee una mayor eficiencia separativa comparada con 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, siendo esto de gran utilidad para calcular rendimientos cuánticos.

Para estas medidas se emplearon dos equipos de HPLC diferentes: (I) Equipo 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. (II) Equipo *System Gold chromatographic* de *Beckman Instruments*. Se utilizó una columna de separación *Pinnacle II C18 5 µm* (250 x 46 mm) *Restek*.

De acuerdo a antecedentes encontrados en literatura^[4] 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 8.1 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 230 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.

Nombre	Composición	Flujo (ml/min)	pH
Sistema I	KH ₂ PO ₄ 20mM, EDTA 2,5 mM	1,0	5,5
Sistema II	95% KH ₂ PO ₄ 20mM, EDTA 2,5 mM 5% Acetonitrilo	1,0	5,5
Sistema III	97% KH ₂ PO ₄ 20mM 3% Acetonitrilo	1,0	5,5

Tabla 8.1: 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 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 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 perfectamente conocida. Cada una de las soluciones fue inyectada en el equipo y se obtuvieron los respectivos cromatogramas. Un cromatograma consiste en una gráfica de la señal en función del tiempo de corrida. La señal es un valor dado en unidades arbitrarias (U.A.), que es proporcional a la absorbancia de la solución que pasa por la celda del detector, 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.

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. Puede apreciarse en todas las gráficas una relación lineal entre el área y la concentración. Para cada curva de calibración, correspondiente a cada derivado pterínico patrón, se realizó una regresión lineal de la cual se obtuvo la correspondiente pendiente. Este valor de pendiente fue utilizado 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.

8.3.5. Medida electroquímica de oxígeno.

La concentración del O_2 disuelto en las soluciones irradiadas fue determinado electroquímicamente empleando un electrodo sensible a O_2 (*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 irradiar la solución y cuantificar el O_2 disuelto en la solución 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 manera tal 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 O_2 disuelto 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 O_2 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 O_2 en H_2O . El resultado de este control (figura 8.5) 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 .

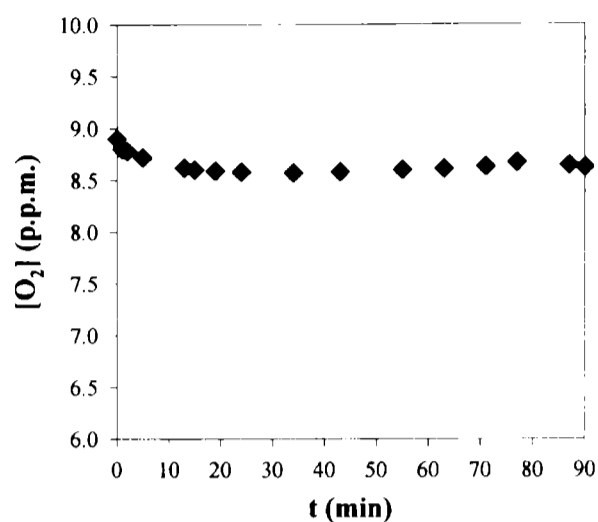


Figura 8.6: Medida de la concentración de O₂ en H₂O bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis y con la misma lámpara.

Las medidas electroquímicas de O₂ 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.

8.4. 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-Beer puede expresarse, con la siguiente ecuación:

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

donde P_A es la intensidad de la luz absorbida por el soluto que se encuentra en la solución con una concentración molar C, P_o es la intensidad de la luz incidente. P_A y P_o se expresan en fotones por unidad de tiempo. ϵ es el coeficiente de absorción 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 P_a . Si V es el volumen de la solución, la relación entre P_A e P_a viene dada por la siguiente ecuación.

$$P_a = P_A / V \quad (2)$$

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.

$$\Phi_R = \frac{-d[R]/dt}{P_a} \quad (3)$$

$$\Phi_P = \frac{d[P]/dt}{P_a} \quad (4)$$

Las velocidades de $d[R]/dt$ y $d[P]/dt$ se calculan a partir de la determinación de las concentraciones de reactivo y productos realizadas con la técnica HPLC (ver sección anterior). El otro parámetro que es necesario determinar es P_a , para lo cual es imprescindible conocer P_o ó P_o^V , la intensidad de luz incidente por unidad de volumen (P_o/V). La metodología empleada para la determinación de este último parámetro se discutirá en la siguiente sección.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos de una determinada reacción se trabajó, cuando fue posible, en condiciones de absorción total de luz. De esta manera, conociendo el ϵ a 350 nm de la sustancia que se va a irradiar, se trabajó en condiciones experimentales tales que $A = \epsilon.l.C \gg 1$ lo que conduce a que, según la ecuación (1), $P_A \cong P_o$. Bajo estas condiciones P_a puede reemplazarse por P_o^V en las ecuaciones (3) y (4).

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, siendo válida la ecuación (1). 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 disminución en la formación de los productos que son fotoestables (o menos fotosensibles que el reactivo).

A modo de ejemplo obsérvese la figura 8.7; en ella se muestra la evolución de la concentración del fotoproducto (FPT) durante un experimento de fotólisis de HPT. 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 $P_a \cong P_o^v$, dentro del error experimental. Es evidente que trabajando con soluciones de partida lo más concentradas posibles, 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. HPT, que posee un grupo $-CH_2OH$ es más soluble que PT y MPT. Por otro lado, otros derivados pterínicos como el AF y la CPT que tienen sustituyentes ionizados son más solubles que el resto de las 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.

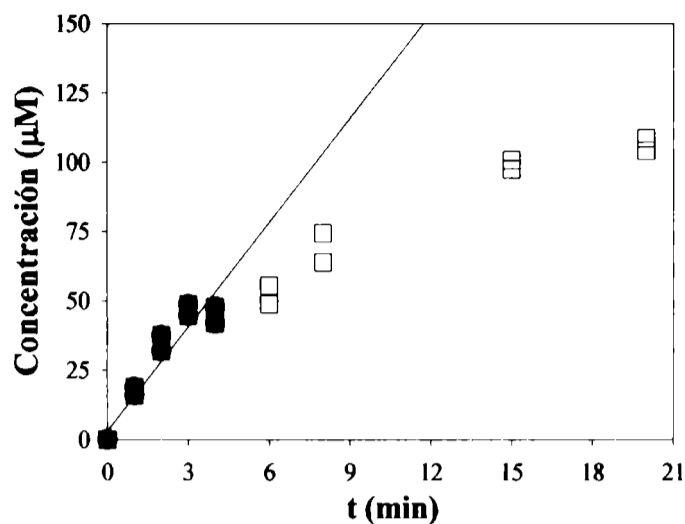


Figura 8.7: Evolución de la concentración de producto (FPT) durante la fotólisis de HPT. (●) primer período en el cual se observa una cinética de orden 0. (□) segundo período, disminución de la pendiente. La línea representa la regresión lineal realizada con los datos de la primera fase.

8.5. Actinometría.

La determinación del parámetro P_0 , puede realizarse mediante el empleo de un actinómetro químico. En este trabajo de tesis, el actinómetro químico utilizado fue una solución de Aberchrome 540^[5]. El intervalo de longitud de onda de aplicación de este actinómetro es de 310 a 370 nm y 436 a 546 nm. Este compuesto es el anhídrido del ácido (E) α -(2,5-dimetil-3-furiletílideno)(isopropilideno)succínico (DFIS), el cual bajo irradiación con luz de la región del espectro comprendida entre 316 – 366 nm adquiere un color rojo intenso debido a la formación del 7,7 a-dihidro-2,4,7,7 a-pentametilbenzo [b] furano (7,7,a-DHBF). La reacción inversa correspondiente a la apertura del anillo es inducida por luz visible (436 a 546 nm). Las estructuras químicas de las dos especies, junto con los correspondientes espectros de absorción, se muestran en la figura 8.8.

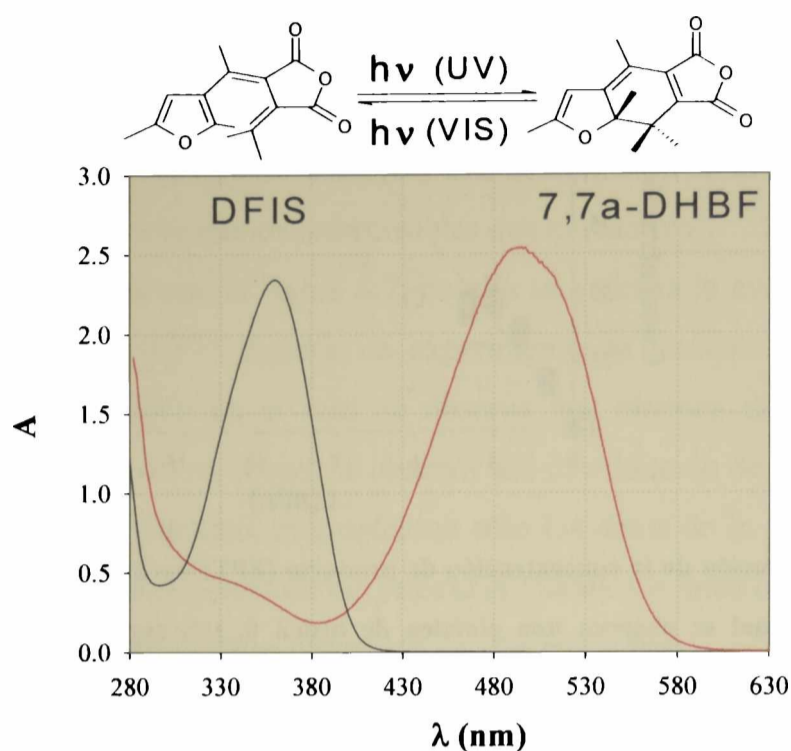


Figura 8.8: Espectro de absorción en la región ultravioleta de la especie DFIS (—) y en el visible de la especie 7,7^a DHBF (—) del Aberchrome 540, en tolueno (10⁻⁴ mol l⁻¹; camino óptico 1 cm)

Este actinómetro puede usarse en diferentes solventes. La longitud de onda del máximo de absorción del DFIS no depende de la naturaleza del solvente usado ($\lambda_{\text{max}} = 343$ nm; $\epsilon_{343} = 60771 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); en cambio la longitud de onda del máximo de absorción de (7,7,a-DHBF) varía considerablemente según cual sea el solvente usado ($\lambda_{\text{max}} = 494$ nm; $\epsilon_{494} = 60771 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en tolueno).

Para realizar la actinometría en el ultravioleta, DFIS es irradiado a distintos tiempos (t) y se mide la absorbancia del 7,7,a-DHBF a la longitud de onda de su máximo (A^{494}). Análogamente, cuando se trabaja en el visible, se irradia 7,7,a-DHBF a distintos tiempos y el análisis se hace también midiendo la disminución de A^{494} . La intensidad de luz absorbida por el actinómetro ($P_{a,\lambda}$) puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$P_a = \frac{d[7,7^a\text{-DHBF}]}{dt} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad (5)$$

donde, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico del actinómetro. Cuando se irradia en el UV, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico de la reacción de conversión de DFIS en 7,7^a-DHBF (Φ_{UV}). Φ_{UV} es

igual a 0,2 independientemente del solvente usado. Cuando se irradia en el visible, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico de la conversión de 7,7^a-DHBF en DFIS (Φ_{Vis}). (Φ_{Vis}) ha sido determinado en tolueno, y varía linealmente en función de la longitud de onda de irradiación entre 436 nm y 546 nm.

La ecuación (5) puede expresarse de la siguiente manera:

$$P_a = (dA^{494} / dt) / (\epsilon_{494} * l * \Phi_{Ac}) \quad (6)$$

donde, $\epsilon_{494} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (en tolueno), y l es el camino óptico de la celda en la cual se mide la absorbancia=1 cm

Para determinar P_o se cargó la celda de fotólisis con el actinómetro y se irradiaó esta solución durante un cierto tiempo (t) y se midió el valor de absorbancia a 494 nm. Se repitió este procedimiento de manera de obtener varios puntos. Se graficó A^{494} vs. t , se ajustaron los puntos por cuadrados mínimos con la ecuación de una recta, de donde se obtuvo dA^{494} / dt . Posteriormente se calculó P_a usando la ecuación (6).

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

Resulta obvio que P_o^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 P_o^v para calcular rendimientos cuánticos la geometría del sistema se mantuvo igual a la del experimento de actinometría.

8.6 Referencias.

- [1] Lorente C., Capparelli A.L., Thomas A.H., Braun A.M. y Oliveros E.; *Photochem.Photobiol.Sci.*, **3**, 167 (2004).
- [2] Scott J. M.; *Methods Enzymol.*, **66**, 437 (1980).
- [3] McCormack J. J. y Newman R. A.; "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. (1985).
- [4] Kang D., Kim S. y Yim J.; *Pteridines*, **9**, 69 (1998).
- [5] Braun A. M., Maurette M. T., Oliveros E., *Photochemical Technology*, J. Wiley & Sons, Chichester, Chapt. 2 and ref. cit. therein (1991).

PARTE III: RESULTADOS.

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

Como ya se mencionó en el capítulo 2, el doble anillo pterínico presenta numerosos grupos dissociables en su estructura. Debido a esto, de acuerdo al pH de la solución, las pterinas presentan distintas formas ácido-base que difieren entre sí en la carga neta de la molécula. En el intervalo de pH comprendido entre 4 y 13, todas las pterinas comparten un único equilibrio ácido-base común, que involucra los mismos grupos funcionales, con un pKa cercano a 8. Dicho equilibrio se muestra en la Figura 9.1, pudiendo observarse que el grupo amida se transforma en fenolato al aumentar el pH. Estas formas ácido-base presentan características fotoquímicas y fotofísicas diferentes, siendo imprescindible conocer cual de ellas está presente en cada una de las condiciones experimentales.

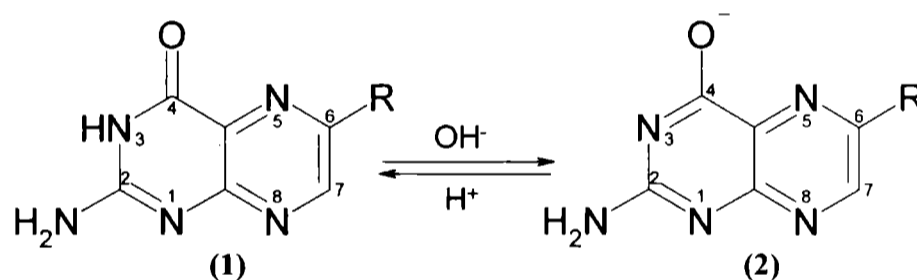


Figura 9.1: Equilibrio ácido-base de las pterinas: (1) forma ácida, (2) forma alcalina.

Considerando estos antecedentes, se decidió estudiar este equilibrio para todos los compuestos a los que se les haría el estudio fotofísico y fotoquímico. Con esta información se fijaron, posteriormente, las condiciones de pH de todos los experimentos, para dejar bien definido qué forma ácido-base se está analizando en cada caso.

En este capítulo se muestran los espectros de absorción de ambas formas ácido-base para cuatro derivados pterínicos: 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT), 6,7-dimetilpterina (DPT) y ácido N-metil fólico (MAF). Como así también se presentan los resultados de las titulaciones realizadas; esto es, los valores de las constantes de disociación ácida (K_a) para los cuatro compuestos estudiados (ver capítulo 5).

9.1 Espectros de absorción y constantes de disociación.

6-hidroximetilpterina (HPT): La Figura 9.2a muestra los espectros correspondientes a las formas ácida y alcalina. La forma ácida tiene una banda de absorción en la región comprendida entre 260 y 290nm, con un máximo (λ_{\max}) en 275nm; y otra banda entre 300 y 400 nm, con el λ_{\max} en 346nm. En la forma alcalina, la posición los máximos de absorción de cada banda es 254 nm y 364 nm (para la banda de absorción de mayor y menor energía, respectivamente). La titulación espectrofotométrica se llevó a cabo según la técnica descrita en el capítulo 5. En la figura 9.2b se muestran los espectros de absorción registrados a distintos valores de pH. A modo de ejemplo, en la figura 9.3 se representa la evolución de la absorbancia a 275 nm, con el pH. A partir de este tipo de curvas, se obtuvo el valor de K_a para cada longitud de onda y luego se calculo el valor promedio de dicha constante. Para este caso, se obtuvo un valor promedio igual a $7,94 \times 10^{-9}$, que representa un valor de pKa de $8,1 \pm 0,1$.

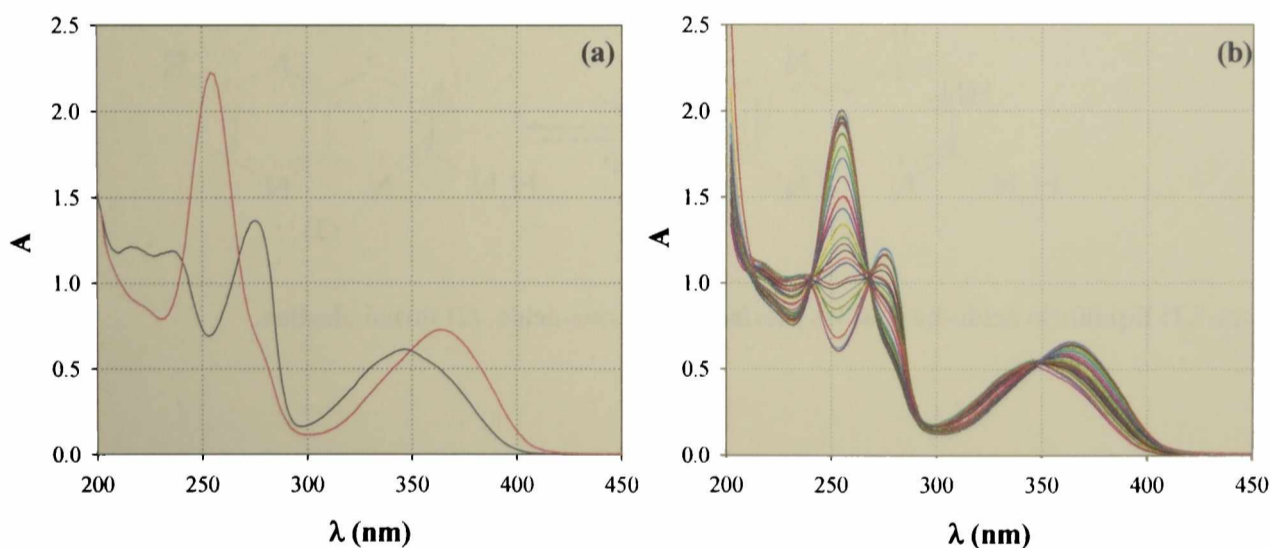


Figura 9.2: a) Espectros de absorción de las formas ácida (—) y alcalina (- -) de HPT. b) Espectros de absorción de HPT en solución acuosa (100 μM), en función del pH. Camino óptico: 1 cm.

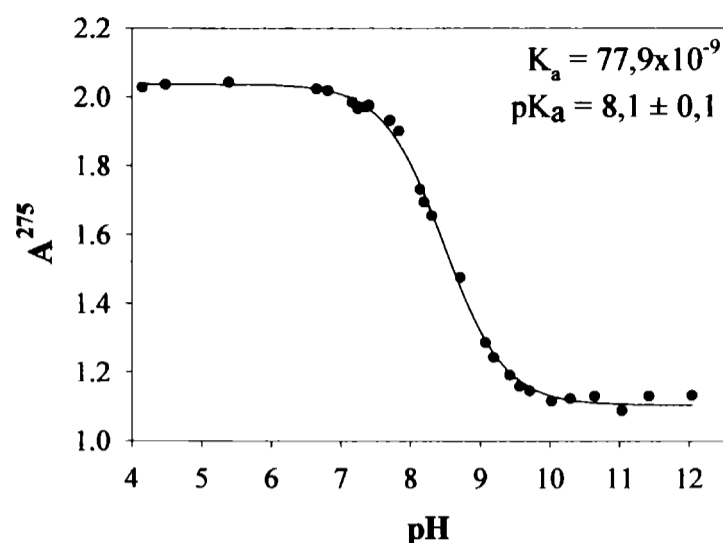


Figura 9.3: Curva de titulación a 275 nm para una solución de HPT (100 μ M). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación teórica (ver ecuación 2, capítulo 5).

6-metilpterina (MPT): El estudio realizado para MPT muestra un comportamiento similar al observado para HPT, con los desplazamientos típicos de las bandas de absorción en función del pH. Ambas formas ácido-base de MPT presentan dos bandas de absorción. La forma ácida tiene una banda de absorción con un λ_{\max} igual a 273nm; y otra banda con un λ_{\max} de 348nm. Por su parte, la forma alcalina tiene una banda con el máximo en 254 nm y la otra en 364 nm (Figura 9.4a). En la figura 9.4b se muestran los espectros de absorción registrados a diferentes valores de pH, en el intervalo comprendido entre 4 y 12. En la figura 9.5 se muestra una curva de titulación espectrofotométrica típica, donde se observa la presencia de un sólo grupo ionizable en el intervalo de pH estudiado. El valor promedio de K_a obtenido para MPT es de $4,68 \times 10^{-9}$; que representa un valor de pK_a igual a $8,3 \pm 0,1$.

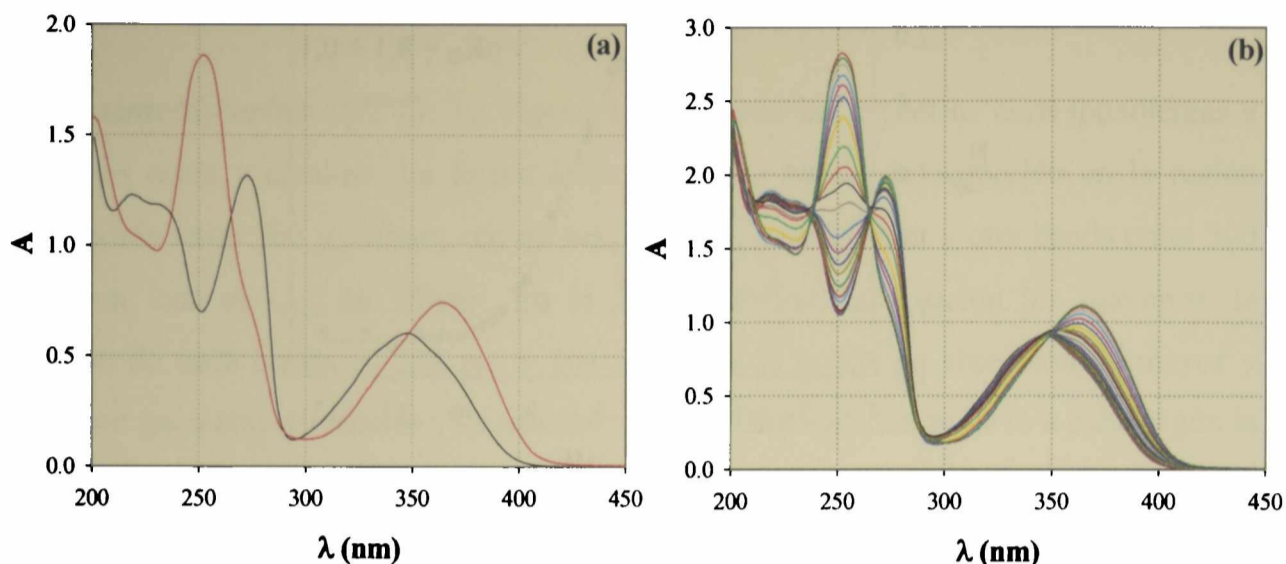


Figura 9.4: a) Espectros de absorción de las formas ácida (—) y alcalina (—) de MPT. b) Espectros de absorción de MPT en solución acuosa (100 μ M), en función del pH. Camino óptico: 1 cm.

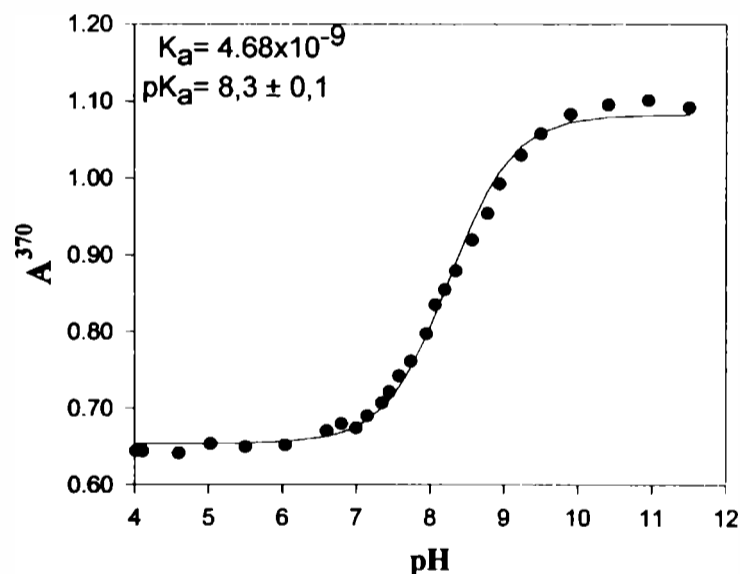


Figura 9.5: Curva de titulación a 370 nm para una solución de MPT (100 μ M). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación teórica (ver ecuación 2, capítulo 5).

6,7-dimetilpterina: En los primeros capítulos, se hizo mención de la baja solubilidad que presentan las pterinas en solventes como H_2O ; principalmente la forma neutra de las mismas. DPT presenta una solubilidad en H_2O extremadamente pequeña; siendo uno de los compuestos menos solubles en comparación con el resto de las pterinas. Debido a esto, para trabajar con soluciones ácidas de DPT, los experimentos se desarrollaron empleando

soluciones muy diluidas (absorbancia a 350 nm menores a 0,12). En consecuencia, el error experimental en la determinación espectrofotométrica de K_a fue significativo.

El comportamiento espectrofotométrico de DPT según el pH fue, cualitativamente, similar al observado para HPT y MPT (Figura 9.6a). La forma ácida tiene una banda de absorción con un λ_{\max} en 273nm y otra banda con un λ_{\max} en 342nm. Para la forma alcalina las posiciones de los λ_{\max} de absorción son de 250 nm y 358 nm, para la banda de absorción de mayor y menor energía, respectivamente. En la figura 9.7 se muestra una curva de titulación espectrofotométrica típica donde también se observa la presencia de un único equilibrio ácido-base en el intervalo de pH analizado (5-12). El valor de K_a obtenido es de $4,0 \times 10^{-9}$; que equivale a un valor de pK_a de $8,6 \pm 0,1$.

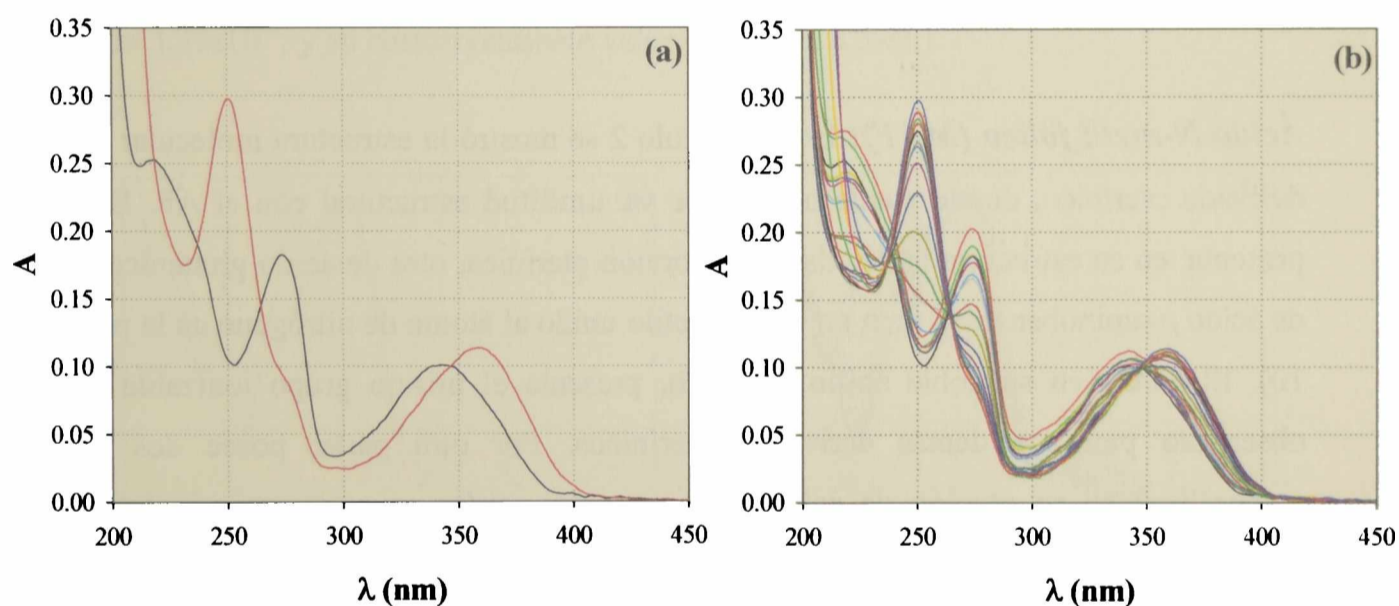


Figura 9.6: a) Espectros de absorción de las formas ácida (—) y alcalina (—) de DPT. b) Espectros de absorción de DPT en solución acuosa (50 μ M), en función del pH. Camino óptico: 1 cm.

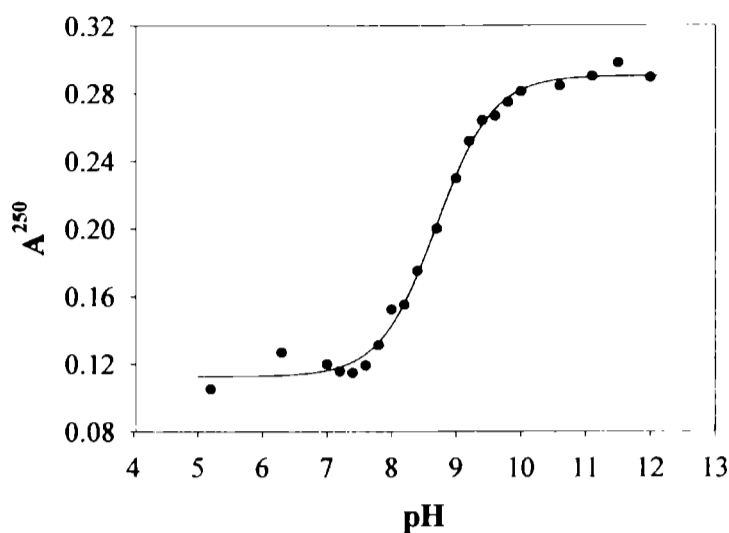


Figura 9.7: Curva de titulación a 250 nm para una solución de DPT (50 μM). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación teórica (ver ecuación 2, capítulo 5).

Ácido *N*-metil fólico (MAF): En el capítulo 2 se mostró la estructura molecular de este derivado pterínico, donde puede observarse su similitud estructural con el AF. El MAF presenta, en su estructura molecular, una porción pterínica, otra de ácido glutámico y otra de ácido *p*-aminobenzoico (con un grupo metilo unido al átomo de nitrógeno en la posición 10). El MAF, en su doble anillo pterínico, presenta el mismo grupo ionizable que el observado para los demás derivados pterínicos. Por otra parte, posee dos grupos carboxílicos en su porción de ácido glutámico; los cuales se encuentran ionizados en soluciones ligeramente ácidas, neutras o alcalinas. En el intervalo de pH comprendido entre 4 y 13; estos grupos carboxilos están siempre disociados, y el único equilibrio ácido-base presente es el correspondiente al anillo pterínico.

Los espectros de las formas ácida y alcalina del MAF se muestran en la Figura 9.8a. Puede apreciarse que el espectro de la forma alcalina presenta tres bandas de absorción. Esta característica puede explicarse teniendo en cuenta el grupo bencénico que forma parte del sustituyente que presenta esta pterina. En efecto, las bandas con el máximo en 255 nm y en 367 nm son asignadas al anillo pterínico, mientras que la banda con máximo en 303 nm puede ser asignada al residuo de ácido *N*-metil-*p*-aminobenzoico. En la forma ácida también se observan tres bandas de absorción. Haciendo un análisis similar al realizado para la forma alcalina, puede verse que la banda de 303 nm no se altera, en cambio las otras las bandas de 255 nm y la de 367 nm sufren un corrimiento similar al observado en

las pterinas descritas anteriormente, al pasar de la forma ácida a la forma alcalina. De esta manera, para la forma ácida, los máximos de absorción de las bandas que corresponden al anillo pterínico son 284 nm y 352 nm. Mirando los coeficientes de absorción de las bandas podemos ver que los únicos que cambian, sufriendo una pérdida de intensidad al pasar de la forma alcalina a la forma ácida, son los correspondientes a las dos bandas del anillo pterínico (un comportamiento similar es el observado para otras pterinas)^[1]. En cambio, los coeficientes de absorción de la banda de 303 nm permanecen invariantes en el intervalo de pH estudiado.

En la figura 9.8b se muestran los espectros de absorción del MAF registrados en el intervalo de pH en el que se realizó la titulación espectrofotométrica (entre 4 y 13); mientras que en la figura 9.9 se representa, a modo de ejemplo, la variación de la absorbancia a 365 nm con el pH de la solución. Estos resultados arrojan un valor promedio de K_a de $3,39 \times 10^{-9}$; y su correspondiente valor de pK_a de $8,5 \pm 0,1$.

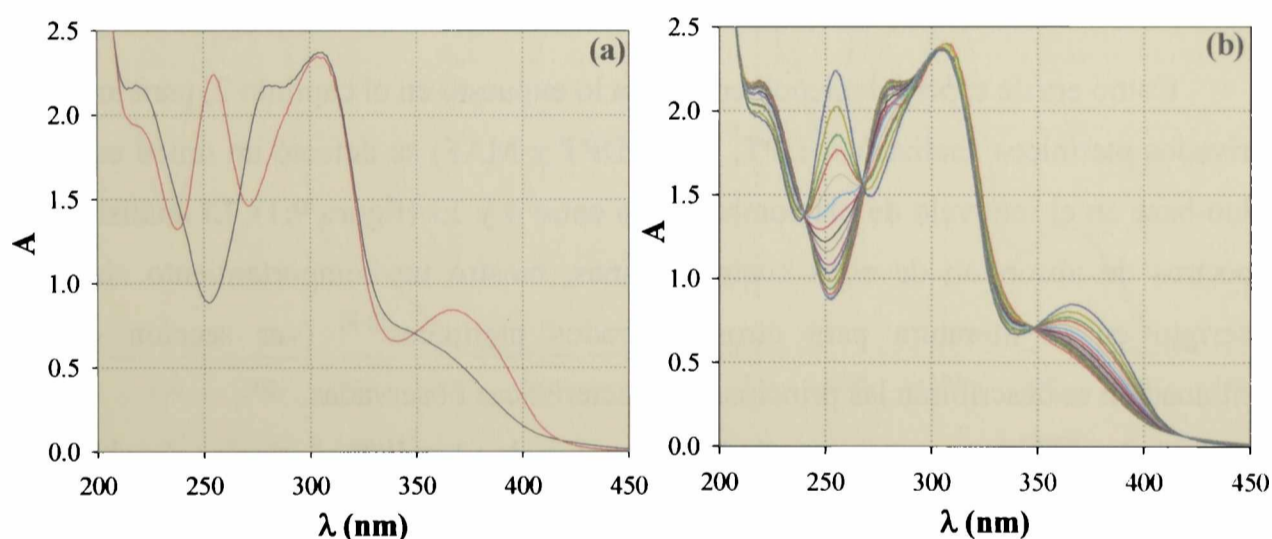


Figura 9.8: a) Espectros de absorción de las formas ácida (—) y alcalina (---) de MAF. b) Espectros de absorción de MAF en solución acuosa (100 μM), en función del pH. Camino óptico: 1 cm.

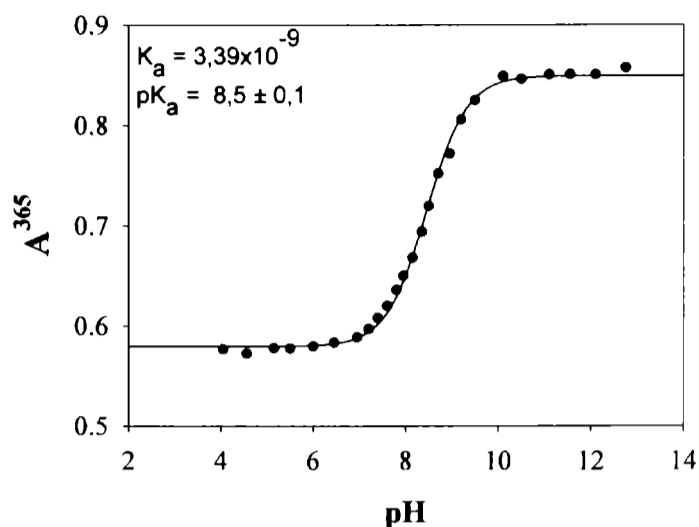


Figura 9.9: Curva de titulación a 365 nm para una solución de MAF (100 μ M). La línea representa la regresión no lineal realizada con la ecuación teórica (ver ecuación 2, capítulo 5).

9.2. Conclusiones.

Como era de esperar teniendo en cuenta lo expuesto en el capítulo 2, para los cuatro derivados pterínicos analizados (HPT, MPT, DPT y MAF) se detectó un único equilibrio ácido-base en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 13 (figura 9.1). El análisis de los espectros de absorción de estas cuatro pterinas, mostró un comportamiento similar al descrito en la literatura para otros derivados pterínicos^[2-8] (ver sección 4.1). A continuación se describirán las principales características observadas.

Todos los compuestos estudiados presentan dos bandas principales de absorción, una banda ubicada en el intervalo de longitudes de onda 220 a 290 nm (banda de mayor energía) con coeficientes de absorción molar relativamente altos, comprendidos entre 1×10^4 y $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y la otra, ubicada en la región comprendida entre 300-400 nm (banda de menor energía), con coeficientes de absorción molar menores comprendidos entre 5×10^3 y $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Además, se observa el corrimiento característico de la banda de mayor energía a menores longitudes de onda al pasar de la forma ácida a la alcalina; y el efecto contrario, corrimiento hacia longitudes de onda mayores, de la banda de menor energía. Como era de esperar, las formas alcalinas presentan mayores coeficientes de absorción molar en ambas bandas respecto de las respectivas formas ácidas.

El análisis de los espectros de absorción del MAF revela cierta similitud con el comportamiento descrito en literatura para el AF^[2-8]. Este comportamiento era de esperar teniendo en cuenta que, en ambos compuestos, la naturaleza química de los sustituyentes es similar. En ambos compuestos, el ácido *p*-aminobenzoico forma parte de la estructura del sustituyente. El anillo bencénico propio del *p*-aminobenzoico, es el responsable de la banda de absorción adicional que se observa en estas pterinas. En la figura 9.10 se muestran los espectros de absorción de ambas formas ácido-base del MAF y AF. Puede observarse que la banda de absorción correspondiente al anillo bencénico del sustituyente del MAF (303 nm) está desplazada 18 nm respecto de la correspondiente banda en el AF (285 nm). Este fenómeno puede explicarse teniendo en cuenta la presencia del grupo $-\text{CH}_3$ unido al átomo de nitrógeno de la posición 10 del MAF (ver figura 2.4b, capítulo 2).

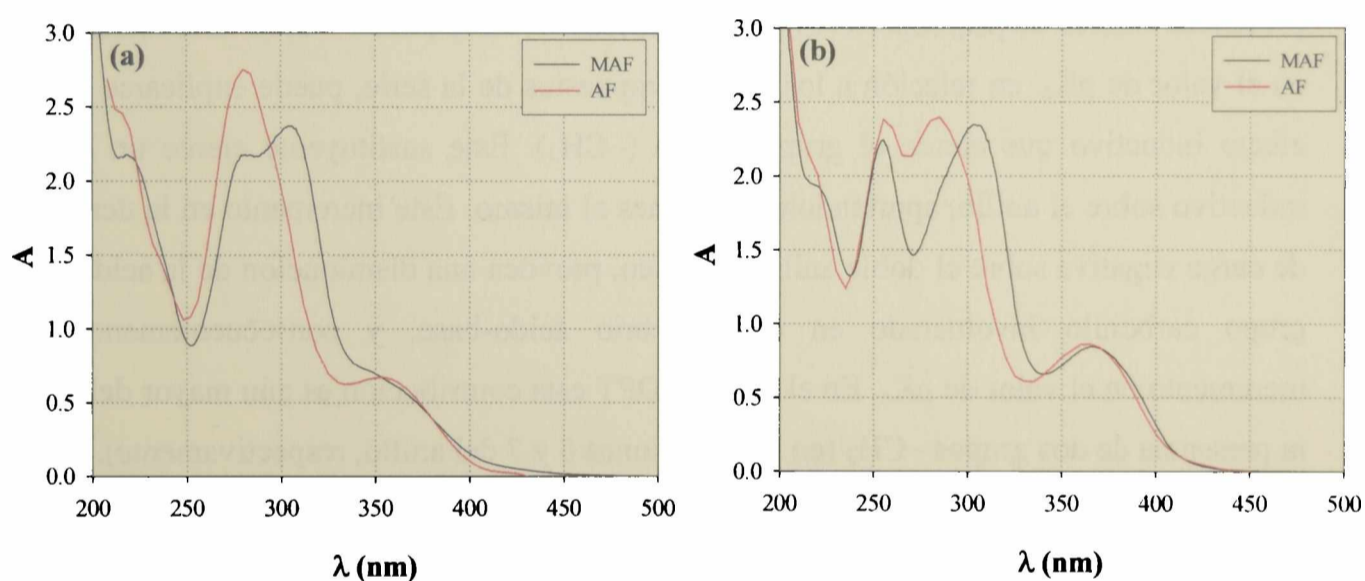


Figura 9.10: a) Espectros de absorción de la forma ácida del AF y MAF. b) Espectros de absorción de la forma alcalina del AF y MAF. Solución acuosa de AF y MAF (100 μM). Camino óptico: 1 cm.

Por otra parte, se determinó el valor de la constante de disociación ácida (K_a) para HPT, MPT, DPT y MAF (Tabla 9.1). Para ninguno de estos compuestos se encontraron antecedentes en literatura; sin embargo, los resultados obtenidos se encuentran dentro del intervalo esperado para las pterinas (ver tabla 2.2, capítulo 2).

Compuesto	pK _a (±0,1)
HPT	8,1
MPT	8,3
DPT	8,6
MAF	8,5

Tabla 9.1: pK_a del equilibrio amida-fenolato en las pterinas.

Comparando estos valores de pK_a con el correspondiente al doble anillo pterínico sin sustituyentes (pK_a^{PT}=7,9±0,1), puede apreciarse que HPT tiene un valor similar (pK_a=8,1±0,1), considerando los errores experimentales. Por otra parte, MPT y DPT presentan valores de pK_a superiores al de PT (pK_a^{MPT}=8,3 y pK_a^{DPT}=8,6). Este incremento en el valor de pK_a, en relación a los otros compuestos de la serie, puede explicarse por el efecto inductivo que ejerce el grupo metilo (-CH₃). Este sustituyente ejerce un efecto inductivo sobre el anillo, aportándole electrones al mismo. Este incremento en la densidad de carga negativa sobre el doble anillo pterínico, provoca una disminución de la acidez del grupo carbonilo involucrado en el equilibrio ácido-base, y consecuentemente, un incremento en el valor de pK_a. En el caso de DPT esta contribución es aún mayor debido a la presencia de dos grupos -CH₃ (en las posiciones 6 y 7 del anillo, respectivamente).

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, ambas formas ácido-base (figura 9.1) presentan características fotoquímicas y fotofísicas diferentes. Esto hace imprescindible que, para simplificar el análisis de la información obtenida en los experimentos de fotoquímica y fotofísica, sea conveniente realizar los mismos en condiciones tales que, en solución, exista solamente una de las dos formas ácido-base de la sustancia en estudio. Del análisis de los valores de pK_a 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 el pH de la solución es menor que 5,5 más del 98% de las mismas estarán en su forma ácida. El límite inferior de pH al cual se puede trabajar sin la presencia significativa de otras formas ácido-base, puede decirse que es por encima de 4.

9.3. Referencias.

- [1] Thiéry-Cailly C., "C. R. Acad. Sc. Paris", Serie C, 250, (1968).
- [2] Albert A.; *Biochem. J.*, **54**, 646 (1953).
- [3] Thomas A. H., Feliz M. R. y Capparelli A. L.; *Transition Metal Chemistry*, **21**, 317-321 (1996).
- [4] Monópoli V. D., Thomas A. H. y Capparelli A. L.; *International Journal of Chemical Kinetics*, **32**, 231-237 (2000).
- [5] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **135**, 147-154 (2000).
- [6] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" Tesis Doctoral (2001).
- [7] Lorente C.; "Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa" Tesis Doctoral (2003).
- [8] Lorente C., Capparelli A. L., Thomas A. H., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 167 (2004).

ANÁLISIS ESPECTROFLUOROMETRICO

Tal como fue expuesto en el capítulo 4, la fluorescencia de algunos derivados pterínicos ha sido estudiada^[1-5]. La emisión de estos compuestos es diferente para las dos formas ácido-base y además parece ser fuertemente dependiente de la naturaleza química del sustituyente. En efecto, si bien la mayoría de los compuestos analizados presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia relativamente altos, el ácido fólico posee una emisión extremadamente baja.

En este capítulo se exponen los resultados del análisis espectrofluorométrico de cuatro derivados pterínicos, que no fueron estudiados anteriormente. Dos de ellos (HPT y MPT) poseen, al igual que otros compuestos previamente estudiados^[1-3], sustituyentes en la posición 6 que contienen un único átomo de carbono. DPT posee un grupo metilo adicional ubicado en la posición 7 del doble anillo pterínico. MAF, por su parte, es un derivado que presenta una gran similitud estructural con el AF y fue elegido para evaluar si el comportamiento fotofísico observado para este compuesto^[3] es un comportamiento general de los derivados pterínicos con el mismo tipo de sustituyentes.

10.1 Espectros de emisión.

Se registraron los espectros de emisión de HPT, MPT, DPT y MAF en solución acuosa ($\lambda_{EX}=350$ nm). En la figura 10.1 se muestran los espectros de emisión normalizados de los cuatro compuestos mencionados, en sus formas ácida (pH=5,5) y alcalina (pH=10,5). En todos los casos puede apreciarse una banda con un máximo de emisión alrededor de los 450 nm. Puede observarse un claro corrimiento batocrómico de las bandas de emisión de las formas alcalinas respecto de las correspondientes a las formas ácidas. En la tabla 10.1 se listan los valores de λ_{EM} máximo para cada caso.

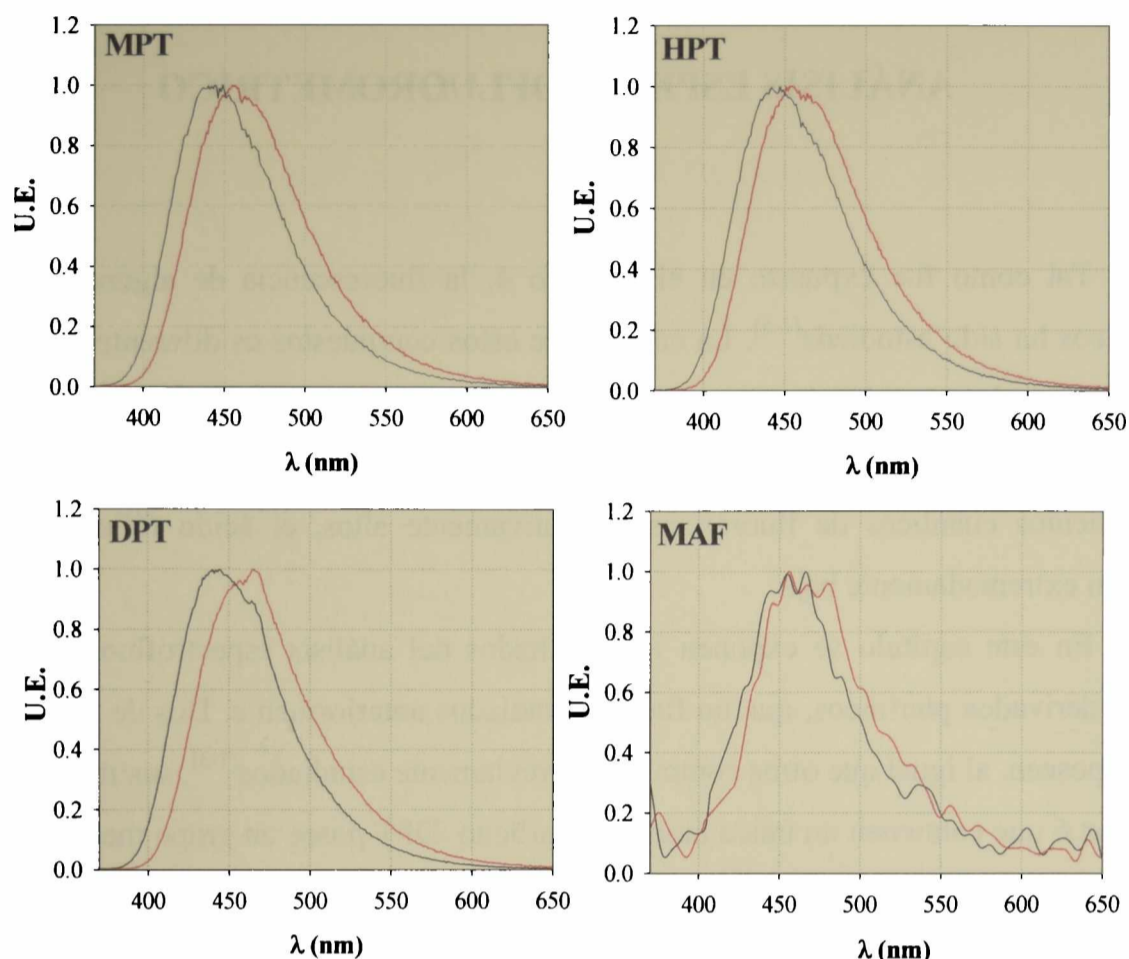


Figura 10.1: Espectros de emisión normalizados de pterinas en solución ($\lambda_{EX}=350$ nm): (—) forma ácida (pH=5,5) y (—) forma alcalina (pH=10,5).

Compuesto	pH=5,5	pH=10,5
HPT	449	457
MPT	448	460
DPT	433	445
MAF	437	447

Tabla 10.1: Máximos de los espectros de emisión en nm (error ± 4 nm).

Los espectros de absorción de las pterinas presentan típicamente dos bandas de absorción (ver capítulos 4 y 9). HPT, MPT y DPT presentan este comportamiento general. Esta característica indica que estos compuestos son capaces de acceder a más de un estado electrónicamente excitado cuando absorben luz en la región comprendida entre 200 y 500 nm. Una de las posibles vías de desactivación de estos estados excitados es a través de la emisión de luz por fluorescencia. Para investigar y obtener mayor información sobre este

punto se obtuvieron los espectros de emisión excitando a distintas longitudes de onda (λ_{EX}) (figura 10.2); en particular, se fijaron los valores de λ_{EX} en base a la posición de los máximos en el espectro de absorción de cada compuesto. En la figura 10.2 puede apreciarse que, para HPT, MPT y DPT, los espectros de emisión normalizados son similares para todas las λ_{EX} estudiadas. Estos resultados sugieren, para estos tres compuestos, la presencia de un único estado excitado emisor; el cual es independientemente de λ_{EX} . Es decir, que todos los estados electrónicamente excitados superiores que son poblados electrónicamente, decaen por vías no radiativas a un único estado excitado de menor energía, desde el cual ocurre la emisión fluorescente.

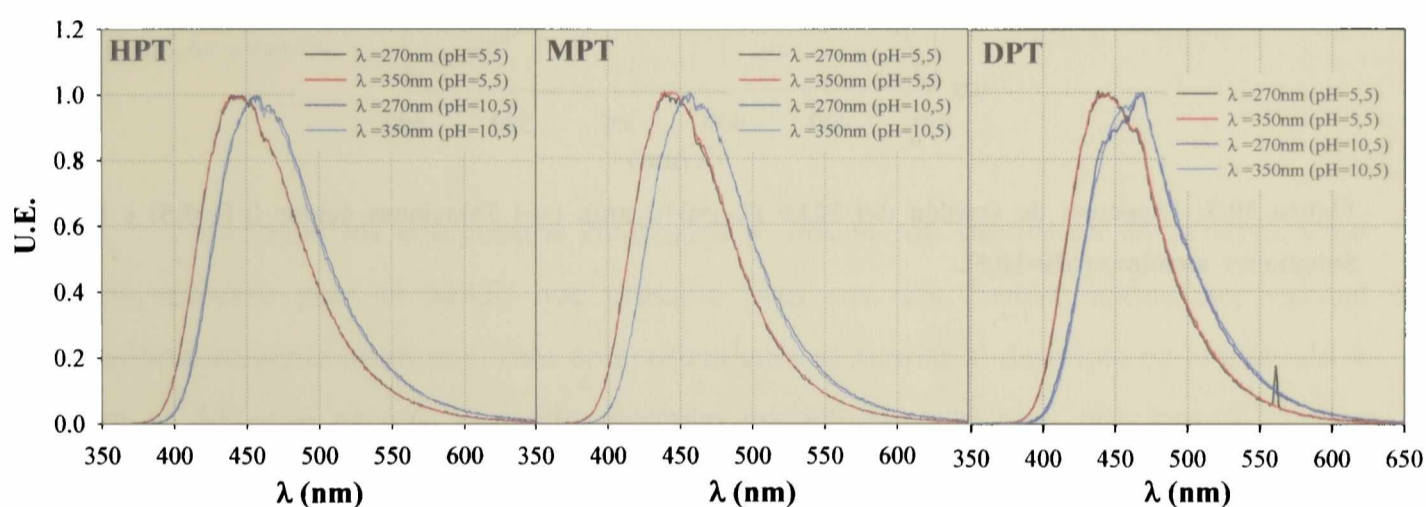


Figura 10.2: Espectros de emisión de pterinas en soluciones ácidas (pH=5,5) y alcalinas (pH=10,5) por excitación con luz de diferentes longitudes de onda.

El estudio de la dependencia de los espectros de emisión del MAF con la longitud de onda de excitación, arroja resultados diferentes a los descritos anteriormente para HPT, MPT y DPT. En la figura 10.3 puede apreciarse que cuando este compuesto se excita con λ_{EX} menores a 320 nm aparecen dos bandas de emisión: una banda ubicada en la zona comprendida entre 350 y 400 nm; y la otra entre 400 y 500 nm. Estos resultados sugieren la existencia de dos estados electrónicamente excitados emisores. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta los espectros de absorción del MAF (capítulo 9) y el comportamiento fotofísico del resto de las pterinas estudiadas. Cuando se irradia con λ_{EX} menores a 330 nm, tanto la banda correspondiente al sustituyente como las bandas

correspondientes al doble anillo de pterina absorben luz y, por ende, ambos fluoróforos se excitan. Puede suponerse, por consiguiente, que la banda de emisión con el máximo alrededor de 450 nm corresponde al anillo pterínico y que la otra banda de emisión ubicada alrededor de 365nm corresponde a la emisión del ácido *p*-aminobenzoilglutámico.

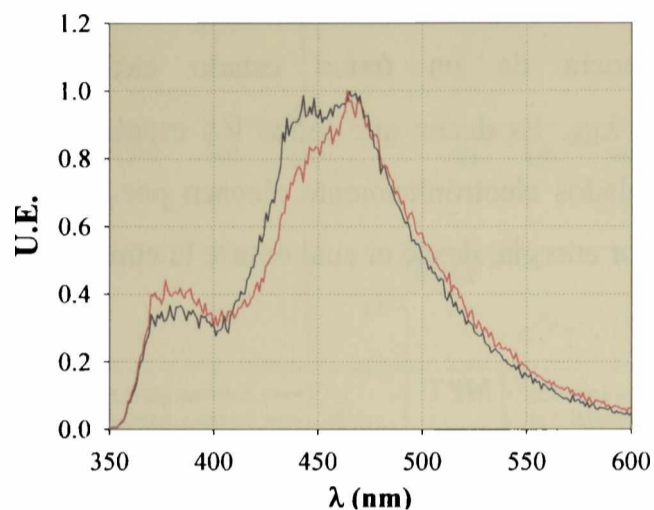


Figura 10.3: Espectros de emisión del MAF ($\lambda_{EX}=310$ nm). (—) Soluciones ácidas (pH=5,5) y (—) Soluciones alcalinas (pH=10,5).

10.2 Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de emisión fluorescente (Φ_F) de HPT, MPT, DPT y MAF excitando a 350 nm. Para las formas ácidas se trabajó en el intervalo de pH comprendido entre 4,9–5,5 y para las formas alcalinas, entre 10,0–10,5. Se analizaron soluciones en tres atmósferas diferentes: saturadas con Ar, equilibradas con aire y saturadas con O_2 . Los resultados se listan en la tabla 10.2.

Compuesto	Forma ácido-base	Φ_F (Ar)	Φ_F (aire)	Φ_F (O ₂)
HPT	ácida	0,53±0,02	0,53±0,04	0,50±0,01
	alcalina	0,46±0,01	0,46±0,04	0,45±0,01
MPT	ácida	0,64±0,02	0,62±0,04	0,61±0,01
	alcalina	0,61±0,04	0,61±0,04	0,61±0,02
DPT	ácida	0,85±0,01	0,79±0,01	0,77±0,01
	alcalina	0,84±0,02	0,76±0,02	0,73±0,01
MAF	ácida	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	alcalina	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabla 10.2: Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de cada una de las forma ácido-base de HPT, MPT, DPT y MAF. Todas las determinaciones se realizaron en tres tipos de atmósferas: saturada con aire, con Ar y con O₂.

Para todos los compuestos analizados se obtuvieron valores de Φ_F relativamente altos, excepto para el MAF, que presenta para sus dos formas ácido-base, valores significativamente inferiores. Este comportamiento es similar al descrito en el capítulo 4 para el AF, que es otro derivado pterínico estructuralmente muy relacionado^[1-3]. Por consiguiente, puede suponerse que el tipo de sustituyente presente en estos compuestos le confiere a los estados singletes excitados de la molécula, vías de desactivación no radiativas muy eficientes. Las numerosas posibilidades de torsión y rotación que tienen estos sustituyentes, podrían convertirlos en “*quencher*s internos” aportando a las moléculas un mayor número de niveles energéticos vibrorrotacionales adicionales.

Por otro lado, los Φ_F de los restantes compuestos estudiados, también presentan diferencias significativas entre sí. Se observan valores que van desde 0,46 hasta 0,85. Es importante mencionar también que los Φ_F de las formas ácidas son ligeramente mayores que los correspondientes a las formas alcalinas. En consecuencia, del análisis de los valores presentados en la tabla 10.2, puede apreciarse que la emisión fluorescente de las pterinas es afectada por el pH y por la naturaleza química del sustituyente presente en la posición 6 del anillo pterínico.

Para HPT, MPT y MAF no se observan diferencias significativas entre los valores de Φ_F obtenidos en los tres tipos de atmósferas. Los resultados se muestran en la tabla 10.2.

Este análisis indica que los estados singletes excitados de estos tres derivados pterínicos no son desactivados significativamente por el O₂. Este comportamiento es similar al descrito en el capítulo 4 para otras pterinas.

DPT presenta un comportamiento diferente respecto de los demás derivados. Para este compuesto se observó que los espectros de emisión de ambas formas ácido-base disminuyen progresivamente en intensidad (I_F) al aumentar la concentración de O₂ disuelto en el medio, permaneciendo invariante la posición de los máximos de emisión (figura 10.4).

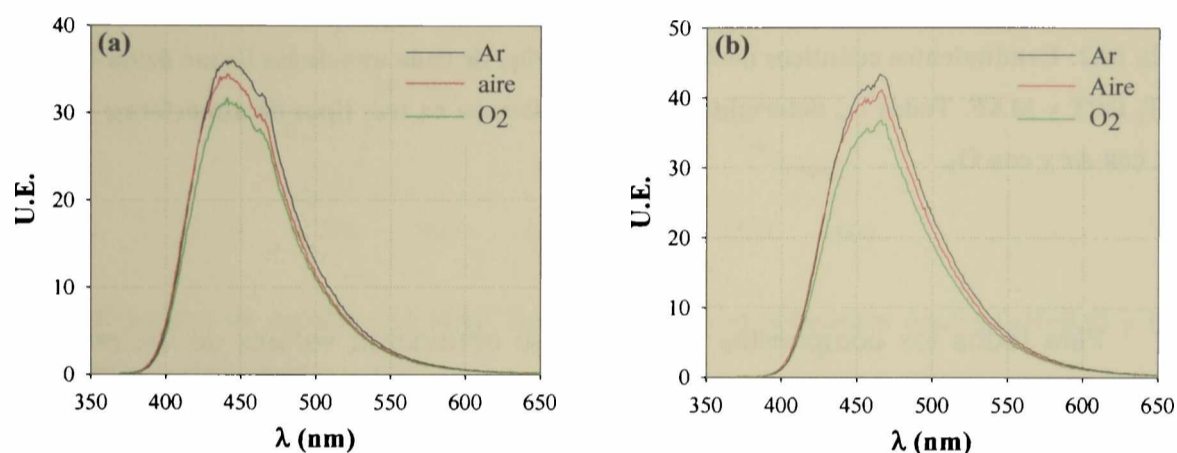


Figura 10.4: Evolución de los espectros de emisión de DPT con la concentración de O₂. a) Forma ácida (pH=5,5). b) Forma alcalina (pH=10,5).

El análisis de la dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F) con la concentración de O₂ presenta un comportamiento lineal de Stern-Volmer. En la Figura 10.15, se muestran las correspondientes gráficas de Stern-Volmer obtenidas tanto para la forma ácida como para la forma alcalina de DPT. El valor de K_{sv} obtenido para la forma ácida fue de 68 M⁻¹ y para la forma alcalina de 69 M⁻¹. Los valores de concentración de O₂ utilizados en la figura 10.5, se obtuvieron de la literatura^[6] teniendo en cuenta las condiciones de temperatura y presión en las que se realizaron los experimentos (22,5 °C; 1 atm, respectivamente).

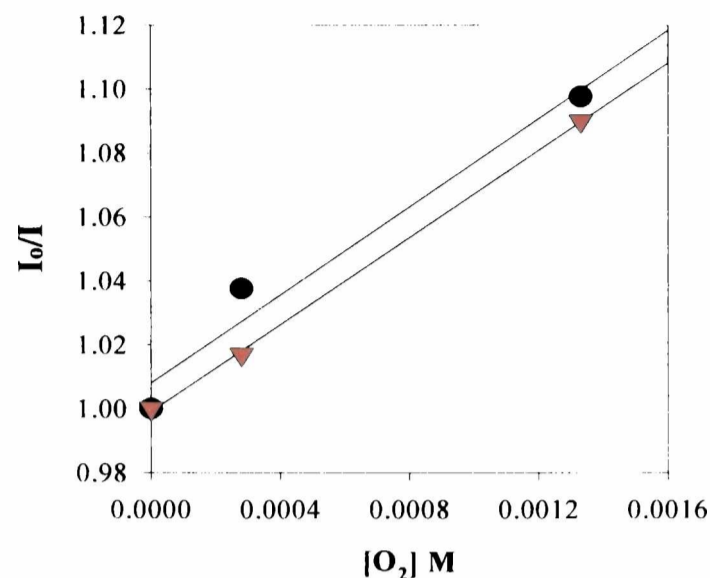


Figura 10.5: Gráficas de Stern-Volmer. Variación de la intensidad de fluorescencia (I_f) de DPT en soluciones acuosas, con la concentración de O_2 . (▼) Forma ácida (pH=5,5). (●) Forma alcalina (pH=10,5).

10.3 Quenching de fluorescencia por ácido *p*-aminobenzoico y por ácido *p*-aminobenzoilglutámico.

Como se mencionó anteriormente, estudios previos han sugerido que el Φ_F extremadamente bajo del AF se debe a procesos de desactivación no radiativa como consecuencia del sustituyente relativamente grande y con muchas posibilidades de movimiento. En la sección anterior se mostró que el MAF, que posee un sustituyente similar, presenta el mismo comportamiento. Ahora bien, estos sustituyentes podrían desactivar a los estados excitados confiriéndole a la molécula estados vibrorrotacionales adicionales, favoreciendo así la desactivación no radiativa; es decir, el sustituyente actuaría como *quencher* interno. Otra posibilidad consiste en una desactivación, también no radiativa, pero producida por choques intermoleculares.

Teniendo en cuenta que el tiempo de vida de fluorescencia de las pterinas, en general es del orden de los 10 nanosegundos (ver capítulo 4), y considerando la concentración extremadamente baja de las soluciones de MAF y AF utilizadas en los experimentos realizados para determinar Φ_F , puede suponerse que la desactivación del estado excitado de estas moléculas, debida a los choques intermoleculares, es despreciable.

Para entender más acerca de estos mecanismos de desactivación, se realizaron experimentos de *quenching*, donde se estudió el efecto de la concentración de Q (donde Q es el ácido *p*-aminobenzoilglutámico (PABG) o el ácido *p*-aminobenzoico (PABA)) sobre la fluorescencia de MPT. Las medidas se llevaron a cabo en condiciones estacionarias, usando un espectrofluorómetro (*Perkin-Elmer*). Los experimentos se realizaron empleando soluciones ácidas (pH=5,5) y alcalinas (pH=10,5) de MPT de concentración constante (25 μ M) y se fue variando la concentración de PABG y PABA, en un intervalo de concentración comprendido entre 0 y 700 μ M.

En ambos grupos de experimentos se observó que los espectros de emisión ($\lambda_{EX}=350$ nm) de la forma ácida de MPT presentan, en el intervalo de concentraciones ensayadas, una muy pequeña disminución progresiva en intensidad al aumentar la concentración de Q; manteniéndose inalterada la posición de los máximos de emisión de los espectros de emisión. En los experimentos desarrollados a pH 10,5 no se observaron cambios significativos en los espectros de emisión, en el intervalo de concentraciones ensayadas. En las figuras 10.6 y 10.7, se muestran los resultados obtenidos para los experimentos realizados con PABG y PABA, respectivamente.

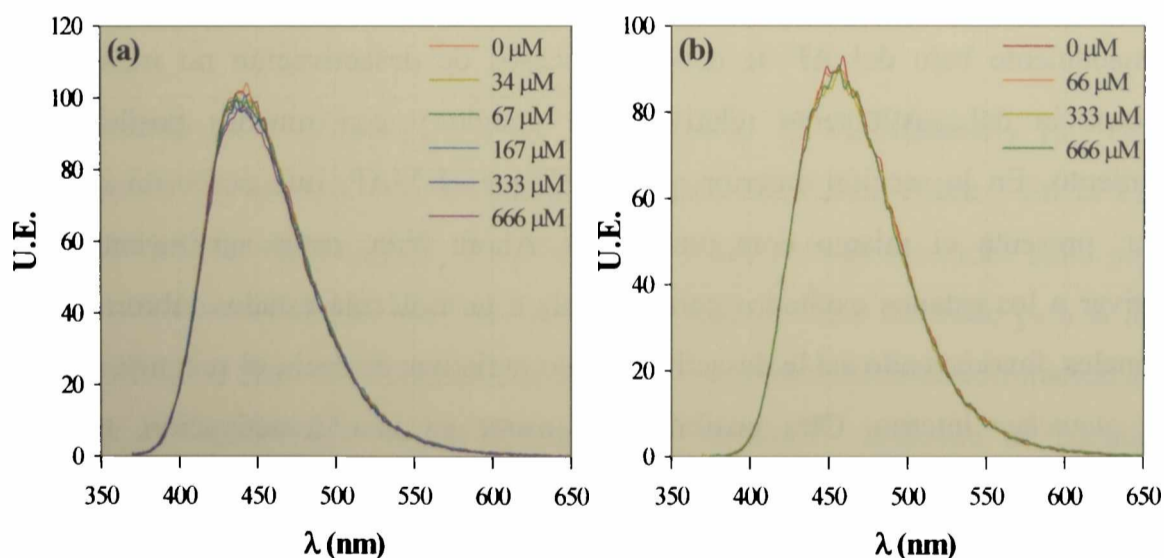


Figura 10.6: Variación de los espectros de emisión de MPT en solución ($\lambda_{EX}=350$ nm), con la concentración de PABG. a) Soluciones ácidas (pH=5,5). b) Soluciones alcalinas (pH=10,5).

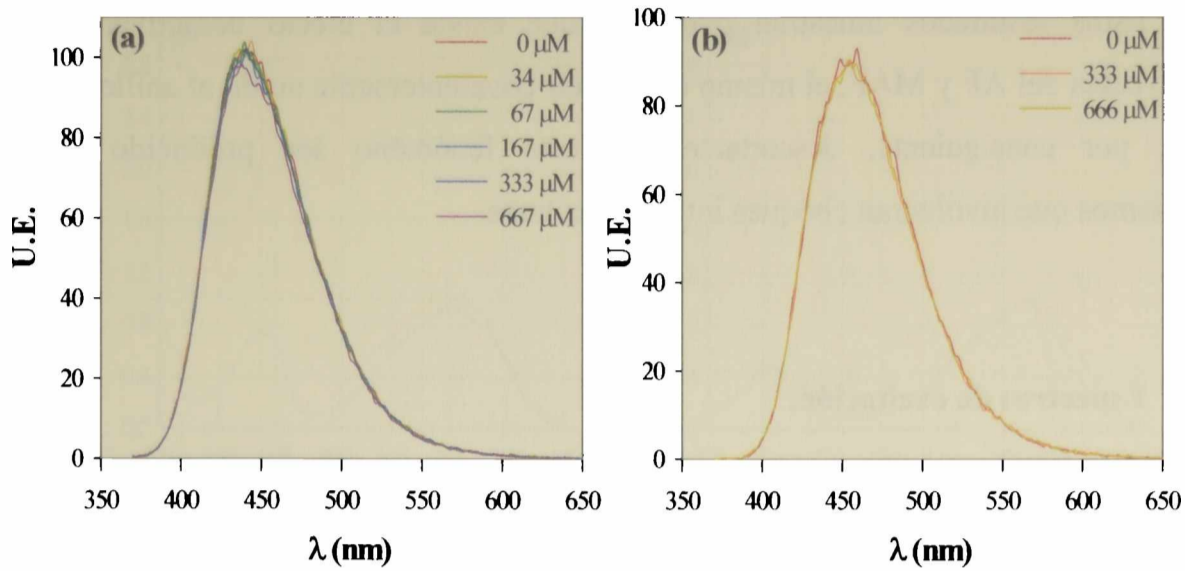


Figura 10.7: Variación de los espectros de emisión de MPT en solución ($\lambda_{\text{EX}}=350$ nm), con la concentración de PABA. a) Soluciones ácidas (pH=5,5). b) Soluciones alcalinas (pH=10,5).

En las figuras 10.8 y 10.9 se presentan los resultados del estudio de la dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F), con la concentración de Q (Q = PABG y PABA). En medio ácido se observó, para ambos Q, una pequeña disminución de I_F con el incremento en la concentración de Q; mientras que en medio alcalino I_F permanece invariante.

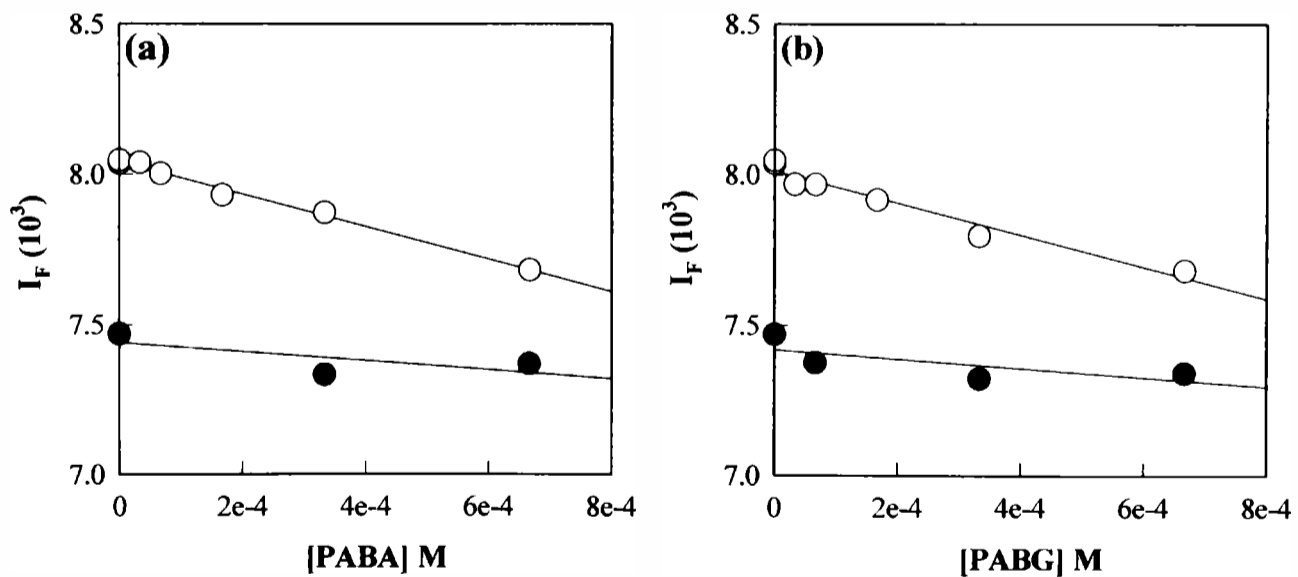


Figura 10.8: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de fluorescencia de MPT por Q ($\lambda_{\text{EX}}=350$ nm). (○) pH=5,5. (●) pH=5,5. a) Q = PABA. b) Q = PABG.

Estos resultados muestran que para que exista el efecto desactivante de los sustituyentes del AF y MAF, el mismo debe estar covalentemente unido al anillo pterínico. Puede, por consiguiente, descartarse que este fenómeno sea producido mediante mecanismos que involucran choques intermoleculares.

10.4 Espectros de excitación.

Se obtuvieron los espectros de excitación corregidos de las formas ácidas y alcalinas de HPT, MPT, DPT y MAF empleando la técnica descrita en el capítulo 5. Estos experimentos se realizaron en condiciones de pH similares a las mencionadas en la sección anterior y la emisión de las muestras se detectó a 450 nm. En todos los casos se emplearon soluciones equilibradas con aire. En las Figuras 10.9 a 10.12 pueden observarse los espectros de excitación corregidos, de cada uno de los cuatro compuestos estudiados; junto a los espectros de absorción. Con fines comparativos todos los espectros se normalizaron a la longitud de onda del máximo de la banda de menor energía.

Para el caso de HPT, MPT y DPT, se observa que los espectros de excitación y absorción coinciden en la posición de los máximos de las distintas bandas, sin embargo, no se superponen entre sí. Esto se debe, fundamentalmente a que la relación de intensidades entre la banda de mayor energía (230-290 nm) y la banda de menor energía (310-400 nm) en los espectros de excitación es menor que la respectiva relación en los espectros de absorción.

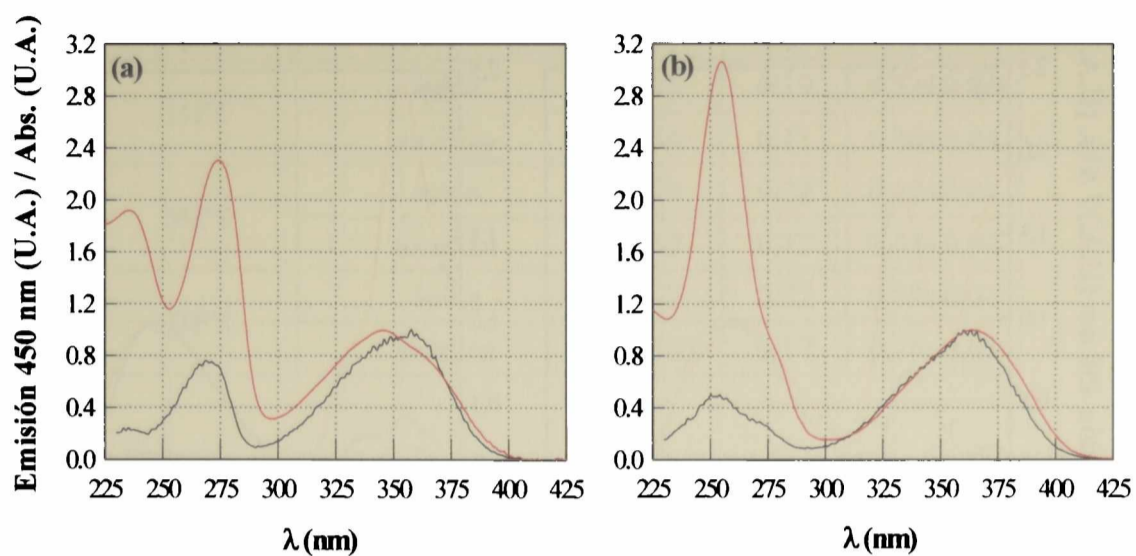


Figura 10.9: Espectros normalizados de excitación (—) y absorción (—) de HPT. (a) Forma ácida (pH=5,5). (b) Forma alcalina (pH=10,5).

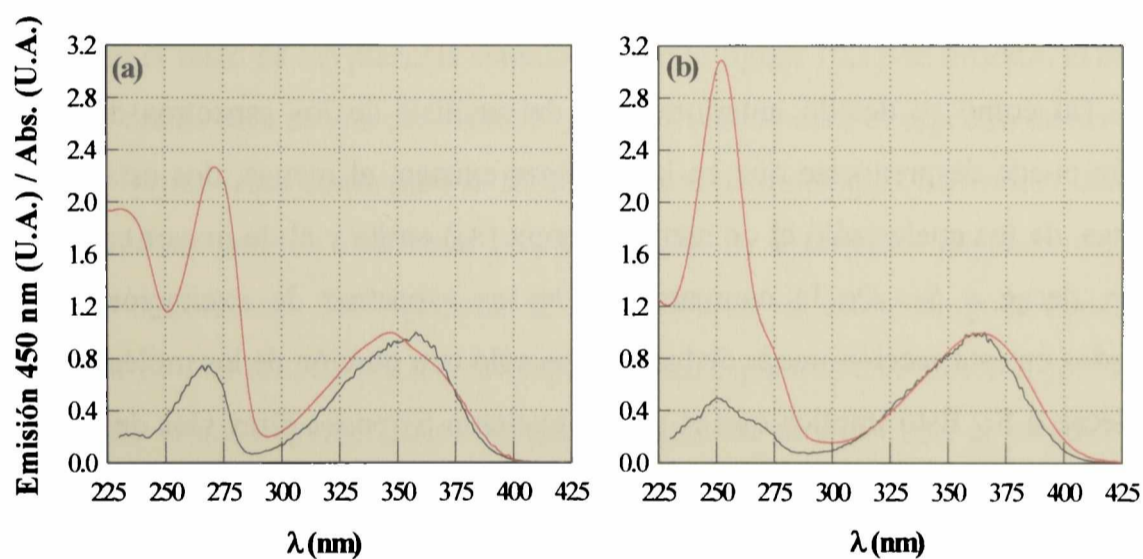


Figura 10.10: Espectros normalizados de excitación (—) y absorción (—) de MPT. (a) Forma ácida (pH=5,5). (b) Forma alcalina (pH=10,5).

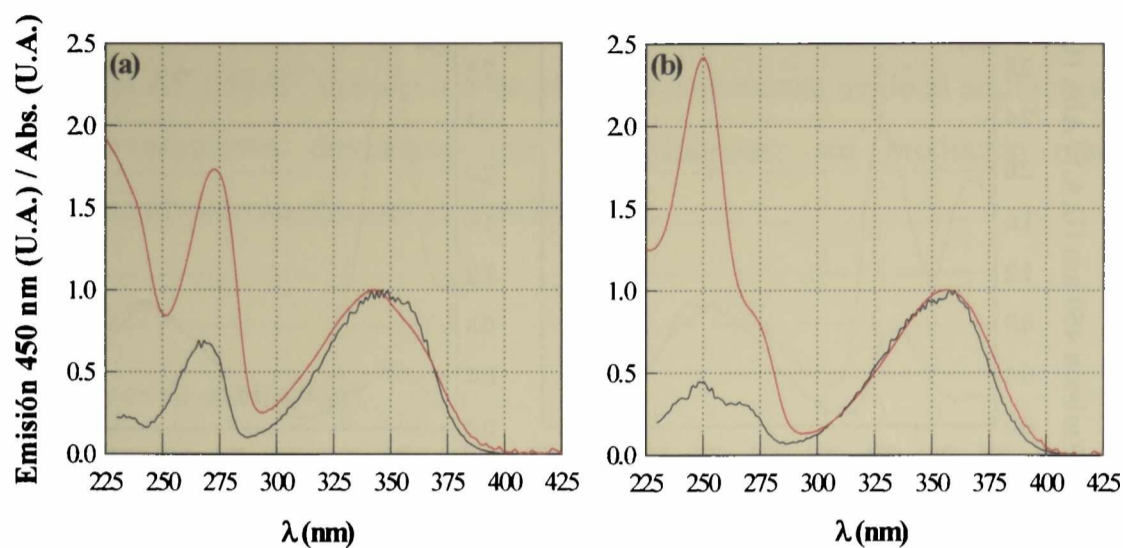


Figura 10.11: Espectros normalizados de excitación (—) y absorción (---) de DPT. (a) Forma ácida (pH=5,5). (b) Forma alcalina (pH=10,5).

Tal como se detalló anteriormente, del análisis de los espectros de absorción y emisión puede desprenderse que en las pterinas existen, al menos, dos estados excitados singletes, de los cuales sólo el de menor energía (S_1) emite y el de mayor energía (S_2), no emisor, decae a S_1 . De la comparación de los espectros de excitación y absorción mostrados en esta sección puede deducirse que sólo una porción de las moléculas excitadas a S_2 decae a S_1 . Esto implica que el estado excitado S_2 posee otras vías de desactivación que compiten eficientemente con la conversión interna a S_1 . Esto se ve reflejado cuando se calculan los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F^λ) a distintas longitudes de onda a partir de los espectros de excitación y de los Φ_F^{350} . En efecto, en la tabla 10.3 se muestran estos valores, calculados utilizando la ecuación 15 presentada en la sección 5.2.3. Puede apreciarse, en todos los casos, que los Φ_F^λ calculados por excitación con longitudes de onda correspondientes a la banda de mayor energía son mucho menores que los respectivos Φ_F^{350} .

Compuesto	Forma ácido-base	λ (nm)	Φ_F^λ	Φ_F^{350}
HPT	ácida	275	0,19	0,53±0,04
	alcalina	254	0,11	0,46±0,04
MPT	ácida	273	0,22	0,62±0,04
	alcalina	252	0,12	0,61±0,04
DPT	ácida	272	0,32	0,79±0,01
	alcalina	250	0,17	0,76±0,01

Tabla 10.3: Rendimientos cuánticos de fluorescencia en el máximo de la banda de absorción de menor energía (Φ_F^λ), calculados a partir del espectro de excitación (ecuación 15, sección 5.2.3.). Con fines comparativos, en la última columna se listan los correspondientes valores de Φ_F^{350} (Tabla 10.2).

Por otro lado, el comportamiento observado para MAF difiere respecto de lo observado para el resto de las pterinas estudiadas. En la figura 10.12 se muestra el espectro de excitación, donde sólo se ven dos bandas, y no tres como posee el espectro de absorción. Tanto para la forma ácida como para la forma alcalina, los máximos de las dos bandas de emisión coinciden con los máximos de las bandas de absorción asignadas al anillo pterínico. Por el contrario, los espectros de excitación no muestran ninguna banda en la zona alrededor de 303 nm, donde los correspondientes espectros de absorción presentan la banda asignada al sustituyente. Estos resultados están de acuerdo con el estudio de los espectros de emisión, confirmando que la excitación del sustituyente no genera la emisión a 450 nm correspondiente a la banda del anillo pterínico. Puede concluirse que los dos fluoróforos de la molécula de MAF (el anillo pterínico y el PABG), son sistemas aislados. Por consiguiente, la excitación del PABG no puebla los estados excitados propios del anillo pterínico.

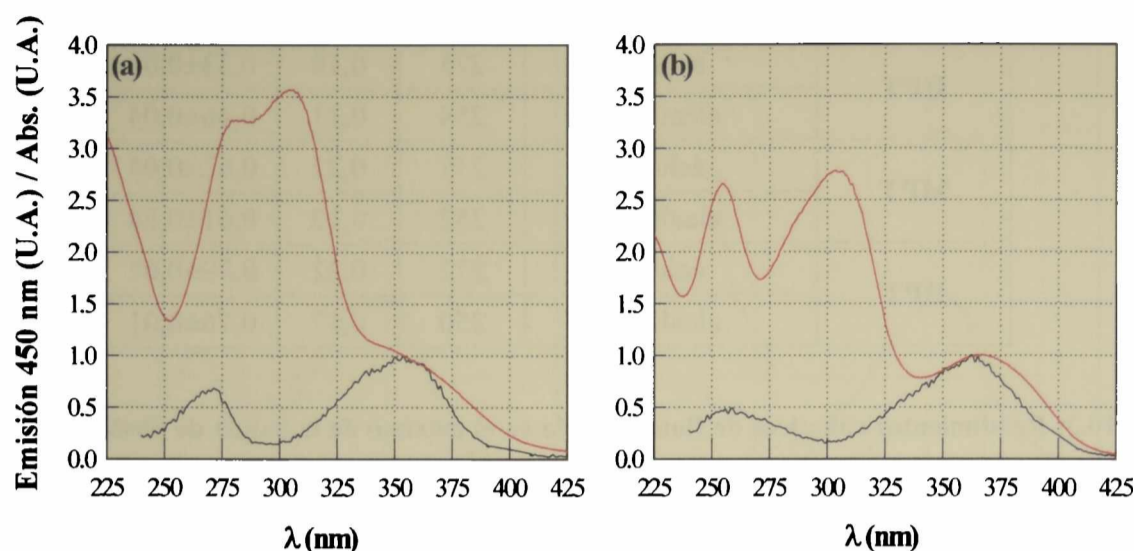


Figura 10.12: Espectros normalizados de excitación (—) y absorción (---) de MAF. (a) Forma ácida (pH=5,5). (b) Forma alcalina (pH=10,5).

10.5 Tiempos de vida de fluorescencia.

Con el objeto de determinar los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) para las formas ácidas y alcalinas de los compuestos en estudio, se analizó la evolución de la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo. Estos experimentos se llevaron a cabo mediante la técnica de *Single Photon Counting*. Las trazas experimentales fueron analizadas con el programa del equipo mediante ajustes no lineales luego de realizar la deconvolución de la señal de la lámpara. En todos los experimentos se probaron ajustes exponenciales de primer orden, de segundo orden y biexponenciales.

Este estudio se realizó sobre soluciones acuosas aireadas de tres derivados pterínicos (HPT, MPT y DPT). El MAF no se incluyó en este estudio debido a su bajo Φ_F^{350} . En todos los casos se observó que los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la Figura 10.13, se muestra una traza típica registrada para DPT. Los τ_F para las formas ácidas se obtuvieron promediando al menos cinco valores en el intervalo de pH comprendido entre 5,0 y 6,2. De la misma manera, los τ_F para las formas alcalinas se obtuvieron promediando, al menos, cinco valores en el intervalo de pH comprendido entre 10,0 y 10,5. Estos resultados se muestran en la tabla 10.4.

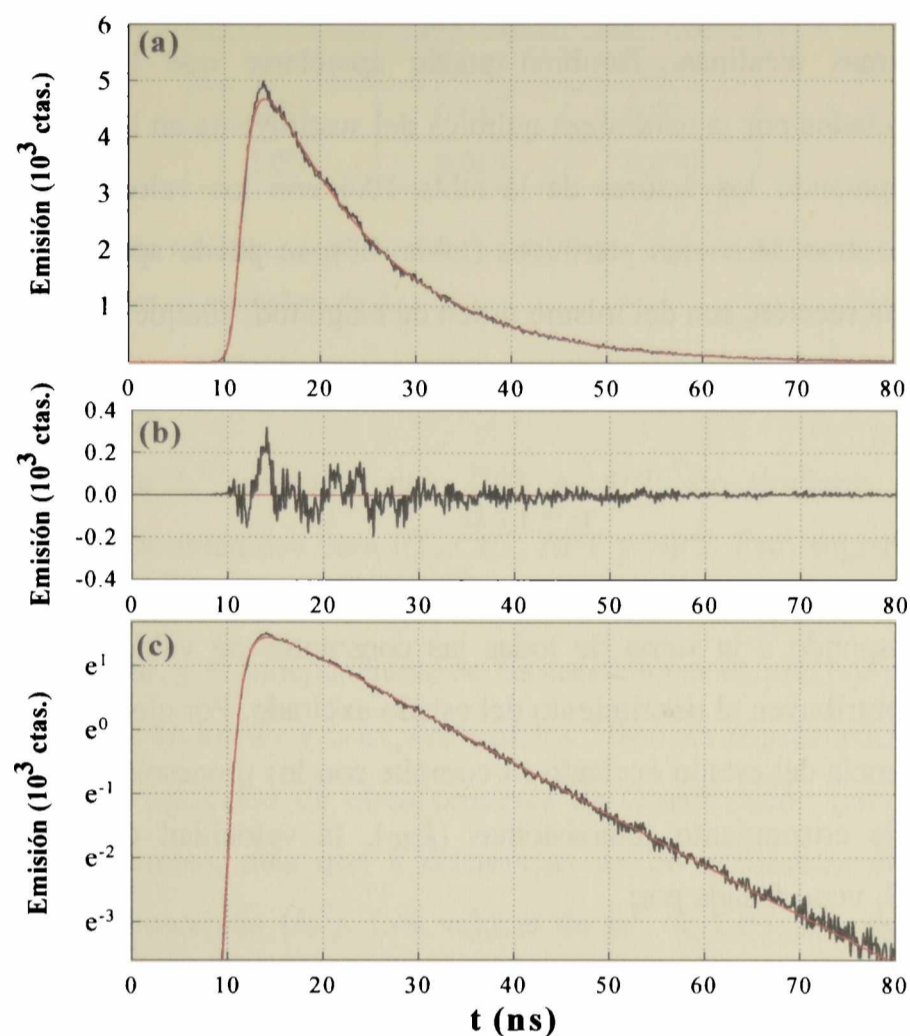


Figura 10.13: Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. (a) Traza experimental obtenida para una solución de DPT a pH 10,6 (—). Experimento realizado excitando a 350 nm y registrando la emisión a 450 nm. La línea roja representa el ajuste no lineal. (b) Residuos. (c) Decaimiento (—) y ajuste (—) en escala logarítmica.

Compuesto	τ_F (ns) ($\pm 0,4$ ns)	
	pH=5,5	pH=10,5
HPT	11,0	8,4
MPT	13,3	11,2
DPT	13,5	11,6

Tabla 10.4: Tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de las formas ácida (pH=5,5) y alcalina (pH=10,5) de pterinas.

Puede observarse que los τ_F para las formas ácidas son mayores que los de las respectivas formas alcalinas. También puede apreciarse que los τ_F se encuentran ligeramente afectados por la naturaleza química del sustituyente en la posición 6 del anillo pterínico. Comparando los valores de la tabla 10.4 con los valores presentados en el capítulo 4 para otros derivados pterínicos (tabla 4.3), se puede apreciar que los valores obtenidos en esta sección, son del mismo orden de magnitud, aunque algo mayores.

Los τ_F obtenidos corresponden a tiempos de vida de los estados excitados (S_1):

$$\tau_F = 1 / k_F \quad (1)$$

donde k_F corresponde a la suma de todas las constantes de velocidad de los distintos procesos que contribuyen al decaimiento del estado excitado. Por ejemplo, si consideramos que la fluorescencia del estado excitado S_1 compite con los procesos de conversión interna a S_0 (k_{IC}) y de cruzamiento intersistemas (k_{ISC}), la velocidad de decaimiento de la concentración S_1 vendrá dada por:

$$-d [S_1] / dt = k_F^0 [S_1] + k_{IC} [S_1] + k_{ISC} [S_1] = k_F [S_1] \quad (2)$$

donde k_F^0 es la constante de velocidad de fluorescencia intrínseca o natural. La constante k_F , obtenida experimentalmente, es: $k_F = \Sigma k_i$.

El rendimiento cuántico de fluorescencia viene dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{\Sigma k_i} = \tau_F \cdot k_F^0 \quad (3)$$

Esta expresión permite calcular k_F^0 a partir de Φ_F y τ_F . Para el cálculo de los valores de k_F^0 correspondientes a ambas formas ácido-base de HPT, MPT y DPT se utilizaron los valores de Φ_F y τ_F obtenidos en atmósfera de Ar (ausencia de O_2). Los valores de k_F^0 calculados a partir de la ecuación 3 se listan en la tabla 10.5.

Compuesto	k_F^0 (ns ⁻¹)	
	pH=5,5	pH=10,5
HPT	0,048	0,055
MPT	0,047	0,055
DPT	0,064	0,070

Tabla 10.5: Constantes de velocidad intrínseca (k_F^0) calculados a partir de la ecuación 3 y usando los valores de Φ_F y τ_F medidos en atmósfera de Ar.

Los valores de k_F^0 obtenidos para HPT y MPT son similares entre sí y muy parecidos a los valores obtenidos para PT, CPT, BPT y NPT. Esto sugiere que, para este grupo de compuestos, la velocidad de desactivación del estado excitado S_1 por fluorescencia es similar, y es independiente de las condiciones de pH. Por consiguiente, las diferencias observadas en los Φ_F y τ_F experimentales deben ser consecuencia de diferencias en las constantes de velocidad de otros procesos de desactivación (conversión interna, cruzamiento intersistemas), más que a diferencias en las constantes de velocidad del decaimiento por fluorescencia (k_F^0). Los valores de k_F^0 de DPT son significativamente mayores y esta diferencia podría justificar sus elevados Φ_F .

En la sección anterior, en los estudios en estado estacionario, se puso en evidencia el *quenching* de fluorescencia de DPT por O_2 . Con el objeto de conocer más en detalle este proceso de *quenching* se midieron los τ_F en soluciones alcalinas de DPT con diferentes concentraciones de O_2 . En particular, se realizaron los experimentos en tres condiciones diferentes: soluciones acuosas saturadas en Ar, en aire (21% O_2) y saturadas en O_2 . Los valores de concentración de O_2 utilizados en la figura 10.14 se obtuvieron de la literatura^[6] teniendo en cuenta las condiciones de temperatura y presión en las que se realizaron los experimentos (22,5 °C; 1 atm).

Para la determinación de los τ_F de la forma alcalina de DPT, en función de la concentración de O_2 , se realizaron experimentos en los cuales se excitó a 350 nm y se registró la emisión a 450 nm en función del tiempo. Se observó que los τ_F disminuyen progresivamente al aumentar la concentración de O_2 disuelto en el medio. En la figura 10.14, la gráfica de Stern-Volmer (τ_0/τ vs. $[O_2]$) presenta un comportamiento lineal. En estas condiciones, se determinó un valor de K_{sv} igual a 76 M⁻¹. Este valor de K_{sv} es

similar (dentro del error experimental), al observado en los experimentos en estado estacionario ($K_{SV}=69 \text{ M}^{-1}$; ver sección anterior). Estos resultados sugieren que este proceso de *quenching* de fluorescencia por O_2 , es un proceso de tipo dinámico.

Con las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidas y con los valores de τ_F para ambas formas ácido-base de DPT, se calcularon las constantes de velocidad de quenching de fluorescencia (k_q) por O_2 , siendo las mismas iguales a $5,0 \times 10^9$ y $6,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las formas ácidas y alcalinas, respectivamente. Para el cálculo de k_q de la forma ácida, se utilizó el valor de K_{SV} obtenido en la figura 10.5. Por su parte, para el cálculo de k_q de la forma alcalina se utilizó el promedio de los valores de K_{SV} obtenidos de las gráficas de I_0/I vs. O_2 (Figura 10.5) y de τ_0/τ vs. O_2 (Figura 10.14).

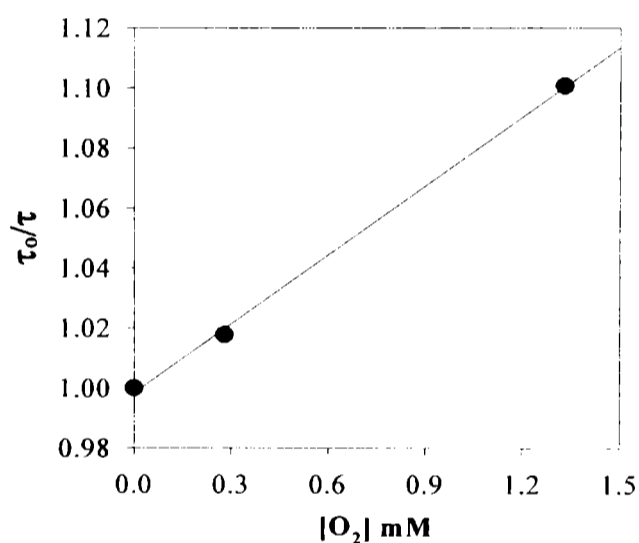


Figura 10.14: Gráficas de Stern-Volmer: Variación de los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de DPT en solución acuosa (pH=10,5), con la concentración de O_2 .

10.6 Titulación espectrofluorométrica.

Se realizaron titulaciones espectrofluorométricas de tres compuestos (HPT, MPT y DPT) usando un espectrofluorómetro *Perkin-Elmer* (ver capítulo 5). No fue posible realizar la correspondiente titulación del MAF, debido a que el mismo presenta un Φ_F extremadamente pequeño, lo que hace muy difícil la determinación experimental del valor de pK_a^* .

La figura 10.15 muestra la variación de la intensidades de fluorescencia (I_F) como una función del pH en el intervalo comprendido entre 4 y 10,5. La conducta observada en esta figura se debe al equilibrio previamente mencionado entre las formas ácida y alcalina de las pterinas (ver figura 9.1). Se realizaron ajustes no lineales de estas curvas con la siguiente ecuación:

$$I_F = I_a + (I_b - I_a) \cdot [K_a^* / (K_a^* + [H^+])] \quad (4)$$

donde I_a e I_b representan la intensidad de fluorescencia de la forma ácida y alcalina, respectivamente. K_a^* es la constante de disociación.

Los resultados de estos ajustes se muestran en la figura 10.15, donde puede observarse que, en los tres casos analizados, el comportamiento experimental se ajusta perfectamente con la ecuación 4. Los valores de K_a^* obtenidos mediante estos ajustes no lineales se listan en la tabla 10.6, junto con los respectivos valores de K_a obtenidos a partir de las titulaciones espectrofotométricas (ver capítulo 9). En esta tabla puede apreciarse que no hay diferencias significativas entre los dos grupos de resultados experimentales. Este hecho sugiere dos posibles explicaciones: por un lado, que las constantes de disociación del equilibrio entre las dos formas ácido-base de los estados S_1^* (K_a^*) son iguales que las constantes de disociación correspondientes al mismo equilibrio en estado basal S_0 (K_a); por el otro, que la desactivación de los estados S_1^* de las formas ácidas (alcalina) es mucho más rápida que la desprotonación (protonación).

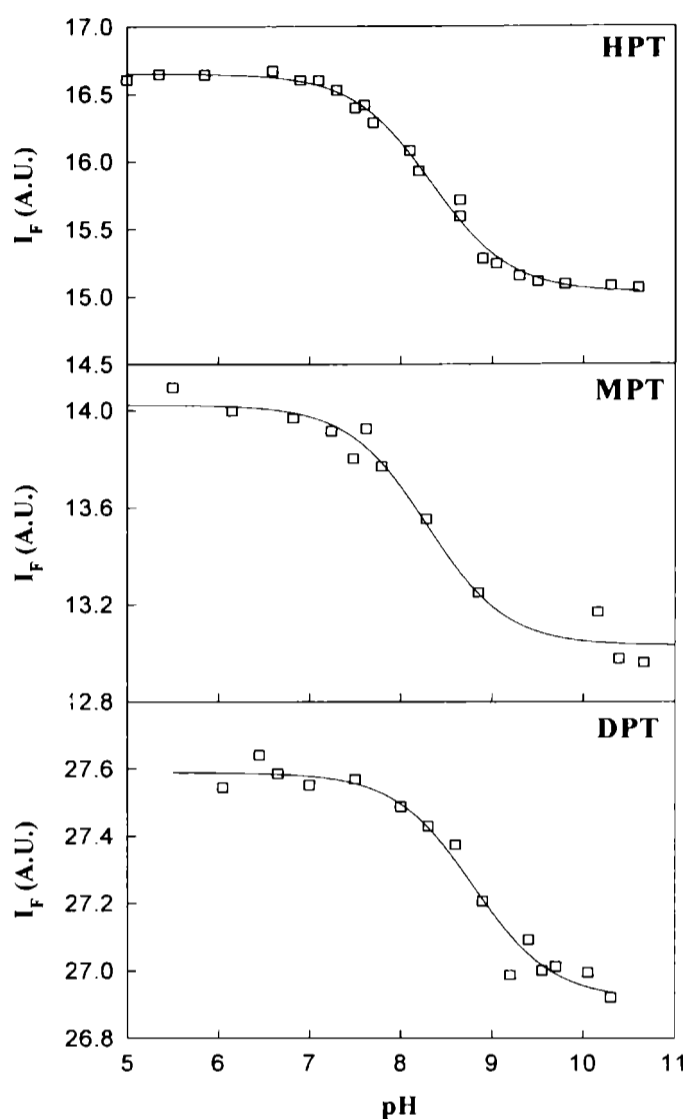


Figura 10.15: Variación de la intensidad de fluorescencia de pterinas como función del pH. En todos los casos se excitó a valores de λ correspondientes a los puntos isobéuticos. La línea continua representa la intensidad de fluorescencia calculada mediante el ajuste de los datos experimentales con la ecuación (4).

Compuesto	^a K _a	^a pK _a	^b K _a *	^b pK _a *
HPT	$(8 \pm 2) \times 10^{-9}$	8,1(±0,1)	$(4,6 \pm 0,8) \times 10^{-9}$	8,3(±0,1)
MPT	$(4,7 \pm 0,3) \times 10^{-9}$	8,3(±0,1)	$(6 \pm 3) \times 10^{-9}$	8,3(±0,1)
DPT	$(4 \pm 2) \times 10^{-9}$	8,6(±0,2)	$(1,5 \pm 0,8) \times 10^{-9}$	8,8(±0,2)

Tabla 10.6: Valores de pK_a para el equilibrio mostrado en la Figura 9.13. ^aValores obtenidos mediante titulaciones espectrofotométricas. ^bValores obtenidos mediante titulaciones espectrofluorométricas.

10.7. Conclusiones.

Se analizaron los espectros de emisión de HPT, MPT y DPT en diferentes condiciones de pH. Estos tres compuestos presentan el comportamiento general de las pterinas descrito en el capítulo 4. Los espectros de emisión presentan una única banda, con un máximo de emisión alrededor de los 450 nm. Puede observarse un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda de las bandas de emisión de las formas alcalinas respecto de las correspondientes a las formas ácidas. En el capítulo anterior se analizaron los respectivos espectros de absorción, mostrando que estos tres compuestos presentan, al menos, dos estados singletes excitados accesibles. El estudio de los espectros de emisión registrados excitando a diferentes longitudes de onda (λ_{EX}) indica la presencia de un único estado excitado emisor, independientemente del λ_{EX} . Es decir, que el estado excitado superior (S_2) que es poblado electrónicamente, decae por vías no radiativas a un único estado excitado de menor energía (S_1), desde el cual ocurre la emisión fluorescente.

Por su parte, el MAF presenta un comportamiento diferente respecto de los demás compuestos estudiados. Como se expuso en el capítulo 9, este compuesto presenta una banda adicional en los espectros de absorción, originada por el anillo bencénico que forma parte del sustituyente. El análisis de los espectros de emisión muestra que cuando este compuesto se excita con λ_{EX} menores a 320 nm aparecen dos bandas de emisión: una de ellas posee un máximo de emisión alrededor de los 365 nm y otro con el máximo cercano a los 450 nm. Estos resultados sugieren la existencia de dos estados electrónicamente excitados emisores. El estudio de la dependencia de los espectros de emisión con el pH muestra que la posición de la banda de mayor energía permanece invariante mientras que la posición de la banda de menor energía presenta el corrimiento batocrómico característico de las pterinas. Sobre la base de los resultados expuestos en este capítulo y teniendo en cuenta el comportamiento general de las pterinas, puede suponerse que la banda de emisión con el máximo alrededor de 450 nm corresponde al anillo pterínico y que la otra banda de emisión, ubicada alrededor de 365 nm, corresponde a la emisión del PABG.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de emisión fluorescente (Φ_F) de HPT, MPT, DPT y MAF, excitando a 350 nm. Se analizaron soluciones ácidas y alcalinas, en tres atmósferas diferentes: saturadas con Ar, equilibradas con aire y saturadas con O₂. Con

finés comparativos, en la tabla 10.7 se muestran los valores de Φ_F medidos en atmósfera de aire, de los cuatro compuestos estudiados, junto con los valores publicados en la literatura para otros derivados pterínicos^[1-3]. Puede apreciarse que la emisión fluorescente de las pterinas es fuertemente dependiente del pH y de la naturaleza química del sustituyente presente en la posición 6 del anillo pterínico. Para HPT, MPT y DPT se obtuvieron valores de Φ_F relativamente altos. Los Φ_F de las formas ácidas de estos tres compuestos son ligeramente mayores que los correspondientes a las formas alcalinas.

Por su parte, los valores significativamente inferiores de Φ_F obtenidos para el MAF sólo son comparables con los Φ_F del AF, otro derivado pterínico estructuralmente muy relacionado^[1,3]. Este hecho sugiere que los sustituyentes relativamente grandes incrementan la eficiencia de los procesos de desactivación no radiativa, lo que disminuye la emisión fluorescente. Estos sustituyentes podrían actuar como *quencher* interno, incrementando el número de estados vibrorrotacionales de la molécula, favoreciendo así la desactivación no radiativa. Otra posibilidad consiste en una desactivación, también no radiativa, pero producida por choques intermoleculares. Con el objeto de entender más acerca de estos mecanismos de desactivación, se realizaron experimentos de *quenching*, donde se estudió el efecto de la concentración del PABG y del PABA, sobre la fluorescencia de MPT. Estos resultados permiten descartar el mecanismo de desactivación por choques intermoleculares, sugiriendo que, para que exista este efecto desactivante, el sustituyente debe estar unido de forma covalente al anillo pterínico.

Compuesto	Φ_F (pH=5,5)	Φ_F (pH=10,5)
HPT	0,53	0,46
MPT	0,62	0,61
DPT	0,79	0,76
MAF	< 0,001	< 0,001
^[3] PT	0,33	0,27
^[3] CPT	0,28	0,18
^[3] FPT	0,12	0,07
^[3] AF	<0,005	<0,005
^[2] BPT	0,36	0,29
^[2] NPT	0,38	0,31

Tabla 10.7. Valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las formas ácidas y alcalinas de algunos derivados pterínicos.

Para HPT, MPT y MAF no se observan diferencias significativas entre los valores de Φ_F obtenidos en atmósferas de Ar, aire y O_2 (tabla 10.2). Estos resultados son similares a los descritos en el capítulo 4 para otras pterinas, e indican que los estados singletes excitados de estos compuestos no son desactivados significativamente por el O_2 . Por el contrario, para DPT se observó un fenómeno de quenching de fluorescencia para ambas formas ácido-base, al aumentar la concentración de O_2 disuelto en el medio. El análisis de Stern-Volmer de los experimentos en estado estacionario y experimentos resueltos en el tiempo mostró un comportamiento lineal. Los valores los valores de K_{SV} obtenidos en ambos grupos de experimentos son similares. Esto permite inferir que el proceso de *quenching* por O_2 observado es de tipo dinámico.

El análisis comparativo de los espectros de excitación de HPT, MPT y DPT, con sus respectivos espectros de absorción, muestra que los mismos coinciden en la posición de los máximos de las distintas bandas, sin embargo, no se superponen entre sí. Estos resultados sugieren que el estado excitado S_2 posee otras vías de desactivación que compiten eficientemente con la conversión interna a S_1 y sólo una fracción de las moléculas excitadas a S_2 , decaen a S_1 .

Los espectros de excitación de ambas formas ácido-base del MAF ($\lambda_{EM}=450$ nm) sólo presentan dos bandas, y no tres como poseen sus respectivos espectros de absorción. Como se expuso en la sección 10.4, los máximos de las dos bandas de emisión coinciden con los máximos de las bandas de absorción asignadas al anillo pterínico. La ausencia de bandas en los espectros de excitación en la zona alrededor de 303 nm, donde los espectros de absorción presentan la banda asignada al sustituyente, sugiere que los dos estados emisores de la molécula de MAF (el anillo pterínico y el PABA), son sistemas emisores aislados.

Adicionalmente, se analizó la evolución de la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo para las formas ácidas y alcalinas de HPT, MPT y DPT, y se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F). En todos los casos se observó que los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la tabla 10.4 puede observarse que los τ_F para las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas. También puede apreciarse que los τ_F se encuentran ligeramente afectados por la naturaleza química del sustituyente en la

posición 6 del anillo pterínico. Estos resultados son coherentes con el comportamiento general descrito en el capítulo 4 para otros derivados pterínicos (tabla 4.3), puede apreciarse que los valores presentados en este capítulo, son del mismo orden de magnitud, aunque algo mayores.

Los valores de la constante de velocidad de fluorescencia intrínseca o natural (k_F^0) obtenidos para HPT y MPT son similares entre sí y muy parecidos a los valores obtenidos para PT, CPT, BPT y NPT^[1-3]. Esto sugiere que, para este grupo de compuestos, la velocidad de desactivación del estado excitado S_1 por fluorescencia es similar, y es independiente de las condiciones de pH. Por consiguiente, las diferencias observadas en los Φ_F y τ_F experimentales deben ser consecuencia de diferencias en las constantes de velocidad de otros procesos de desactivación (conversión interna, cruzamiento intersistemas), más que a diferencias en las constantes de velocidad del decaimiento por fluorescencia (k_F^0). Los valores de k_F^0 de DPT son significativamente mayores a los del resto de los compuestos estudiados y esta diferencia podría justificar sus elevados Φ_F .

Mediante titulaciones espectrofluorométricas, se determinó el valor de la constante de disociación ácida (K_a^*) para HPT, MPT y DPT (Tabla 10.6). Para ninguno de estos compuestos se encontraron antecedentes en la literatura; sin embargo, los resultados obtenidos muestran el comportamiento general descrito en el capítulo 4. En la tabla 10.6 se comparan estos valores de K_a^* con los correspondientes valores de K_a obtenidos mediante titulaciones espectrofotométricas (ver capítulo 9). Puede apreciarse que, dentro del error experimental, ambos grupos de resultados experimentales son similares. Una posible explicación para el comportamiento observado consiste en considerar que las constantes de disociación del equilibrio entre las dos formas ácido-base (K_a^*) de los estados singletes excitados (S_1^*) son iguales que las constantes de disociación (K_a) correspondientes al mismo equilibrio en estado fundamental (S_0). Otra explicación posible consiste en considerar que la desactivación de los estados S_1^* de las formas ácidas (alcalina) es mucho más rápida que la desprotonación (protonación).

10.8. Referencias.

- [1] Lorente C.; “*Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución acuosa*” (2003).
- [2] Lorente C., Capparelli A. L., Thomas A. H., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem.Photobiol.Sci.*, **3**, 167 (2004).
- [3] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem.Photobiol.Sci.*, **1**, 1 (2002).
- [4] Chahidi C., Aubailly M., Momzikoff A., BazinM. Y Santus R.; *Photochem. Photobiol*, **33**, 641, (1981).
- [5] Neverov K. V, Mironov E. A. Lyudnikova T. A., Krasnovsky Jr A. A. Y Kritsky, M. S., *Biokhim*, **61**, 1627 (1996).
- [6] Murov S., Carmichael I., y Hug G.; *Handbook of Photochemistry, Second Edition, Revised and Expanded*, Table 12-3 Solvent properties, pag. 293 (1993).

QUENCHING DE FLUORESCENCIA POR ANIONES

Teniendo en cuenta lo expuesto en el capítulo 3 y los resultados publicados en la literatura para otros derivados pterínicos^[1-3], resultó importante hacer un análisis detallado y sistemático acerca de la influencia de distintos aniones sobre la fluorescencia de las tres pterinas bajo estudio: 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT) y 6,7-dimetilpterina (DPT). El ácido N-metil fólico (MAF) no pudo ser estudiado debido a su emisión extremadamente baja. En todos los casos se realizaron estudios de emisión total con la técnica de *Single Photon Counting* (en el cual se hicieron tanto medidas estacionarias como resueltas en el tiempo); a excepción de los estudios descritos en las secciones 11.5 y 11.6, que se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorómetro *Perkin-Elmer*.

11.1 *Quenching por aniones hidroxilo. Fluorescencia de pterinas en soluciones fuertemente alcalinas.*

Se realizó un estudio sistemático del efecto de la concentración del anión hidroxilo (HO^-) sobre la fluorescencia de HPT, MPT y DPT. Se llevaron a cabo medidas estacionarias y resueltas en el tiempo. En ambos casos se realizaron series de experimentos empleando soluciones de concentración de pterinas constante y valores de pH creciente.

Se observó que los espectros de emisión ($\lambda_{\text{EX}}=350\text{nm}$) de los tres compuestos analizados disminuyen progresivamente en intensidad al aumentar el pH por encima de 11. Sin embargo, la posición de los máximos de emisión de estos espectros permanece invariante. En las figuras 11.1 a 11.3, se muestran los resultados obtenidos para HPT, MPT y DPT. Por otro lado, se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_{F}) en función del pH. Para ello se realizaron experimentos similares a los descritos en el capítulo anterior ($\lambda_{\text{EX}}=350\text{ nm}$ y se registró la emisión a 450 nm en función del tiempo). Se observó, en todos los casos, que los τ_{F} disminuyen progresivamente a medida que

se incrementan los valores de pH por encima de 11. Estos resultados se muestran en las figura 11.1 a 11.3.

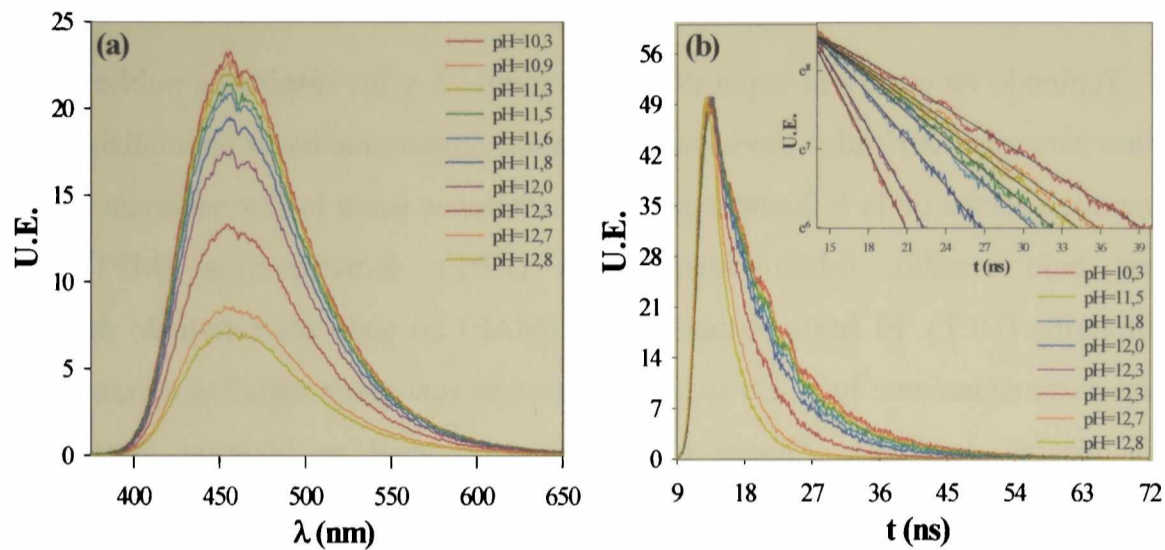


Figura 11.1: a) Variación de los espectros de emisión de HPT en soluciones acuosas fuertemente alcalinas ($\lambda_{EX}=350nm$). b) Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Trazas obtenidas para soluciones de HPT a diferentes pH ($\lambda_{EX}=350nm$ y se registró a 450 nm).

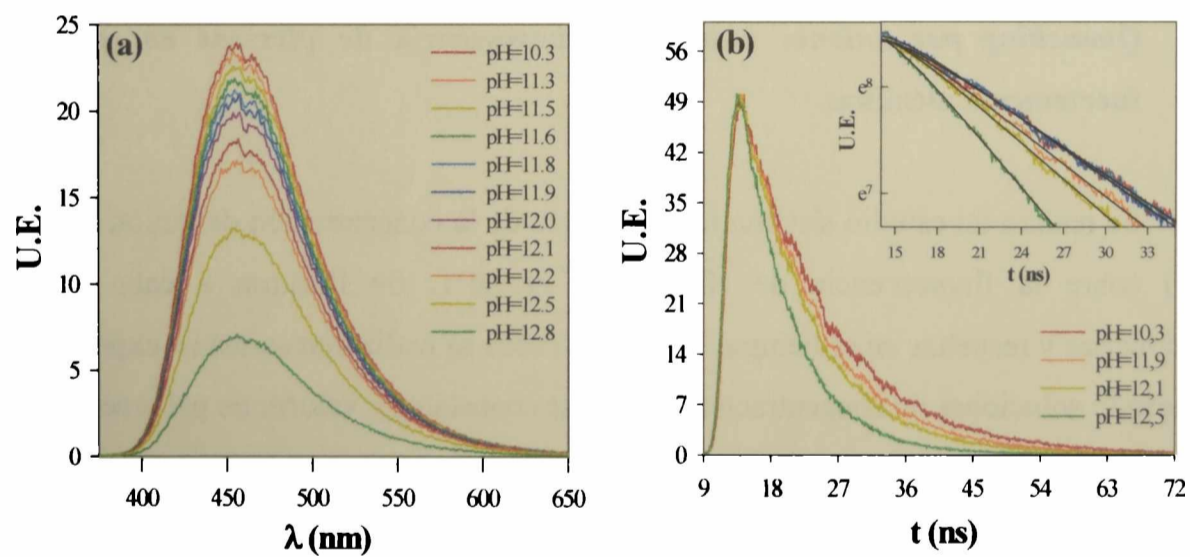


Figura 11.2: a) Variación de los espectros de emisión de MPT en soluciones acuosas fuertemente alcalinas ($\lambda_{EX}=350nm$). b) Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Trazas obtenidas para soluciones de MPT a diferentes pH. ($\lambda_{EX}=350nm$ y se registró a 450 nm).

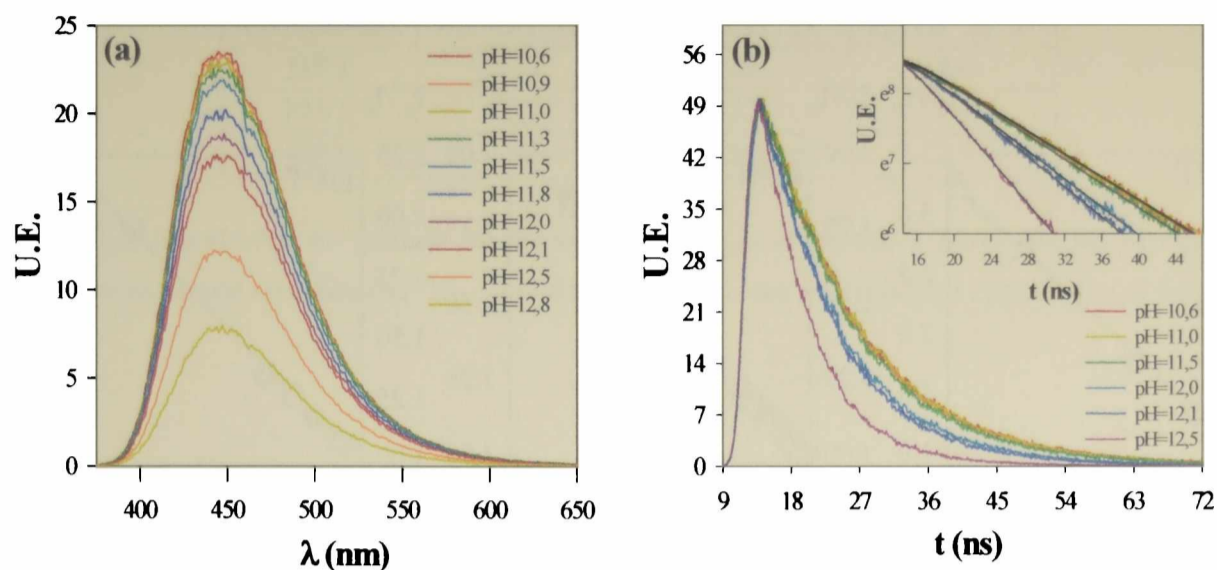


Figura 11.3: a) Variación de los espectros de emisión de DPT en soluciones acuosas fuertemente alcalinas ($\lambda_{EX}=350\text{nm}$). b) Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Trazas obtenidas para soluciones de DPT a diferentes pH. ($\lambda_{EX}=350\text{nm}$ y se registró a 450 nm).

En todos los casos analizados, el gráfico de intensidad de fluorescencia (I_F) como una función de la concentración de OH^- muestra un comportamiento lineal de Stern-Volmer (figura 11.4). Un comportamiento similar se observó para la dependencia de los τ_F con la concentración de HO^- (figura 11.4). En estos experimentos los valores de I_F^0 y τ_F^0 se obtuvieron promediando valores de I_F y τ_F observados en el intervalo de pH comprendido entre 10,2 y 10,5.

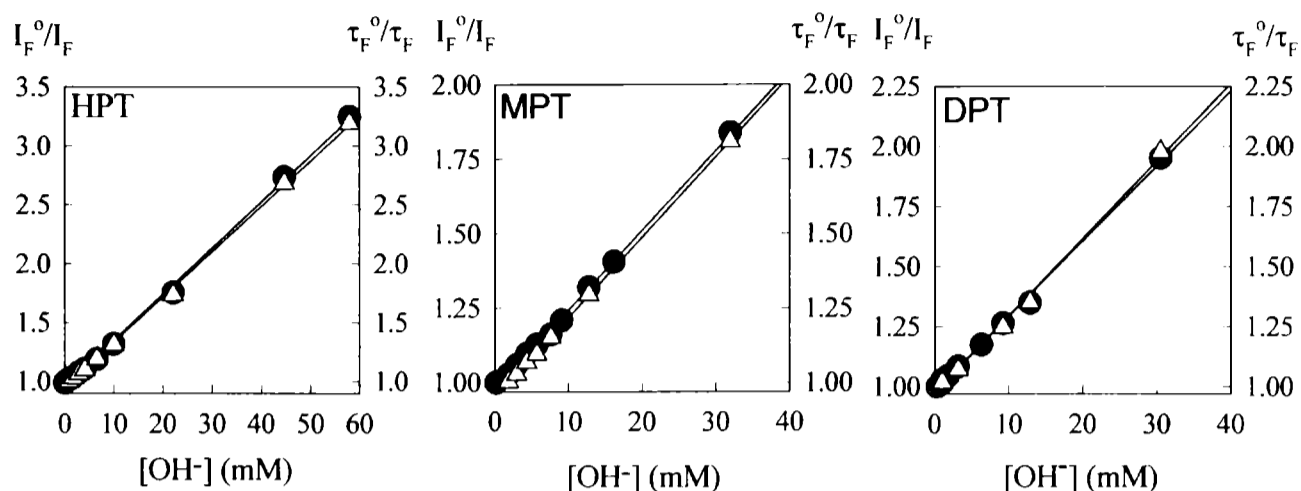


Figura 11.4: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de fluorescencia de HPT, MPT y DPT por HO⁻: (●) Variación de la intensidad de fluorescencia (I_F). (△) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F). Ambas series de experimentos se realizaron excitando a 350 nm.

En la tabla 11.1 se listan los valores de las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidos a partir de la figura 11.4. Puede apreciarse que, para cada compuesto estudiado, ambos valores de K_{SV} (los obtenidos en los experimentos de estado estacionario y resuelto en el tiempo) son similares, dentro del error experimental. Estos resultados permiten inferir que el fenómeno de disminución de la intensidad de fluorescencia de las pterinas, observado al aumentar el pH, es un proceso de tipo dinámico.

Como se expuso en el capítulo 6, podemos relacionar K_{SV} y el τ_F del compuesto estudiado en ausencia del *quencher* (τ_F⁰), con la constante de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) por medio de la siguiente ecuación:

$$K_{SV} = \tau_F^0 k_q \quad (1)$$

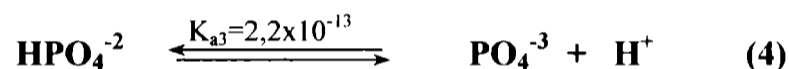
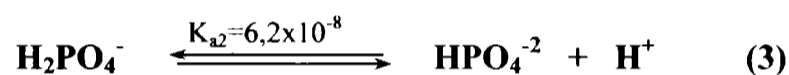
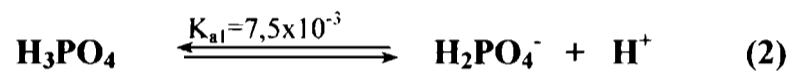
De esta manera, con los valores de K_{SV} y τ_F⁰ obtenidos, se calcularon los correspondientes valores de k_q para cada compuesto estudiado. Para estos cálculos se utilizó un promedio de los valores de K_{SV} obtenidos de las gráficas de I_F⁰/I_F vs. [HO⁻] y de τ_F⁰/τ_F vs. [HO⁻]. Estos resultados se muestran en la tabla 11.1.

Compuesto	$K_{sv}^a (\pm 1) / M^{-1}$	$K_{sv}^b (\pm 1) / M^{-1}$	$k_q / 10^9 M^{-1} s^{-1}$
HPT	39	39	4,0
MPT	27	27	2,4
DPT	31	32	2,7

Tabla 11.1: Resultados de análisis de Stern-Volmer. K_{sv}^a obtenidos a partir de los experimentos realizados en estado estacionario. K_{sv}^b obtenidos a partir de los experimentos resueltos en el tiempo.

11.2 Quenching por aniones fosfato.

Los equilibrios ácido-base que involucran a los iones fosfatos, y sus respectivas constantes, son ^[4]:



Como los experimentos se realizaron en dos condiciones de pH (6,2 y 10,5); de las ecuaciones (2) a (4) se deduce que a pH 6,2 es el $H_2PO_4^-$ la forma del anión predominante, mientras que a pH 10,5 la forma predominante es HPO_4^{2-} .

11.2.1 Estudio en estado estacionario.

Se prepararon mezclas de cada una de las tres pterinas en estudio y el anión fosfato. Se tomaron los espectros de emisión a distintas concentraciones de fosfato, manteniendo constante la concentración de la pterina ($2,5 \times 10^{-5}$ M). Se registraron los espectros de absorción de las distintas mezclas antes y después de registrar el espectro de emisión. De esta manera se controló que durante las experiencias, la mezcla no sufrió ninguna alteración. Los resultados muestran una clara disminución en la emisión fluorescente al aumentar la concentración del anión en soluciones ácidas, y una leve disminución en

soluciones alcalinas. En las figuras 11.5 a 11.7 se muestran los resultados de estos experimentos para HPT, MPT y DPT, tanto en medio ácido como en medio alcalino.

En las figuras 11.8 a 11.10 se muestran las gráficas de I_F en función de la concentración de aniones fosfato, junto con las correspondientes gráficas de Stern-Volmer para ambas formas ácido-base de HPT, MPT y DPT. En todos los casos se observó un comportamiento similar. Pueden apreciarse relaciones lineales de Stern-Volmer en todos los experimentos realizados. Las correspondientes constantes K_{SV} se listan en la tabla 11.2.

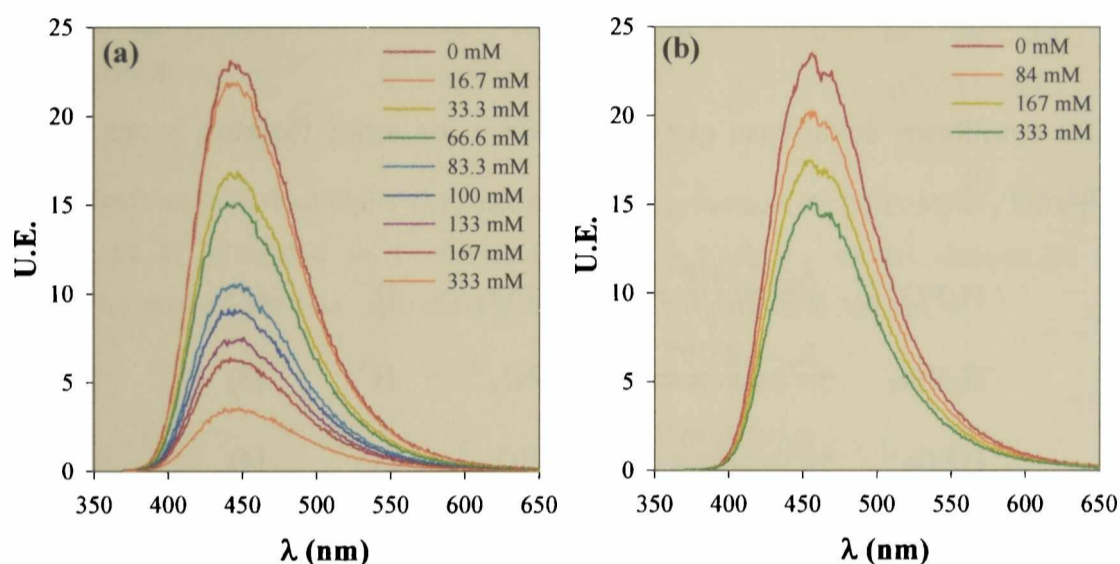


Figura 11.5: Espectros de emisión de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones fosfato. a) Soluciones ácidas (pH=6,2) y b) soluciones alcalinas (pH=10,5)

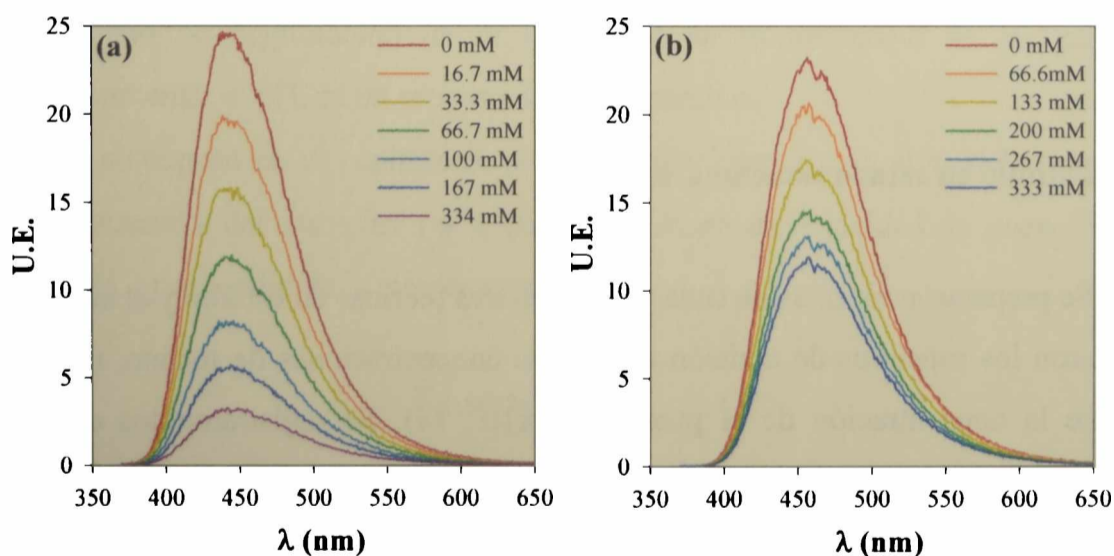


Figura 11.6: Espectros de emisión de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones fosfato. a) Soluciones ácidas (pH=6,2) y b) soluciones alcalinas (pH=10,5)

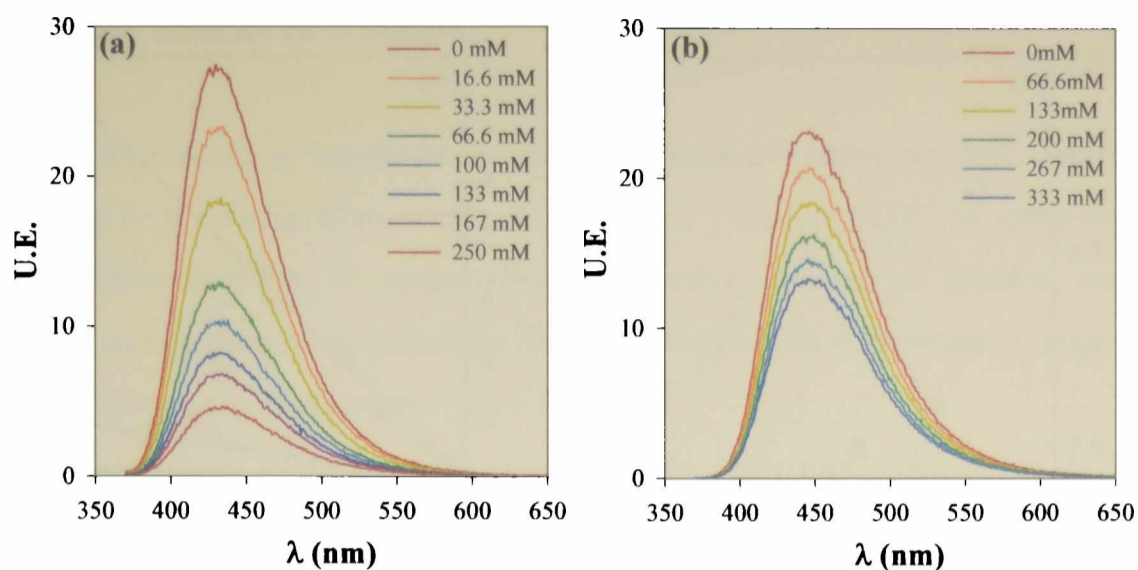


Figura 11.7: Espectros de emisión de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones fosfato. a) Soluciones ácidas (pH=6,2) y b) soluciones alcalinas (pH=10,5)

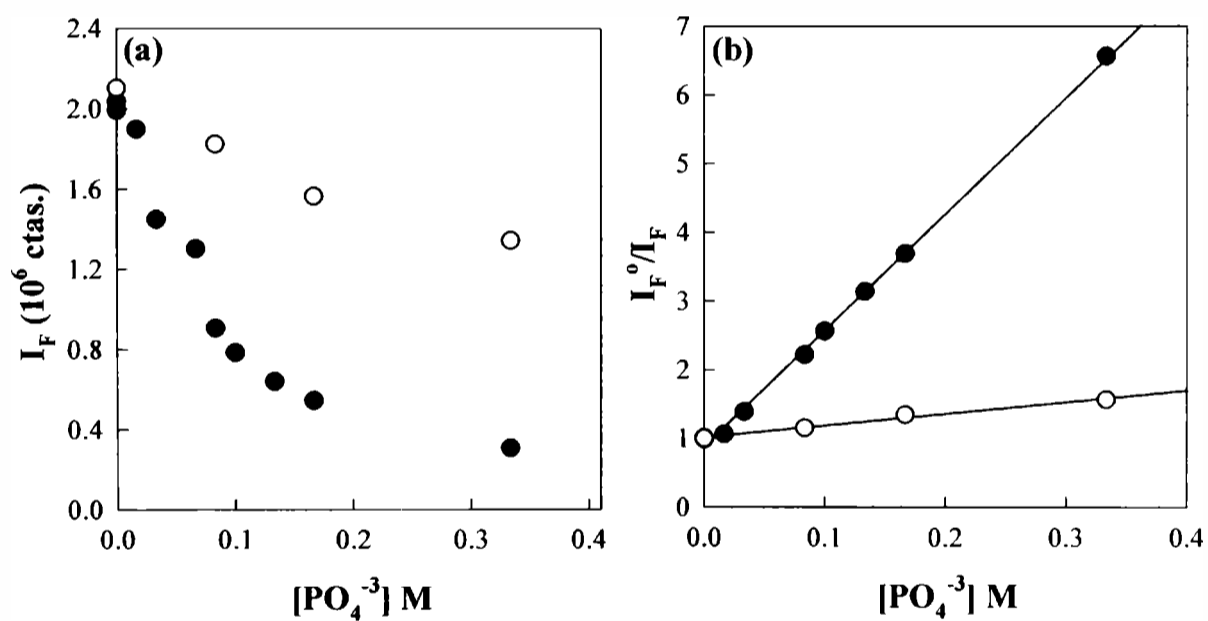


Figura 11.8: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

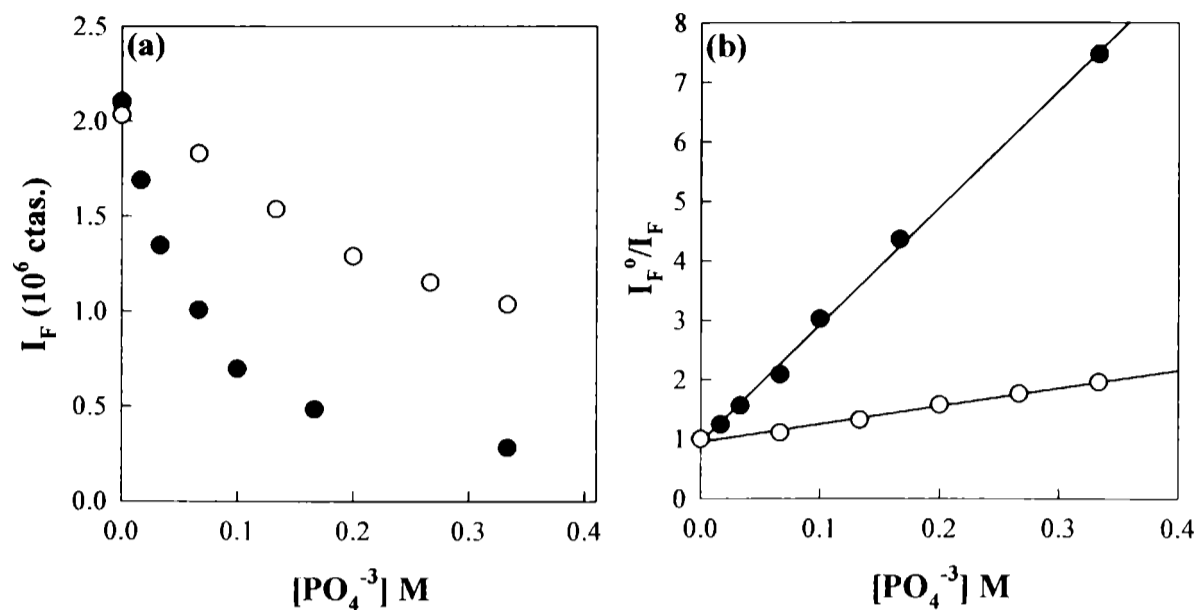


Figura 11.9: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

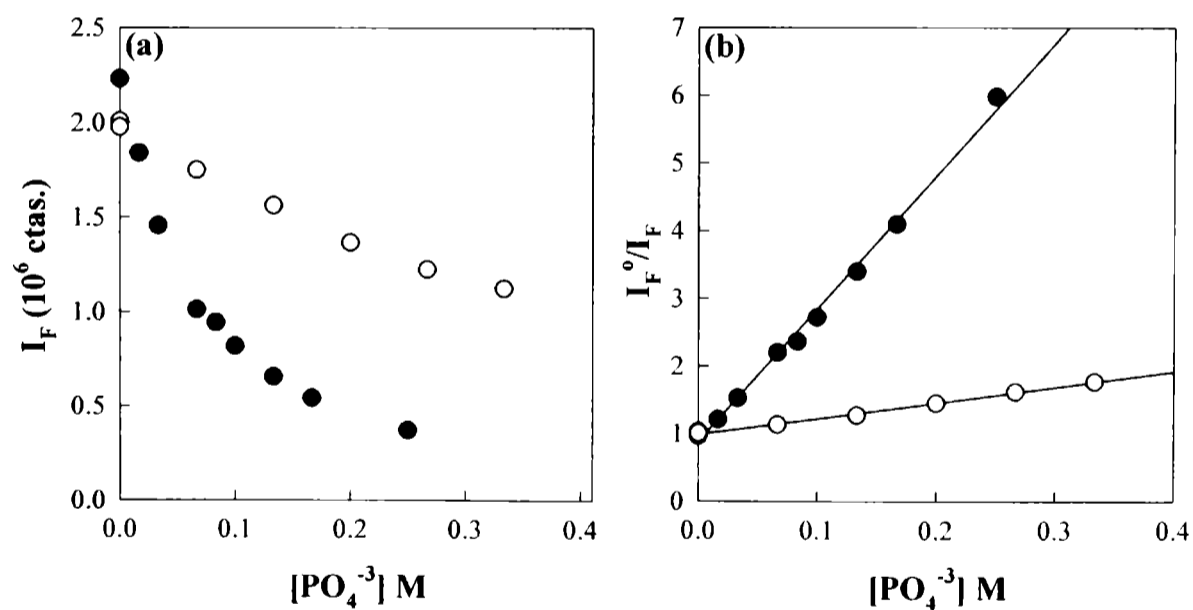


Figura 11.10: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

11.2.2 Estudio resuelto en el tiempo.

En esta sección se presentan los resultados experimentales correspondientes a los decaimientos de la emisión fluorescente de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en presencia de aniones fosfatos. Además, se presentan sus respectivos ajustes no lineales, realizados suponiendo un comportamiento cinético de primer orden. Los experimentos se realizaron en dos condiciones de pH diferentes (6,2 y 10,5).

En las figuras 11.11 a 11.13 se muestra la dependencia de los τ_F de los tres compuestos estudiados con la concentración de fosfato; mientras que en las figuras 11.14 a 11.16 se muestran las respectivas gráficas de Stern-Volmer. Los valores de las constantes K_{SV} obtenidas en estos experimentos se listan en la tabla 11.2. Estos resultados, muestran que, a pH 6,2 los τ_F disminuyen significativamente al aumentar la concentración de los iones fosfato, mientras que, para la forma alcalina (pH=10,5) se sólo se observa una disminución muy pequeña.

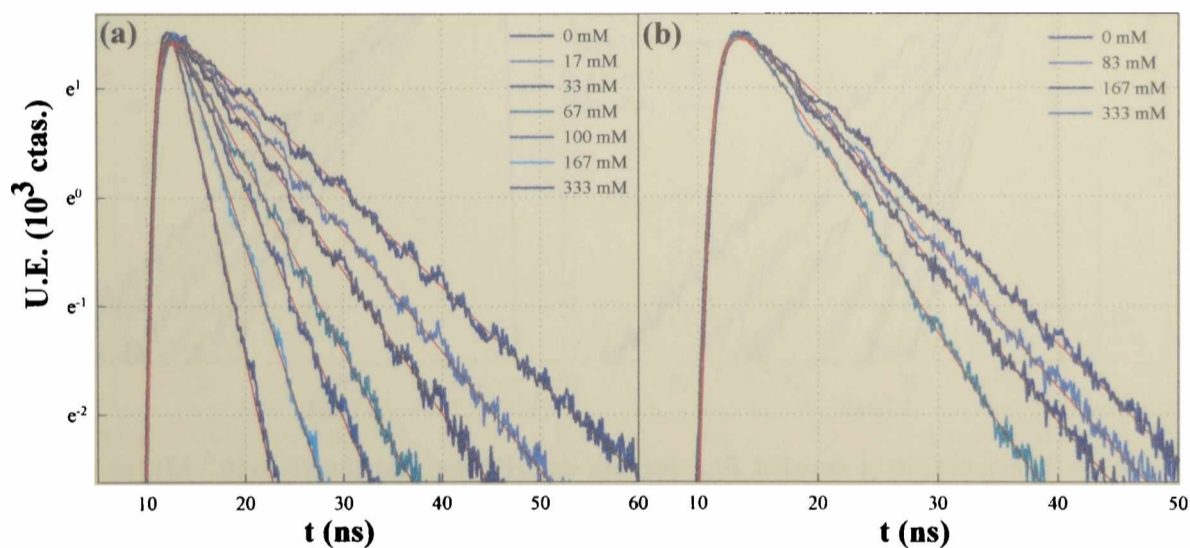


Figura 11.11: Variación de la emisión fluorescente de HPT en solución ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones fosfato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales. a) pH 6,2 y b) pH 10,5.

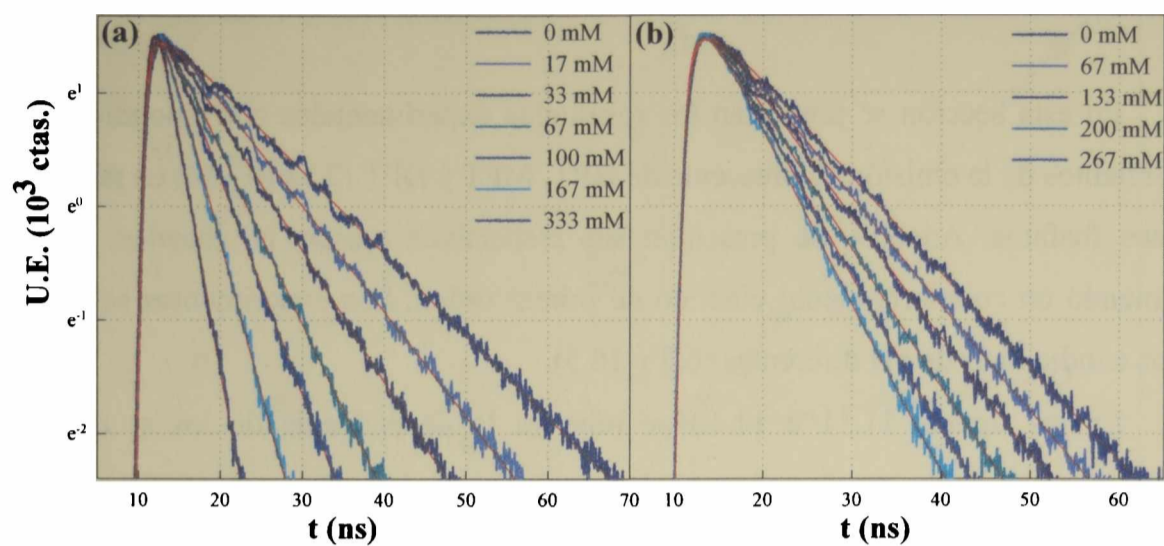


Figura 11.12: Variación de la emisión fluorescente de MPT en solución ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones fosfato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales. a) pH 6,2 y b) pH 10,5.

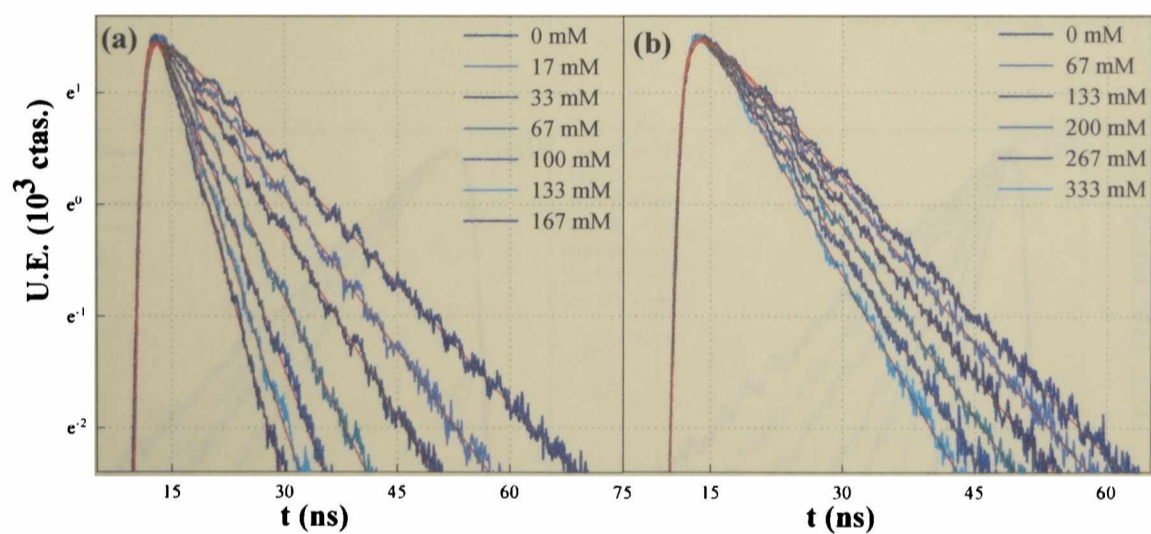


Figura 11.13: Variación de la emisión fluorescente de DPT en solución ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones fosfato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales. a) pH 6,2 y b) pH 10,5.

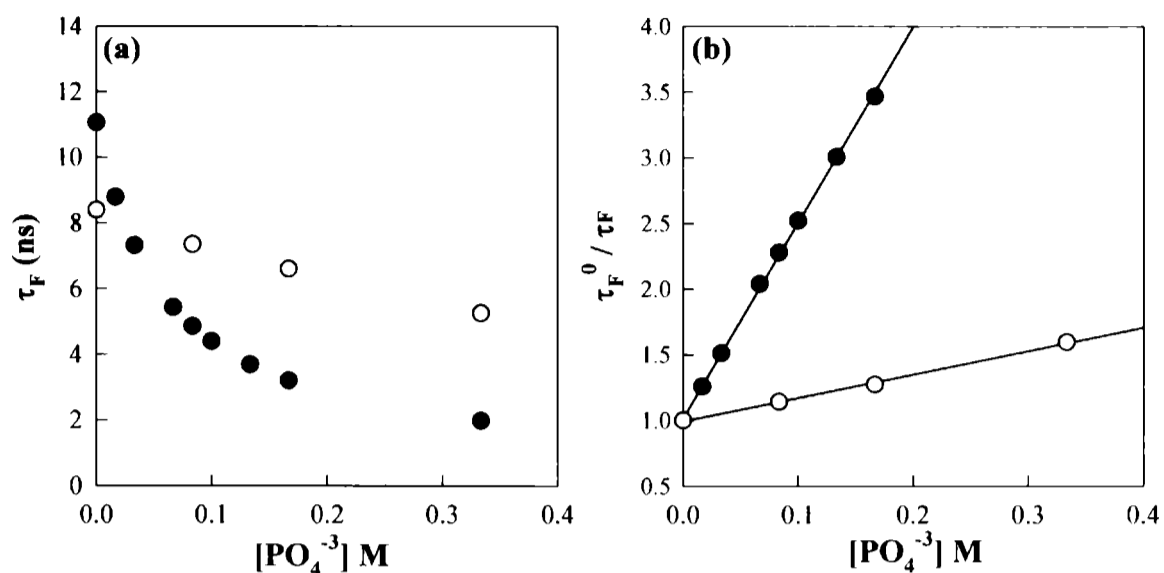


Figura 11.14: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

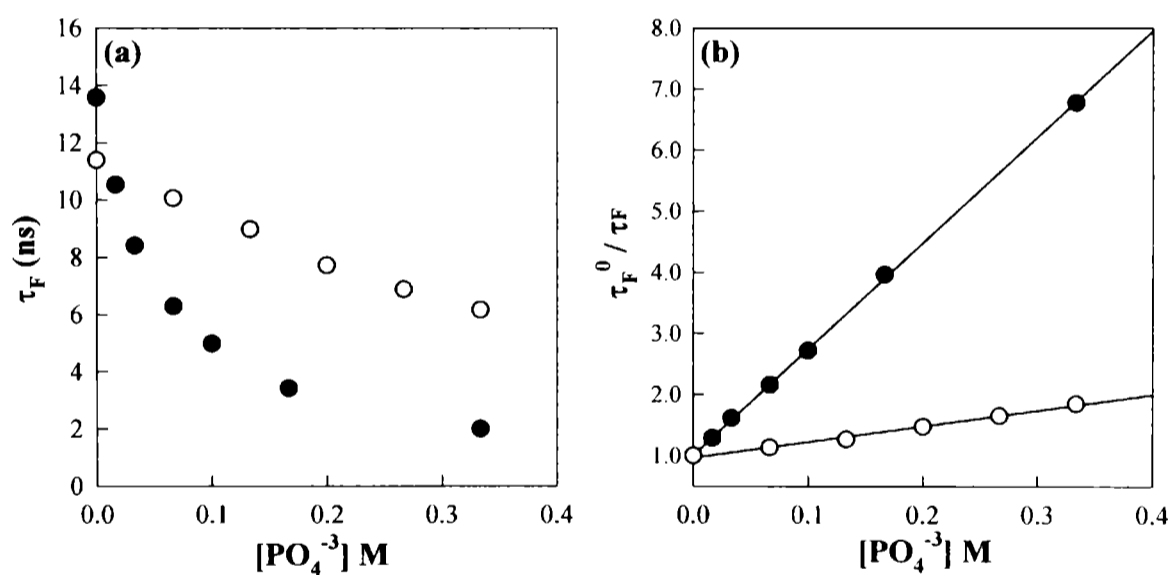


Figura 11.15: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

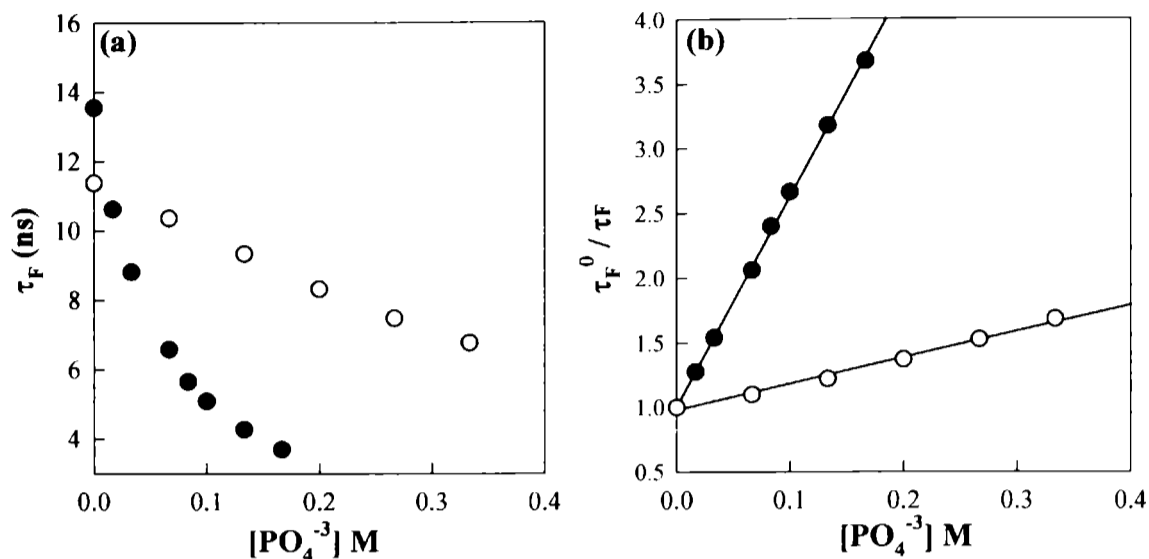


Figura 11.16: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones fosfato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

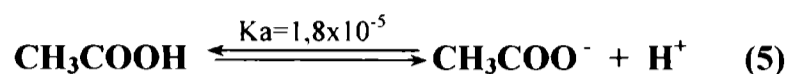
Con los valores de las constantes de K_{SV} y τ_F obtenidos, se calcularon las constantes bimoleculares de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) por fosfatos. Los valores de K_{SV} empleados para calcular estas constantes se obtuvieron promediando los valores obtenidos en los dos grupos de experimentos (medidas estacionarias y resueltas en el tiempo). En la tabla 11.2 se listan los valores de K_{SV} , junto con las k_q calculadas para las distintas formas ácido-base de los tres compuestos estudiados.

Compuesto	Forma ácida			Forma alcalina		
	K_{sv}^a (± 0.5)/M ⁻¹	K_{sv}^b (± 0.5)/M ⁻¹	$k_q / 10^9$ M ⁻¹ s ⁻¹	K_{sv}^a (± 0.5)/M ⁻¹	K_{sv}^b (± 0.5)/M ⁻¹	$k_q / 10^9$ M ⁻¹ s ⁻¹
HPT	16,9	14,9	1,35	1,7	1,8	0,21
MPT	19,7	17,4	1,28	3,0	2,9	0,25
DPT	19,6	16,2	1,2	2,3	2,0	0,18

Tabla 11.2: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) y constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) de pterinas con aniones fosfato. Forma ácida (pH=6,2) y Forma alcalina (pH=10,5). La desviación estándar correspondiente se indica entre paréntesis.

11.3 *Quenching* por aniones acetato.

En esta sección se muestran experimentos realizados en dos condiciones de pH (6.2 y 10,5). La siguiente ecuación representa la disociación del ácido acético ^[4]:



De la ecuación (5) y teniendo en cuenta el valor de la constante de disociación ácida (K_a), puede verse que tanto a pH 6,2 como a pH 10,5 la forma ácido-base predominante es la forma CH_3COO^- .

11.3.1 Estudio en estado estacionario.

Se realizaron experimentos similares a los llevados a cabo con fosfato (sección 11.2). En la figura 11.17 a 11.19 se observan las variaciones en los espectros de emisión de ambas formas ácido-base de HPT, MPT y DPT, respectivamente, a diferentes concentraciones de aniones acetato. En todos los casos la concentración de pterinas fue $2,5 \times 10^{-5}$ M. Las gráficas de I_F en función de la concentración de anión y los correspondientes análisis de Stern-Volmer se muestran en las figuras 11.20 a 11.22. Puede apreciarse claramente que, a pH 6,2, la I_F disminuye en forma muy significativa al aumentar la concentración del anión acetato. Por el contrario, no se observan cambios en los espectros de emisión de ninguno de los tres compuestos estudiados en presencia de acetato a pH 10,5.

En la tabla 11.3 se listan los valores de las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtenidas en estos experimentos. Puede apreciarse, en primer lugar, que todos los valores en medio ácido son del orden de los obtenidos en los experimentos con fosfato, pero ligeramente menores. Para las formas alcalinas no pudo detectarse efecto de *quenching* en ninguna de las pterinas analizadas, en el intervalo de concentraciones de aniones acetato estudiado.

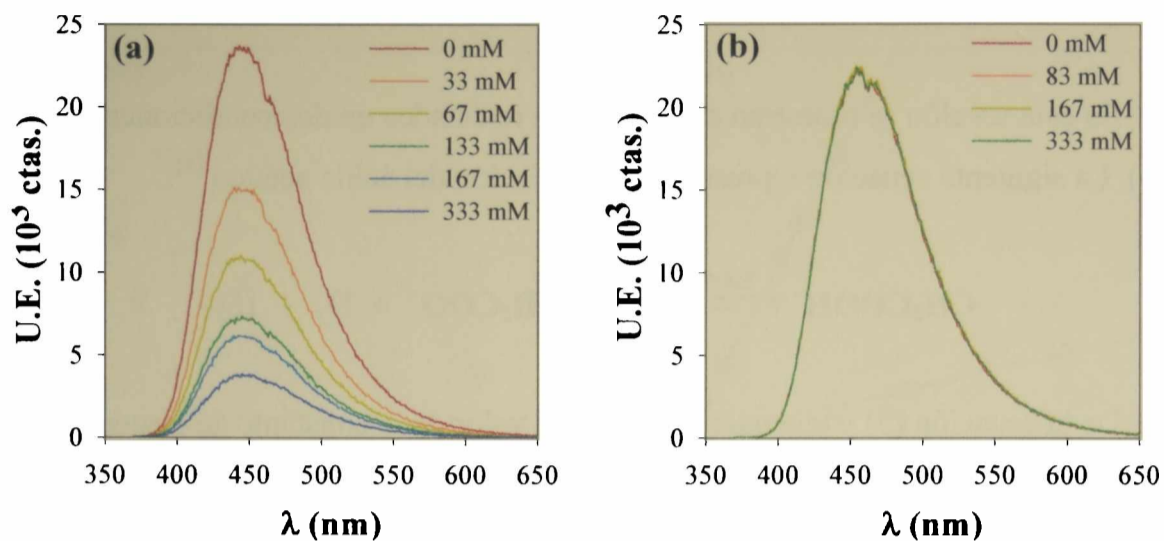


Figura 11.17: Espectros de emisión de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones acetato. a) Soluciones pH 6,2 y b) soluciones pH 10,5.

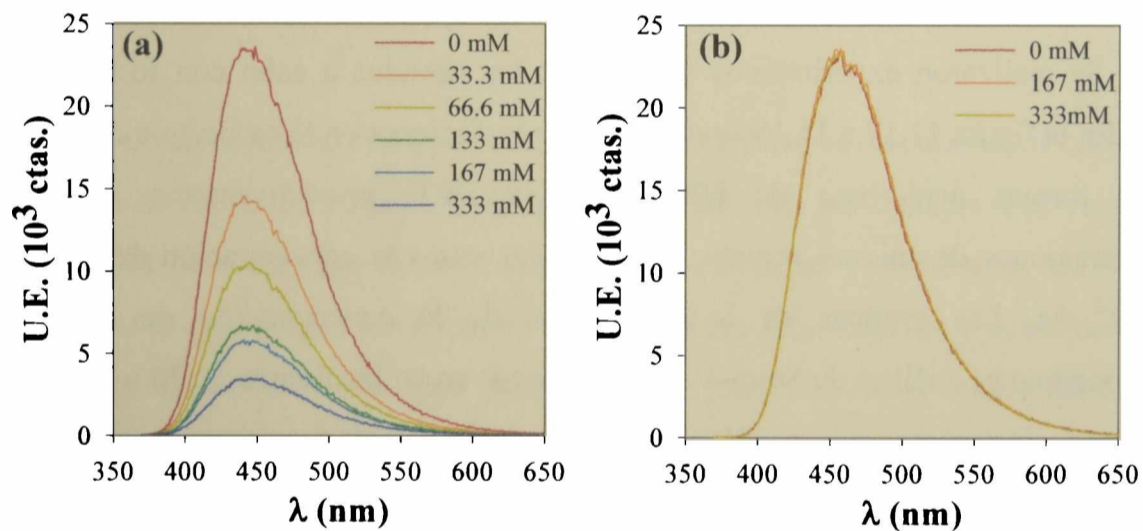


Figura 11.18: Espectros de emisión de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones acetato. a) Soluciones pH 6,2 y b) soluciones pH 10,5.

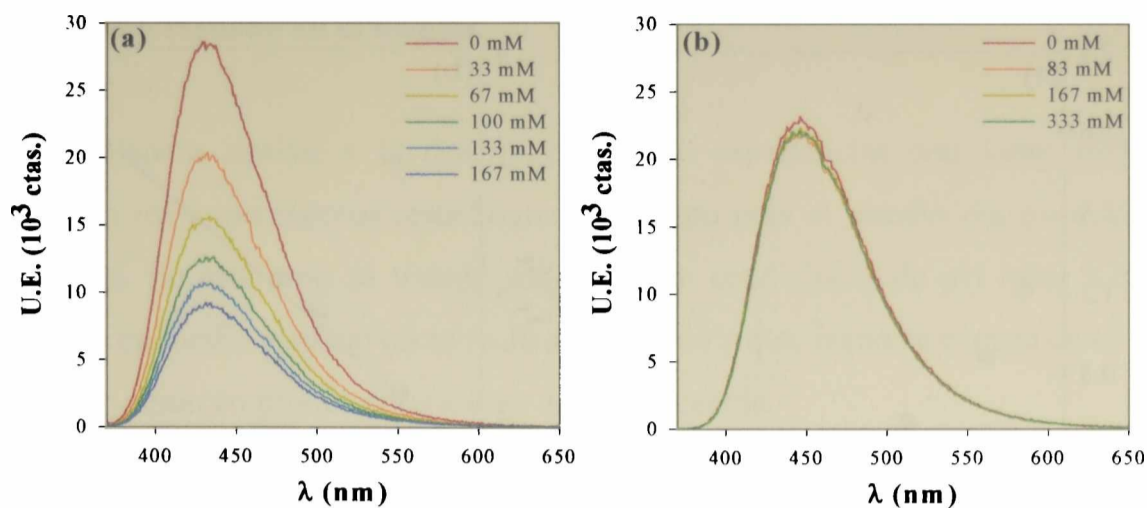


Figura 11.19: Espectros de emisión de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en presencia de aniones acetato. a) Soluciones ácidas (pH=6,2) y b) soluciones alcalinas (pH=10,5).

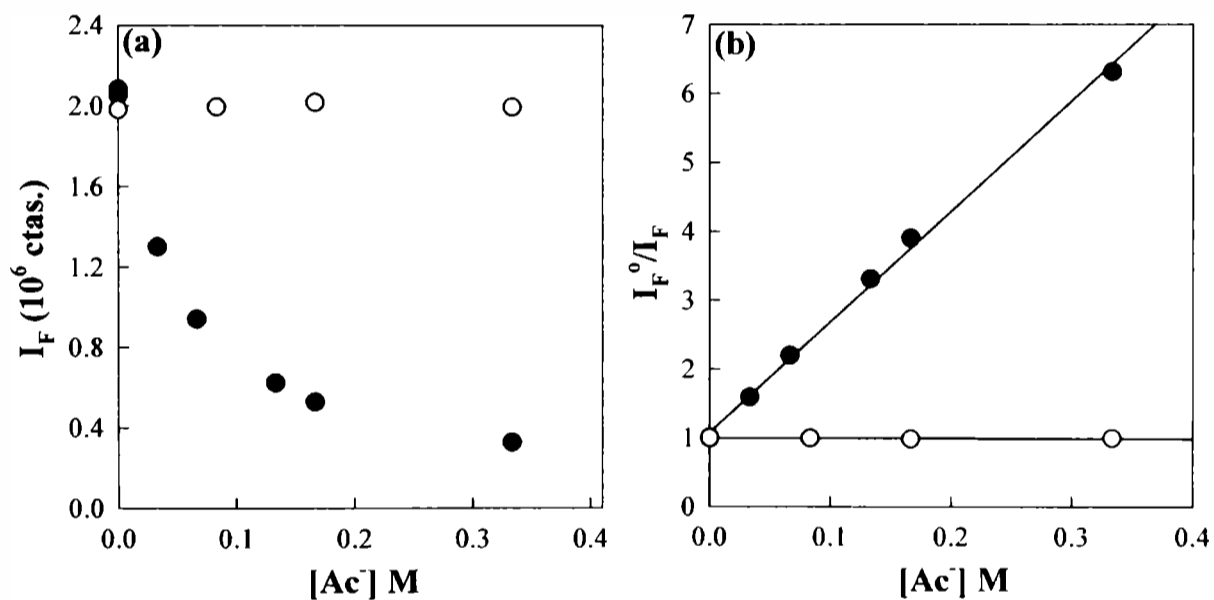


Figura 11.20: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

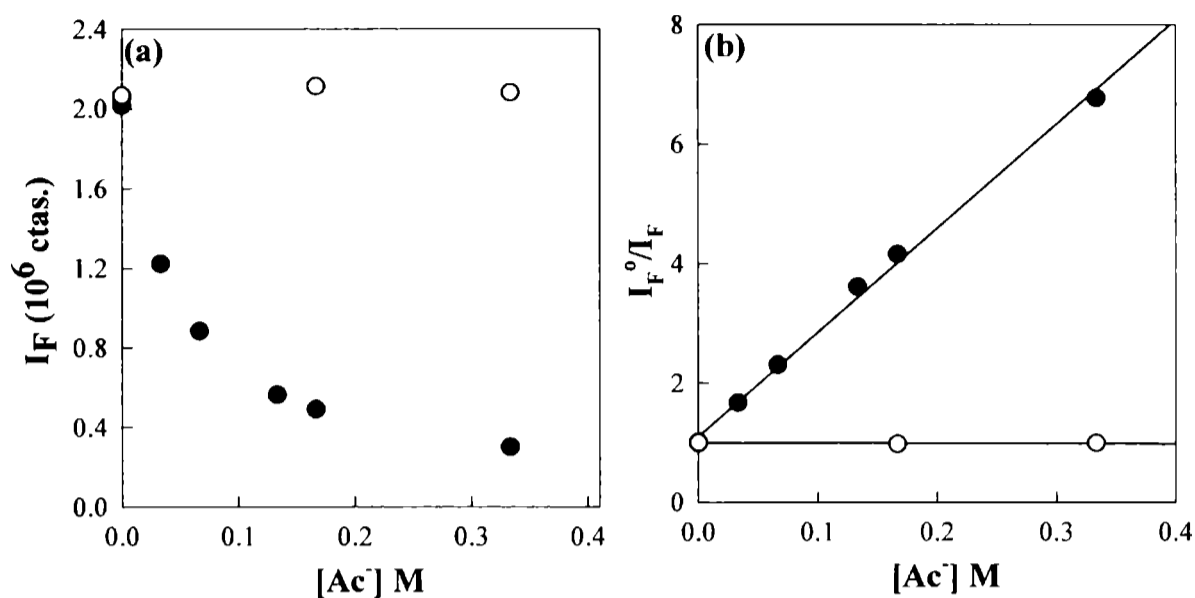


Figura 11.21: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

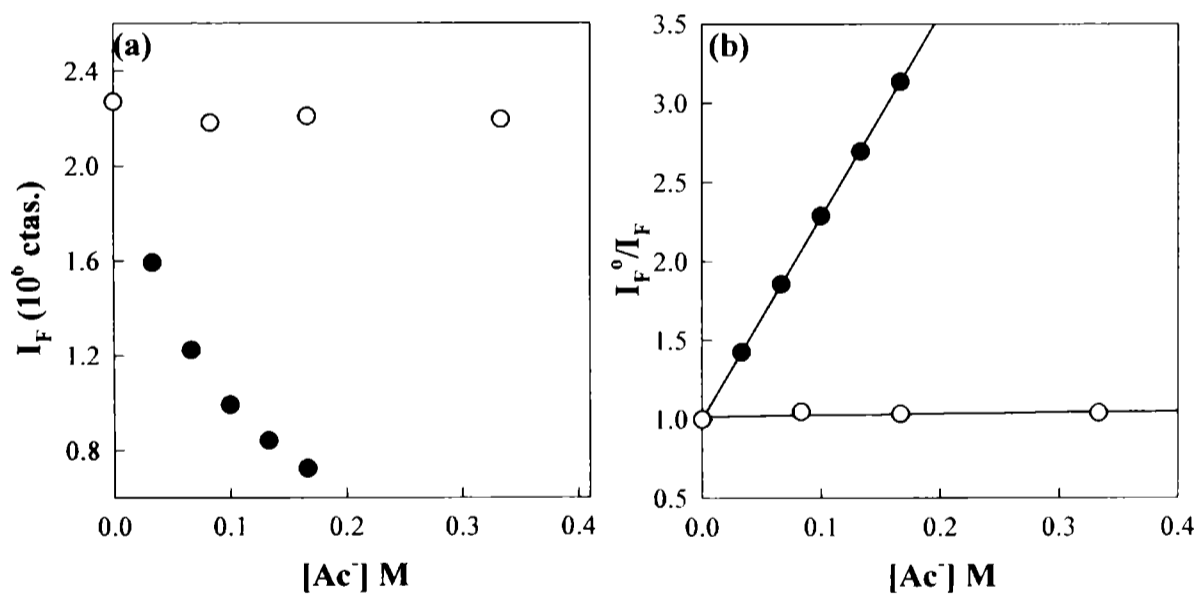


Figura 11.22: (a) Variación de la intensidad de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer. En ambos gráficos los puntos (●) corresponden a medidas realizadas a pH 6,2 y los puntos (○) a pH 10,5.

11.3.2 Estudio resuelto en el tiempo.

De manera similar a la descrita para las experiencias con iones fosfato, se desarrollaron los experimentos resueltos en el tiempo para el estudio del *quenching* con iones acetato. En este caso se trabajó solamente en condiciones de pH igual a 6,2. Las experiencias en medio alcalino no se realizaron debido a que, como se expuso en la sección anterior, este anión no produce *quenching* de fluorescencia.

En las figuras 11.23 a 11.25 se muestran las trazas obtenidas con soluciones de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M), respectivamente y los correspondientes ajustes no lineales. Puede apreciarse claramente que, en todos los casos, los τ_F disminuyen al aumentar la concentración del ión acetato. En las figuras 11.26 a 11.28 se muestra la dependencia de los τ_F de los tres compuestos estudiados con la concentración del ión y las correspondientes gráficas de Stern-Volmer.

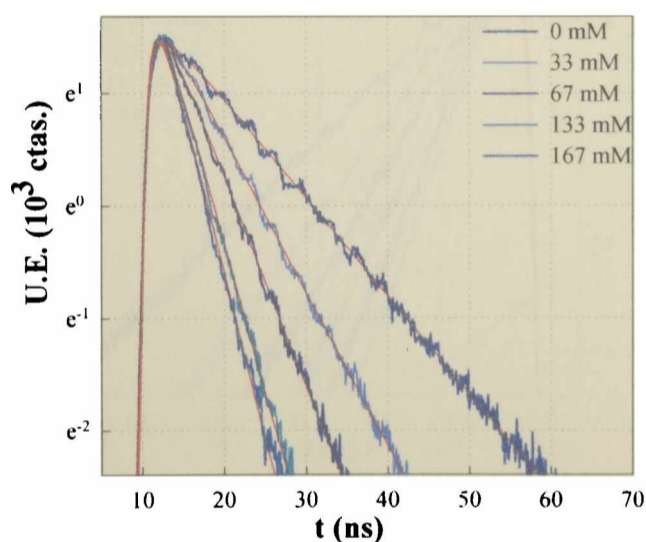


Figura 11.23: Variación de la emisión fluorescente de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH=6,2), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones acetato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.

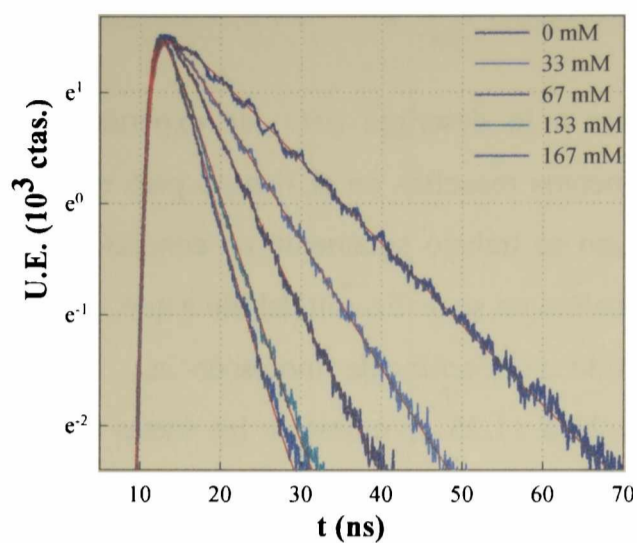


Figura 11.24: Variación de la emisión fluorescente de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH=6,2), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones acetato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.

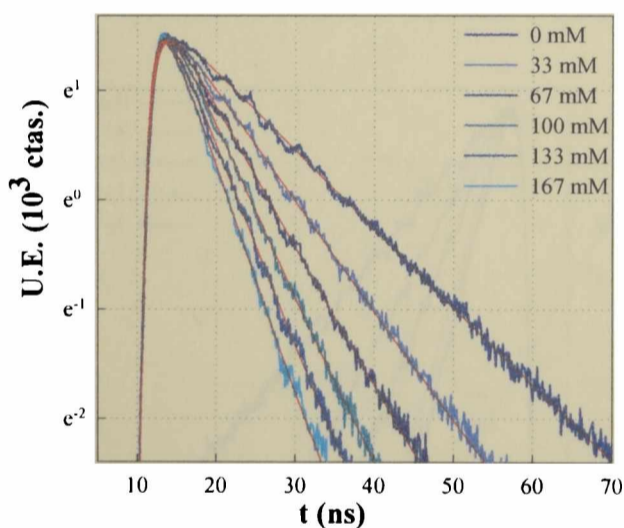


Figura 11.25: Variación de la emisión fluorescente de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH=6,2), en función del tiempo. Trazas obtenidas a distintas concentraciones de aniones acetato. Las líneas rojas representan los ajustes no lineales.

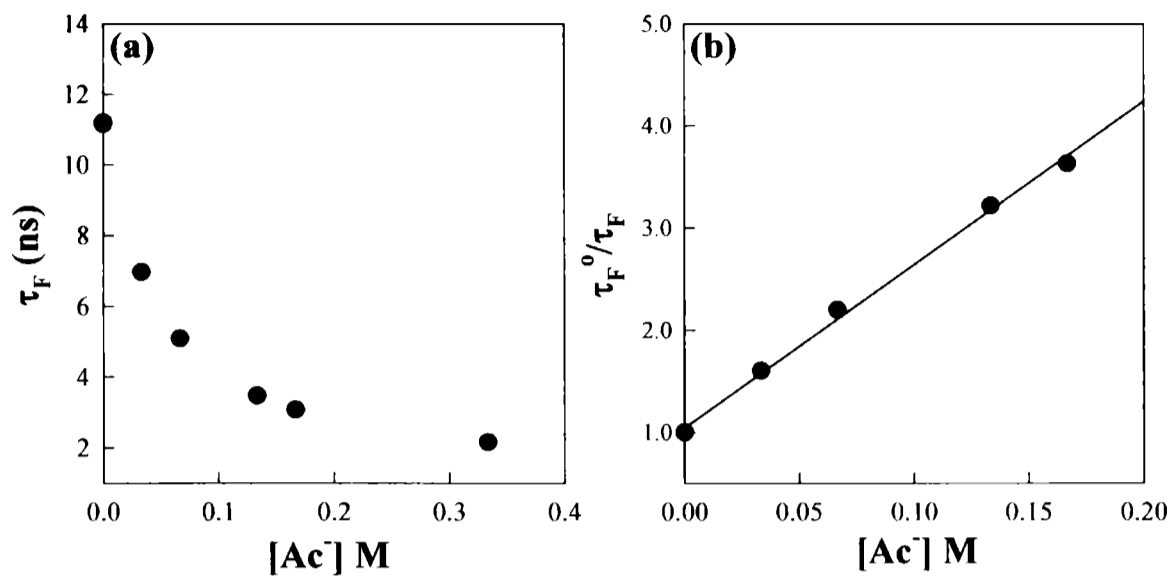


Figura 11.26: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de HPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH=6,2), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

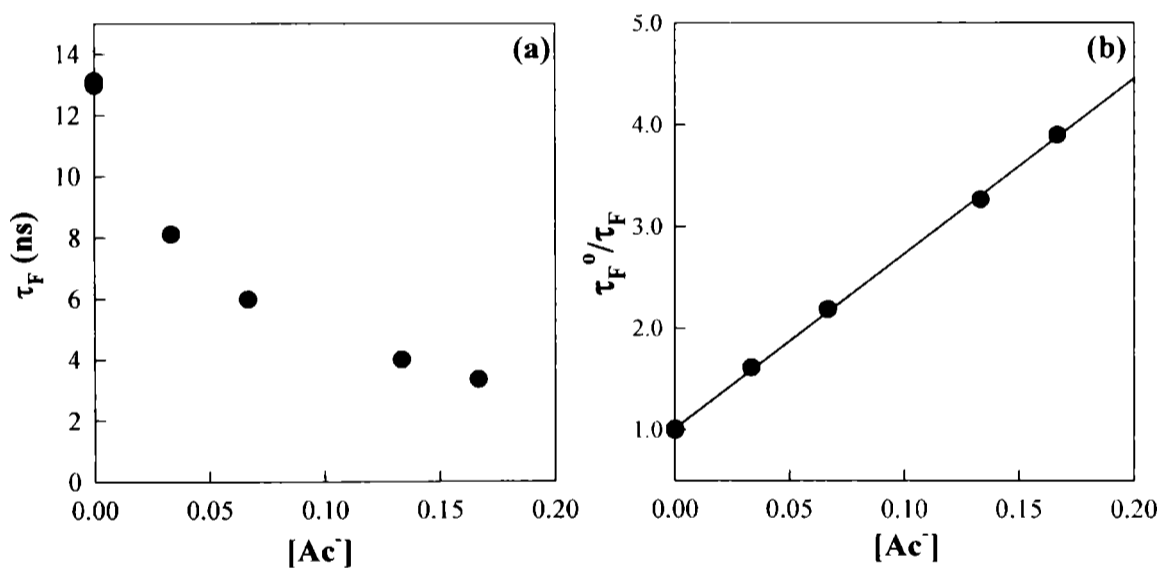


Figura 11.27: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de MPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH=6,2), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

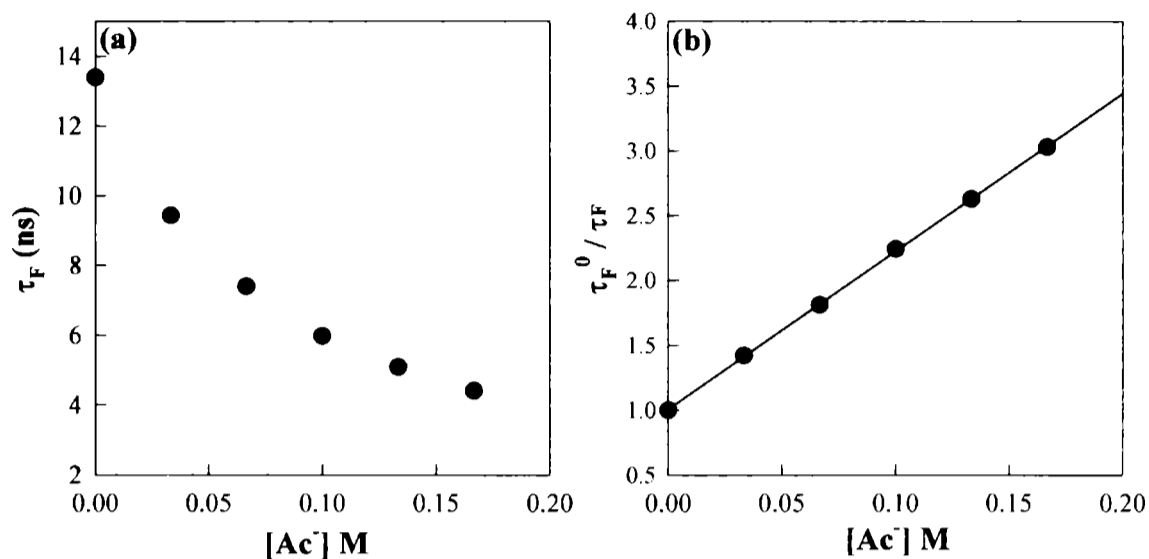


Figura 11.28: (a) Tiempos de vida de fluorescencia de DPT en solución acuosa ($2,5 \times 10^{-5}$ M; pH= 6,2), en función de la concentración de aniones acetato. (b) Gráfica de Stern-Volmer.

Con los valores de las constantes de K_{SV} y τ_F obtenidos, se calcularon las constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) por acetatos. Los valores de K_{SV} empleados para calcular estas constantes se obtuvieron promediando los valores obtenidos en las medidas realizadas en estado estacionario y resuelto en el tiempo. En la tabla 11.3 se listan los valores de K_{SV} de las medidas estacionarias y resueltas en el tiempo junto con las k_q calculadas para las distintas formas ácido-base de las tres pterinas estudiadas, con el anión acetato.

Compuesto	Forma ácida		
	K_{sv}^a (± 0.5)/M ⁻¹	K_{sv}^b (± 0.5)/M ⁻¹	$k_q/10^9$ M ⁻¹ s ⁻¹
HPT	16,1	16,0	1,4
MPT	19,1	17,1	1,3
DPT	12,8	12,2	1,0

Tabla 11.3: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) y constantes de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) de las formas ácidas de pterinas (pH=6,2) con aniones acetato. La desviación estándar correspondiente se indica entre paréntesis.

11.4 Quenching por aniones cloruros.

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en la I_F de las pterinas se llevaron a cabo estudios similares a los descritos para aniones acetato y fosfato, sobre soluciones conteniendo cada una de las tres pterinas ($2,5 \times 10^{-5}$ M) y aniones cloruro. Se eligieron concentraciones relativamente altas de cloruros, hasta 400 mM. Los resultados muestran que para ninguna de tres pterinas estudiadas se encontró un descenso apreciable de la emisión fluorescente (figura 11.29). Esto permite descartar cualquier efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia.

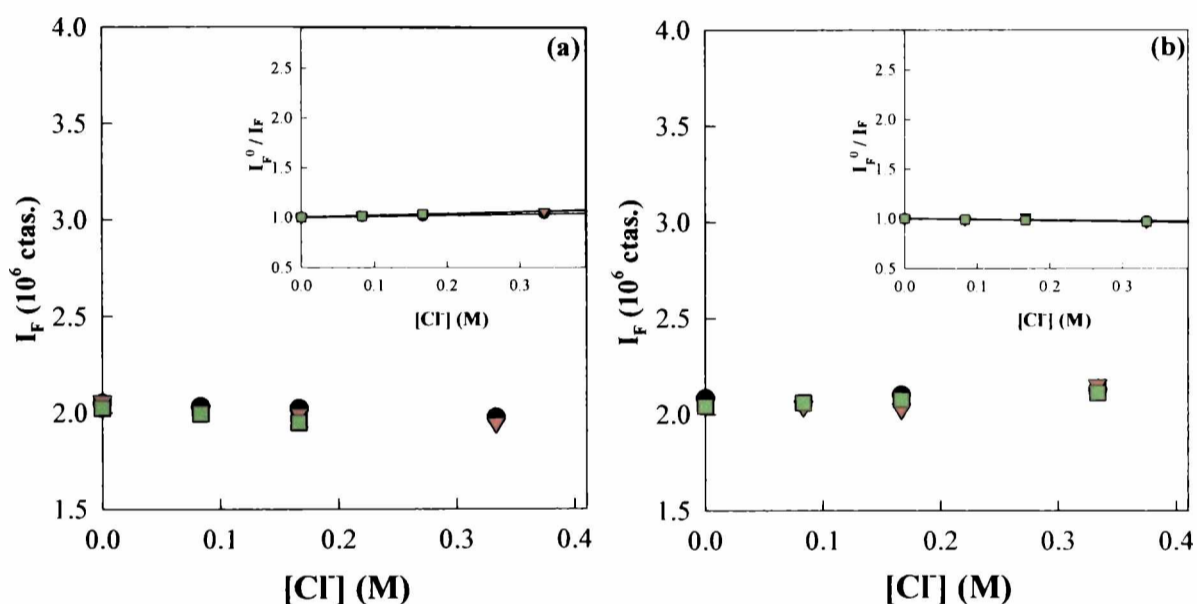


Figura 11.29: Variación de la intensidad de fluorescencia de soluciones de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en función de la concentración de aniones cloruro. Los IN-SET corresponden a las gráficas de Stern-Volmer. (a) pH 6,2 y la (b) pH 10,5. En ambos gráficos los puntos ● corresponden a medidas realizadas para HPT; los puntos ■ para DPT y los puntos ▼ para MPT.

11.5 Quenching por aniones sulfatos.

Adicionalmente, se estudió el efecto que tienen otros aniones sobre la intensidad de fluorescencia de las pterinas. Para esto, se llevaron a cabo estudios de emisión total, utilizando un espectrofluorómetro *Perkin-Elmer*. El diseño de los experimentos fue similar al descrito en la sección 11.2 y 11.3; las determinaciones se realizaron sobre soluciones de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en presencia de aniones sulfato (Na_2SO_4 *Anala R*). Se eligieron concentraciones relativamente altas de sulfatos, hasta 400 mM. Los resultados

muestran que para ninguna de tres pterinas estudiadas se encontró un descenso apreciable de la emisión fluorescente (figura 11.30).

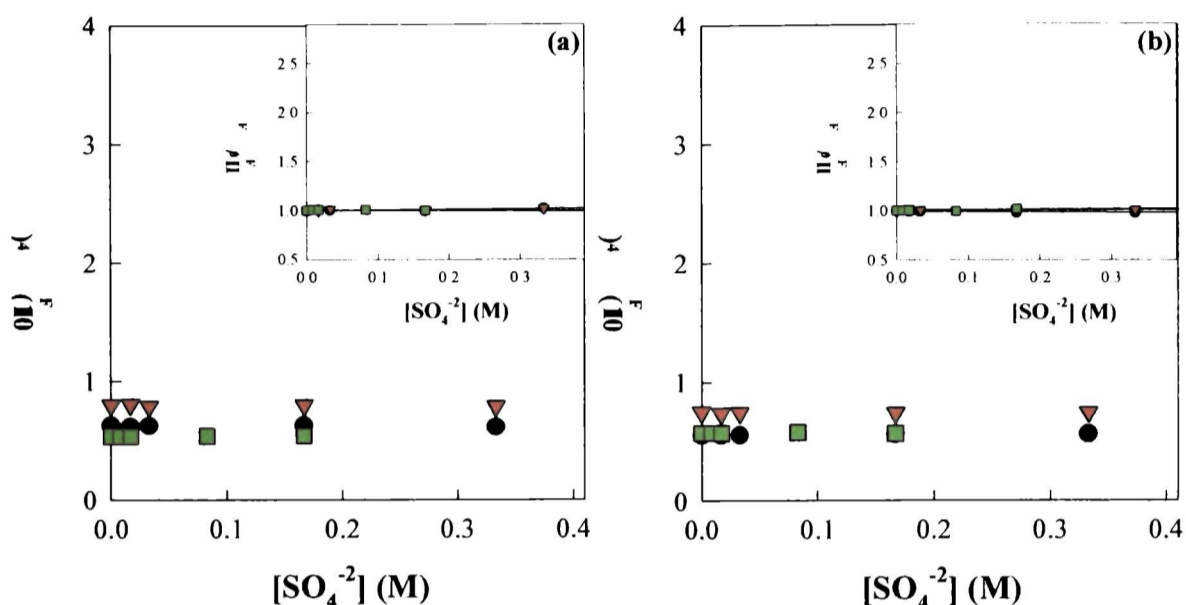


Figura 11.30: Variación de la intensidad de fluorescencia de soluciones de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en función de la concentración de aniones sulfatos. Los IN-SET corresponden a las gráficas de Stern-Volmer. (a) pH 6,2 y la (b) pH 10,5. En ambos gráficos los puntos ● corresponden a medidas realizadas para HPT; los puntos ■ para DPT y los puntos ▼ para MPT.

11.6 Quenching por aniones nitratos.

De la misma manera a lo expuesto en la sección anterior, se estudió el efecto que tienen los nitratos sobre la intensidad de fluorescencia de las pterinas. Al igual que para las determinaciones con anión sulfato, en esta sección se presentan resultados del estudio de emisión total de pterinas, llevado a cabo con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer. Las determinaciones se realizaron sobre soluciones acuosas de las tres pterinas estudiadas (HPT, MPT y DPT, todas de concentración $2,5 \times 10^{-5}$ M) en presencia de aniones nitrato (KNO_3 Merk). Para las condiciones experimentales de trabajo, se fijaron concentraciones de nitratos hasta 400 mM. Al igual que lo observado en los experimentos con aniones cloruros y sulfatos, estos resultados indican que los nitratos no producen un descenso apreciable de la emisión fluorescente de los tres compuestos estudiados (figura 11.31).

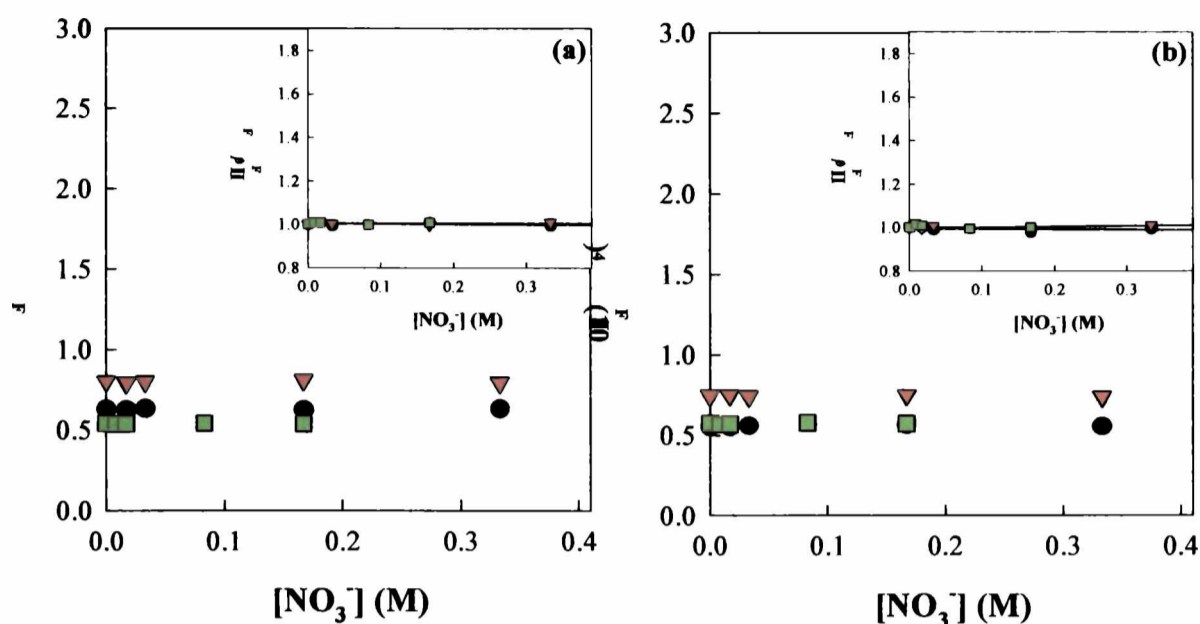


Figura 11.31: Variación de la intensidad de fluorescencia de soluciones de HPT, MPT y DPT ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en función de la concentración de aniones nitrato. Los IN-SET corresponden a las gráficas de Stern-Volmer. (a) pH 6,2 y la (b) pH 10,5. En ambos gráficos los puntos ● corresponden a medidas realizadas para HPT; los puntos ■ para DPT y los puntos ▼ para MPT.

11.7 Conclusiones.

Se estudió el *quenching* de fluorescencia de tres derivados pterínicos por OH^- . Se observó que la fluorescencia exhibida por las pterinas en soluciones fuertemente alcalinas ($\text{pH} \geq 11$) se ve fuertemente disminuida. En la tabla 11.1 puede apreciarse que, en todos los casos estudiados, los valores de K_{SV} obtenidos de los experimentos en estado estacionario son similares a los observados en los experimentos resueltos en el tiempo. Con estos resultados y teniendo en cuenta las consideraciones teóricas expuestas en el capítulo 6, podemos inferir que, en todos los casos estudiados, el proceso de *quenching* por OH^- observado es de tipo dinámico.

En la tabla 11.4 se muestran los valores de las constantes k_q de las formas alcalinas de pterinas con OH^- junto con los valores publicados en la literatura para otros derivados pterínicos [2,3]. Comparando los resultados, puede verse que para los tres compuestos estudiados, se observaron valores de k_q del mismo orden de magnitud a los observados para otros compuestos pertenecientes a la familia de las pterinas.

Estos resultados se tuvieron en cuenta para fijar las condiciones de trabajo en los experimentos de fotoquímica descritos en esta tesis. Aquellos experimentos que involucraron la forma alcalina del compuesto en estudio, se hicieron en condiciones de pH tales que el *quenching* por OH⁻ fuese despreciable (ver capítulos 15 al 17).

Compuesto	k_q /10 ⁹ M ⁻¹ s ⁻¹
^a PT	3,6
^a CPT	1,9
^a FPT	1,1
MPT	2,4
HPT	4,0
DPT	2,7

Tabla 11.4: Constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia (k_q) de las formas alcalinas de pterinas (pH ≥ 11) con aniones hidroxilo (HO⁻). ^a Valores publicados en la literatura ^[2,3]

De la misma manera, la emisión de fluorescencia de las formas ácidas de las pterinas es fuertemente disminuida por aniones fosfato y acetato. En las tablas 11.1 a 11.3 puede apreciarse que, en todos los casos estudiados, los valores de K_{SV} obtenidos de los experimentos en estado estacionario y resuelto en el tiempo, son similares. Estos resultados indican que el *quenching* de fluorescencia de las formas ácidas de pterinas con los aniones fosfato y acetato es de tipo dinámico.

Las formas alcalinas de los tres compuestos estudiados no presentan *quenching* de fluorescencia frente al anión acetato, en el intervalo de concentraciones estudiado. En la tabla 11.3 puede verse que, para el caso del anión fosfato, las K_{SV} son muy pequeñas comparadas con las observadas en medio ácido.

En la tabla 11.5 y 11.6 se muestran los valores de las constantes k_q con acetato y fosfato respectivamente. Adicionalmente, se adjuntan los valores publicados en la literatura para otros derivados pterínicos ^[1,3]. Comparando los resultados, puede observarse que en todos los casos, los valores de k_q de los tres compuestos estudiados (HPT, MPT y DPT) son del mismo orden de magnitud que los correspondientes a las demás pterinas ^[2,3].

Compuesto	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
^a PT	2,1
^a CPT	1,6
^a FPT	1,3
^a BPT	1,6
^a NPT	1,5
MPT	1,3
HPT	1,4
DPT	1,0

Tabla 11.5: Constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia (k_q) de las formas ácidas de pterinas (pH=6,2) con aniones acetato. ^a Valores publicados en la literatura ^[2,3]

Compuesto	$k_q / 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	
	pH = 6,2	pH = 10,5
^a PT	1,6	0,18
^a CPT	0,93	---
^a FPT	1,2	---
^a BPT	1,5	0,11
^a NPT	1,3	0,09
MPT	1,28	0,25
HPT	1,35	0,21
DPT	1,2	0,18

Tabla 11.6: Constantes bimolecular de *quenching* de fluorescencia (k_q) de las formas ácidas y alcalinas de pterinas (pH=6,2 y 10,5) con aniones fosfato. ^a Valores publicados en la literatura ^[2,3]

El *quenching* de fluorescencia observado es selectivo a la naturaleza de algunos iones (OH^- , PO_4^{3-} o Ac^-), ya que otros aniones como SO_4^{2-} , NO_3^- o Cl^- no lo producen.

El comportamiento diferente que presentan las formas ácidas y alcalinas de las pterinas estudiadas, en el proceso de *quenching* por los aniones fosfato y acetato, podría explicarse teniendo en cuenta la diferencia de cargas en las moléculas. Las formas ácidas y alcalinas de todas las pterinas estudiadas, poseen una carga neta de 0 y -1. Por otro lado, los aniones estudiados están cargados negativamente en todas las condiciones de pH ensayadas. De esta manera, las repulsiones electrostáticas entre las formas alcalinas de las pterinas y los aniones dificultan la interacción necesaria para que existan procesos de *quenching*. Esta repulsión no existe cuando se trabaja con la forma ácida o neutra de las pterinas.

Por otro lado, para la forma ácida de las pterinas, puede suponerse que el proceso de *quenching* de fluorescencia ocurre a través de un mecanismo de transferencia de protones. Esta hipótesis está basada en que los aniones provenientes de ácidos fuertes, como cloruro, sulfato y nitrato, no producen *quenching* de fluorescencia de las pterinas estudiadas. Por otro lado, los aniones que mostraron *quenching*, como fosfato y acetato son aniones provenientes de ácidos débiles (ácido fosfórico: $pK_{a1} = 2,16$; $pK_{a2} = 7,21$; $pK_{a3} = 12,32$ [4] ácido acético: $pK_a = 4,76$ [4]).

Estos resultados ponen en evidencia la interacción entre el estado singlete excitado de las pterinas estudiadas y algunos aniones. Puede apreciarse claramente que estos resultados se ven seriamente afectados tanto por las condiciones de pH de trabajo, como así también por la naturaleza química del sustituyente en la posición 6 del anillo pterínico.

Estos resultados hacen que sea imprescindible hacer algunas consideraciones a la hora de desarrollar futuros experimentos. Por ejemplo, para los estudios de fotoquímica que se describen en los capítulos siguientes, fue necesario trabajar en ausencia de soluciones reguladoras de pH que contengan los iones fosfato o acetato.

11.8 Referencias.

- [1] Lorente C., Capparelli A. L., Thomas A. H., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem.Photobiol.Sci.*, **3**, 167 (2004).
- [2] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E. *Photochem.Photobiol.Sci.*, **1**, 1 (2002).
- [3] "Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución acuosa." Tesis doctoral Bioqca. Carolina Lorente (2003).
- [4] Handbook of Chemistry and Physics, ed. D. R. Lide, CRC Press, Boca Raton, (1995), sect. 8.

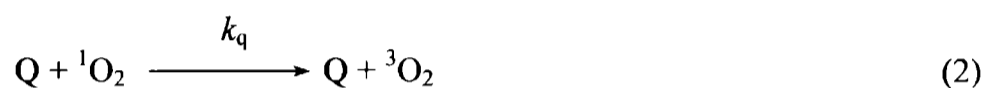
OXÍGENO SINGLETE

Es evidente que, debido a la amplia distribución de las pterinas en los sistemas biológicos, a su presencia en zonas expuestas a la luz solar, y, en particular, a su acumulación en la piel de los seres humanos afectados de enfermedades tales como vitiligo, es interesante investigar la capacidad que tienen estos compuestos, para producir las diferentes especies reactivas del oxígeno (ERO), y en particular oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Por otro lado, el estudio de la producción de especies reactivas aporta información que puede ser útil para dilucidar los mecanismos de reacción involucrados en fotooxidaciones y reacciones fotosensibilizadas. En el capítulo 4 se resumió la información general existente en la literatura sobre la producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$ por pterinas en solución acuosa y se explicó con mayor detalle el estudio sistemático realizado por Thomas *et al.* sobre 6 compuestos pertenecientes a esta familia. En este estudio se demostró que 5 (PT, FPT, CPT, BPT y NPT) de los 6 derivados pterínicos, son buenos sensibilizadores de $^1\text{O}_2$. El AF, por su parte, presenta una producción de $^1\text{O}_2$ prácticamente nula, siendo este compuesto el único derivado pterínico estudiado hasta el momento con esta característica.

En este capítulo se presentan resultados de un estudio sistemático realizado sobre otros cuatro derivados pterínicos: 6-hidroximetilpterina (HPT), 6-metilpterina (MPT), 6,7-dimetilpterina (DPT) y ácido N-metil fólico (MAF). Los dos primeros compuestos se eligieron porque en este trabajo de tesis se estudió la fotoquímica de los mismos (capítulos 14, 15 y 17); el tercero se escogió porque está relacionado estructuralmente con los dos primeros; y, el último porque presenta un sustituyente relacionado químicamente con el AF. Se presentarán los valores de las constantes de velocidad de *quenching* total (k_T) de oxígeno singlete y los valores de los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ).

12.1 *Quenching* total de oxígeno singlete por pterinas en solución acuosa.

Si una sustancia en solución es capaz de secuestrar o atrapar $^1\text{O}_2$, se deben considerar entonces, tanto la vía de reacción química como la vía de *quenching* físico (ecuación 1 y 2, respectivamente).



donde: k_r es la constantes de velocidad de *quenching* químico y k_q es la constante de velocidad de *quenching* físico. De esta manera, k_T (la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por Q) queda definida como la suma de los valores de k_r y k_q ($k_T = k_r + k_q$). En el capítulo 8 se describe detalladamente el procedimiento utilizado para la determinación de la constante de velocidad de *quenching* total (k_T) de $^1\text{O}_2$ por pterinas en solución acuosa.

Tal como se detalló en el capítulo 8, el método empleado para la determinación de los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ) requiere conocer cual es la cantidad de $^1\text{O}_2$ generado ($^1\text{O}_2$ total) que se desactiva con el propio sensibilizador. Es decir, es necesario conocer el valor de k_T del sensibilizador estudiado. En los experimentos para determinar el Φ_Δ , es la pterina estudiada la que actúa como sensibilizador de $^1\text{O}_2$. Por tal motivo, se realizó el estudio de la determinación de k_T para las cuatro pterinas (HPT, MPT, DPT y MAF). Las medidas se realizaron en soluciones aireadas, en medio alcalino (pD=10,5) y empleando rosa de bengala (RB) como sensibilizador. La longitud de onda de irradiación fue 547 nm. De los espectros de absorción puede verse que en esa región del espectro, ninguna de las pterinas estudiadas absorbe la radiación incidente. Para el desarrollo de la experiencia se mantuvo la concentración del sensibilizador (RB) constante y se varió la concentración de la pterina en estudio (*quencher*) en cada caso. En la figura 12.1, se muestran las señales obtenidas en las series de medidas correspondientes a los distintos compuestos estudiados. Puede observarse que al aumentar la concentración de pterinas, la señal de $^1\text{O}_2$ disminuye. Esto significa que el $^1\text{O}_2$ es desactivado por la presencia de pterinas.

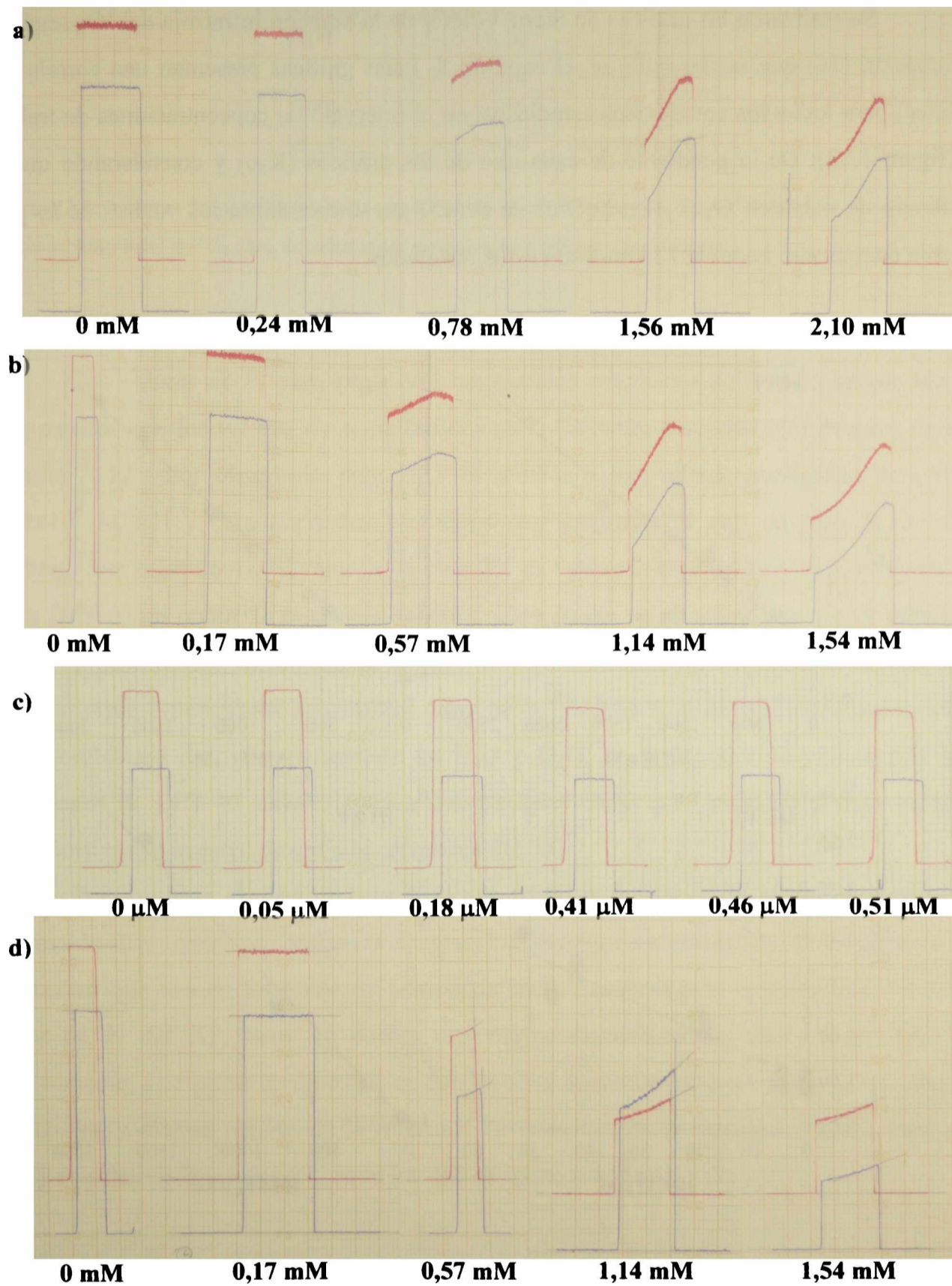


Figura 12.1: *Quenching* de $^1\text{O}_2$ por pterinas. En cada caso se muestra la absorbancia a 547 nm de la solución de RB y la concentración pterina. (a) HPT ($A^{547}=1,0$). (b) MPT ($A^{547}=1,0$). (c) DPT ($A^{547}=1,5$). (d) MAF ($A^{547}=1,5$).

Se realizaron las gráficas de Stern-Volmer de la emisión infrarroja del $^1\text{O}_2$ según la ecuación (16) que se describió en el capítulo 8. Estas gráficas presentan una correlación lineal para todos los compuestos estudiados, en el intervalo de concentraciones de trabajo (figura 12.2). De la pendiente de cada uno de los gráficos (K_{SV}) y considerando que el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ (τ_Δ) en D_2O es de $62(\pm 3)$ μs , se calcularon los valores de k_T para cada compuesto. La tabla 12.1 muestra estos resultados.

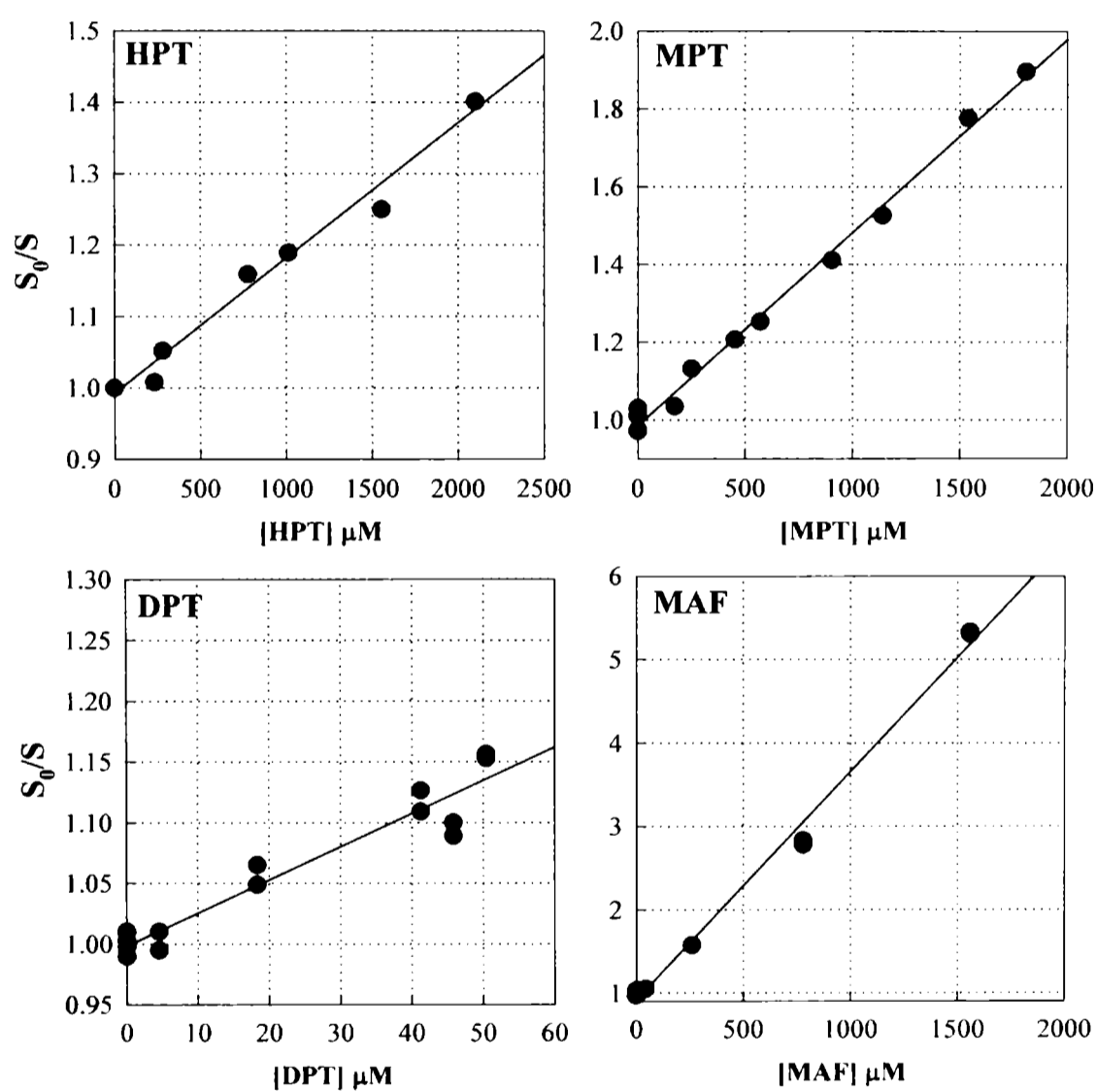


Figura 12.2: Gráficas de Stern-Volmer del *quenching* de la emisión infrarroja del $^1\text{O}_2$ por pterinas en D_2O (Sensibilizador: RB, $\lambda_{\text{EX}}=547$ nm; $\text{pD}=10,5$).

Compuesto	K_{SV} (μM^{-1})	k_T^a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
HPT	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(3,1 \pm 0,4) \times 10^6$
MPT	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(8,0 \pm 0,6) \times 10^6$
DPT	$(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(4 \pm 1) \times 10^7$
MAF	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(4,4 \pm 0,4) \times 10^7$

Tabla 12.1: Valores de pendientes de las gráficas de Stern-Volmer (K_{SV}) y de constantes de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T), en soluciones aireadas de derivados pterínicos.

Los valores de k_T para los cuatro compuestos estudiados son relativamente altos comparados con los valores de k_T publicados en la literatura para otros compuestos de la familia^[1]. El valor observado para HPT es similar a los valores publicados para PT ($2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y para derivados pterínicos con sustituyentes con un solo átomo de carbono (ver capítulo 4). El valor de k_T de MPT es ligeramente superior y el k_T observado para DPT es un orden de magnitud superior. Este punto, se abordará con mayor detalle, sobre la base de los resultados del siguiente capítulo. Aquí es importante destacar el elevado error experimental asociado al valor de k_T^{DPT} . Esto se debe a la extremadamente baja solubilidad de dicho compuesto en H_2O y D_2O , lo que impide la preparación de soluciones de DPT lo suficientemente concentradas como para producir disminuciones significativas en la señal de emisión infrarroja del $^1\text{O}_2$.

Por otro lado, el valor de k_T medido para MAF es similar al del AF (ver capítulo 4). El tipo de sustituyente le confiere una capacidad alta para secuestrar $^1\text{O}_2$. En el capítulo 4 se mostró que una de las hipótesis propuestas en la literatura para explicar este elevado valor de k_T del AF, tiene en cuenta una mayor reactividad del AF con el $^1\text{O}_2$ ^[1,2]. Nuevamente, este punto se discutirá en detalle en el siguiente capítulo, luego de presentar los correspondientes valores de la constante de velocidad de la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y seis derivados pterínicos, entre los que se encuentran MAF y AF.

12.2 Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete por pterinas.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) por HPT, MPT, DPT y MAF, en soluciones equilibradas con aire preparadas en D_2O , monitoreando la emisión de luz infrarroja del 1O_2 . Las pterinas se excitaron con luz de 367 nm (ver capítulo 8, sección 8.1.2).

Como se mostró en el capítulo 10 todas las pterinas estudiadas, excepto MAF, tienen rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) relativamente altos. Por ello es necesario investigar posibles interferencias de la emisión fluorescente de las pterinas en el infrarrojo cercano. Debido a esto se realizaron experimentos (controles) en soluciones saturadas en Ar. En estas condiciones, como no hay O_2 en el medio, en caso de detectarse emisión de luz infrarroja, la misma es asignada a la sustancia en estudio. Los controles se realizaron en medio ácido (pD=5,5) y medio alcalino (pD=10,0). En las condiciones de trabajo en las que se realizaron las medidas de Φ_{Δ} , no se detectó luminiscencia a 1270 nm para ninguno de los compuestos estudiados.

Las determinaciones de Φ_{Δ} se realizaron para las formas ácidas (pD=5,0-6,0) y para las formas alcalinas (pD=10-10,5) de los cuatro derivados pterínicos estudiados. Además se realizaron determinaciones en soluciones fuertemente alcalinas (pD>12). Como sensibilizadores de referencia se utilizó 1H-fenalen-1-ona o fenalenona ($\lambda_{EX}=367$ nm) para los experimentos en medio ácido y RB ($\lambda_{EX}=547$ nm) para los experimentos en medio alcalino.

Se detectó emisión infrarroja por 1O_2 significativa para HPT, MPT y DPT, tanto en medio ácido como alcalino. Por el contrario, para MAF se observó una emisión extremadamente baja. Los valores de Φ_{Δ} de las cuatro pterinas en medio alcalino se calcularon con la siguiente ecuación, deducida en el capítulo 8:

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \cdot \frac{P_0^R}{P_0^S} \cdot \frac{(k_d + k_T^S [S])}{k_d} \quad (3)$$

donde Se^S y Se^R es la señal del sensibilizador y de la referencia respectivamente; k_T^S es la constante bimolecular de *quenching* total de 1O_2 por el sensibilizador; P_0 es la intensidad de la luz incidente a las longitudes de onda de excitación de la muestra y la referencia

($\lambda^S=367$ nm y $\lambda^R=547$ nm); Φ_{Δ}^S y Φ_{Δ}^R es el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 del sensibilizador y de la referencia, respectivamente.

Como se explicó en el capítulo 8, para el cálculo de los valores de Φ_{Δ} debe conocerse el valor de k_T^S del sensibilizador utilizado (tabla 12.1). Bajo las condiciones aquí utilizadas para la determinación de los Φ_{Δ} en medio alcalino, k_d resulta mucho mayor que el producto $k_T^S[S]$ para todos los compuestos ($k_d/(k_T^S[S]) \geq 20$), excepto para DPT y MAF ($k_d/(k_T^S[S]) \approx 5$). De esta manera, se pudieron calcular los valores de Φ_{Δ} para las formas alcalinas de las cuatro pterinas. Estos resultados se exponen en la tabla 12.2.

El valor de k_T^S no fue medido en medio ácido; por ello, los valores de Φ_{Δ} que se listan en la tabla 12.2 para las formas ácidas, son valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete aparentes (Φ_{Δ}^{ap}), calculados a partir de la siguiente ecuación, deducida en el capítulo 8:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^R \cdot \frac{Se^S}{Se^R} \quad (4)$$

donde Se^S y Se^R es la señal del sensibilizador y de la referencia ($\lambda^S=\lambda^R=367$ nm); Φ_{Δ}^R es el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 de la referencia y Φ_{Δ}^{ap} es:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^S \cdot \frac{k_d}{(k_d + k_T^S [S])} \quad (5)$$

Sin embargo, se puede asumir que los valores de k_T^S no cambian drásticamente con el pH, o pueden ser menores como se observa para otros compuestos^[3,4]. Por ello puede considerarse que los Φ_{Δ}^{ap} son valores muy cercanos a los Φ_{Δ} reales.

Compuesto	Φ_{Δ}^{ap} (pD=5,5)	Φ_{Δ} (pD=10,5)	Φ_{Δ} (pD=12,1)
HPT	0,15±0,02	0,21±0,03	0,10±0,02
MPT	0,10±0,03	0,14±0,02	0,07±0,02
DPT	0,04±0,02	0,10±0,02	0,06±0,03
MAF	no detectable	(1,3±0,2)×10 ⁻³	---

Tabla 12.2: Rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 a diferentes pH.

Una de las primeras observaciones que surge al analizar la tabla 12.2, es que los compuestos estudiados presentan los valores de Φ_{Δ} más bajos, comparados con los valores publicados en la literatura para otros compuestos de la familia^[1,2] (ver tabla 4.6). También puede apreciarse la gran diferencia entre el valor de Φ_{Δ} del MAF con el que presentan el resto de las pterinas estudiadas. El Φ_{Δ} medido para el MAF sólo es comparable con el Φ_{Δ} observado para el AF. Estos dos compuestos presentan una estructura química similar (ver figura 1.4), lo que podría explicar la similitud en el comportamiento. Fue sugerido^[1,2] que el estado singlete excitado del AF se desactiva rápidamente por vías no radiativas. De esta manera, se reduce la posibilidad de cruzamiento inter-sistemas para dar estados tripletes, que puedan realizar transferencia de energía al O_2 . Para los dos compuestos (MAF y AF), el sustituyente de la posición 6 es mucho más grande que el sustituyente en las demás pterinas estudiadas, y de esta manera, presentan muchas posibilidades de movimientos. Esta característica podría introducir a los estados electrónicos gran cantidad de estados vibro-rotacionales, lo cual podría favorecer la desactivación por procesos no radiativos.

Puede observarse en la tabla 12.2, al igual que para otros derivados pterínicos^[1,2], que la capacidad de producción de 1O_2 de cada pterina es función del pD. En términos generales, las formas alcalinas tienen mayores Φ_{Δ} que las correspondientes formas ácidas. Esta generalización, no puede hacerse con el MAF debido a que los Φ_{Δ} medidos son muy pequeños. Los resultados obtenidos para los cuatro compuestos estudiados, se pueden analizar teniendo en cuenta los resultados de fluorescencia presentados en el capítulo 10. En dicho capítulo se mostró que los valores de Φ_F de las formas ácidas son mayores que los de las correspondientes formas alcalinas, mientras que las constantes de velocidad intrínseca (k_F^0) son equivalentes (considerando el error experimental). Se sugirió, entonces, que en las formas alcalinas debe ser más eficiente la desactivación de los estados excitados singletes (S_1) por otra u otras vías diferentes a la emisión fluorescente. El análisis de los valores de Φ_{Δ} obtenidos permite sugerir que en las formas alcalinas el cruzamiento inter-sistemas podría ser mayor que en las ácidas, justificando de esta forma, mayores Φ_{Δ} en las formas alcalinas y mayores Φ_F en las formas ácidas.

Se investigó la producción de 1O_2 en soluciones fuertemente alcalinas. Para ello se determinaron los Φ_{Δ} de los cuatro compuestos estudiados, en soluciones aireadas de pD

igual a 12,1. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 12.2. Puede apreciarse claramente que los valores obtenidos en estas condiciones son notablemente menores que los obtenidos a pD 10,5. Una vez más resulta interesante relacionar estos resultados con el estudio de la fluorescencia de las pterinas. Estudios previos^[1,5] y los datos presentados en el capítulo 11, muestran que a pH superiores a 11 la fluorescencia de las pterinas por excitación a 350 nm se desactiva muy eficientemente por iones hidroxilo (HO^\cdot) y que este *quenching* es un proceso dinámico. Puede deducirse, entonces, que la desactivación del estado excitado singlete (S_1) por hidroxilo reduce la eficiencia del cruzamiento inter-sistemas (Φ_{ISC}) y, consecuentemente, el Φ_Δ .

Adicionalmente, se realizaron determinaciones de Φ_Δ en soluciones saturadas con O_2 para HPT, MPT y DPT. Para ello se burbujearon con O_2 las soluciones a analizar (durante 15 minutos) y luego se determinaron los Φ_Δ . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.3.

Comparando los dos conjuntos de datos, puede apreciarse que el Φ_Δ , en las condiciones experimentales empleadas, es independiente de la concentración de O_2 para todos los casos analizados. Esto sugiere que los estados excitados tripletes son desactivados completamente por el O_2 , aún a la concentración correspondiente a soluciones aireadas. Por consiguiente podría considerarse que los Φ_Δ obtenidos son una buena aproximación a los valores correspondientes a los rendimientos cuánticos de cruzamiento inter-sistemas (Φ_{ISC}).

Compuesto	Φ_Δ (pD=5,5)	Φ_Δ (pD=10,5)
MPT	0,11±0,02	0,13±0,02
HPT	0,13±0,02	0,19±0,02
DPT	0,02±0,03	0,08±0,03

Tabla 12.3: Rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ en soluciones saturadas con O_2 .

12.3 Conclusiones.

En este capítulo, se determinaron los valores de las constantes de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ por pterinas (k_T). En particular, se estudiaron los compuestos HPT, MPT, DPT y MAF, en ambas condiciones de pH (6,2 y 10,5). Los valores de k_T observados son relativamente altos comparados con los valores de k_T publicados en la literatura para otros compuestos pertenecientes a la familia de las pterinas^[1]. El análisis de estos resultados se abordará con mayor detalle en el capítulo siguiente.

Por otra parte, se estudió la capacidad que tienen ambas formas ácido-base de HPT, MPT, DPT y MAF de generar $^1\text{O}_2$, bajo irradiación con luz UV-A. Los resultados aquí expuestos, muestran que todos los compuestos estudiados, excepto el MAF, tienen una elevada eficiencia para sensibilizar $^1\text{O}_2$. Estos resultados concuerdan con los resultados previos, publicados por Neverov *et al.*^[6], y con los resultados obtenidos por los autores Thomas *et al.*^[1], (ver capítulo 4).

12.4 Referencias.

- [1] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Martínez C. G., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 245 (2003).
- [2] "Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución acuosa." Tesis doctoral Bioqca. Carolina Lorente, (2003).
- [3] García N. A., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **22**, 185 (1994).
- [4] Luiz M., Soltermann A. T., Biasutti A. y García N. A., *Can. J. Chem.*, **74**, 49 (1995).
- [5] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 1 (2002).
- [5] Neverov K. V., Mironov E. A., Lyudnikova T. A., Krasnovsky Jr A. A. Y Kritsky, M. S., *Biokhim*, **61**, 1627 (1996).

REACCIÓN QUÍMICA ENTRE EL OXÍGENO SINGLETE Y LAS PTERINAS.

Medir la reactividad de las pterinas frente al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) resulta interesante desde varios puntos de vistas. Por un lado, debido a que ha sido demostrado que muchos derivados pterínicos generan $^1\text{O}_2$ fotoquímicamente^[1,2] (ver capítulo 12), la reacción entre esta especie reactiva y las pterinas debe ser tomada en cuenta como posible vía de fotooxidación. Más aún, los resultados de experimentos indirectos, que utilizaron secuestradores selectivos de $^1\text{O}_2$, sugirieron la participación de esta especie reactiva como intermediario activado en la fotooxidación del ácido fólico (AF), tanto en medio ácido como en medio alcalino^[3,4]. Otra evidencia en este sentido, que ha sido publicada en la literatura, es el elevado valor de la constante de velocidad de *quenching* total (k_T) de este compuesto, comparado con el k_T observado para los demás derivados pterínicos estudiados^[2,5]. Por otro lado, el estudio de la reactividad del $^1\text{O}_2$ con las pterinas es interesante desde el punto de vista bioquímico y biomédico. Es bien conocida la amplia distribución de las pterinas en distintos sistemas biológicos, por lo tanto es interesante saber si estos compuestos son capaces de secuestrar especies reactivas de oxígeno y de esta manera actuar como anti-oxidantes.

13.1 Determinación de k_r en medio alcalino.

En el capítulo 8 se describe, detalladamente, el procedimiento utilizado para la determinación de la constante de velocidad de la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y las pterinas (k_r). Para realizar estos experimentos, se prepararon grupos de soluciones conteniendo el derivado pterínico a ensayar, junto con rosa de bengala (RB) que actúa como sensibilizador de $^1\text{O}_2$. Luego se ajustó el pD o pH, según corresponda, en un valor cercano a 10,5. Las soluciones se irradiaron excitando en la banda de absorción del RB ($\lambda_{EX}=547\text{nm}$) a distintos tiempos. Cada muestra irradiada se analizó

espectrofotométricamente y por HPLC. El análisis cinético del consumo del compuesto en estudio como una función del tiempo de irradiación, realizado por HPLC, permitió calcular el valor de k_r .

El análisis espectral aplicado a los experimentos que se mostraran en la sección 13.1, difiere ligeramente del análisis general detallado en el capítulo 9. Debido a ello, antes de presentar los resultados, se explicarán tales diferencias y las razones por las cuales se modificó la técnica general.

Como se mencionó anteriormente, en este capítulo se muestran resultados de experimentos en los cuales se irradiaron soluciones con RB como sensibilizador y un derivado pterínico. A la longitud de onda de irradiación (547 nm) absorbe el RB pero no el compuesto en estudio. El sensibilizador genera $^1\text{O}_2$ y éste reacciona con el compuesto pterínico. Esta reacción es la que se quiere estudiar mediante el análisis espectrofotométrico y por HPLC. Sin embargo, en estos experimentos, RB se fotoliza lentamente. Esta reacción se hace más evidente, cuanto mayor es el tiempo de irradiación, y esto produce modificaciones espectrales. El análisis espectral a partir de los espectros DE pretende evaluar la reacción entre el derivado pterínico y el $^1\text{O}_2$ y no la fotólisis del RB.

Controles realizados sobre soluciones que solo contenían el sensibilizador revelaron que la fotólisis del RB genera productos que no absorben a λ mayores de 220 nm^[6]. Por consiguiente, para obtener los espectros DE mostrados en este capítulo se procedió de la siguiente manera: a los espectros de las soluciones correspondientes a los diferentes tiempos de irradiación se les restó el espectro correspondiente al RB. Luego se obtuvieron los espectros DE de la manera habitual, detallada en el capítulo 9. En consecuencia, los espectros DE que se presentaron muestran las diferencias espectrales sólo de la reacción de la pterina estudiada con el $^1\text{O}_2$.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de los valores de k_r para la forma alcalina de los seis derivados pterínicos estudiados (PT, MPT, DPT, HPT, AF y MAF). Los experimentos se realizaron usando D_2O como solvente (y en algunos casos H_2O) como solvente. Adicionalmente, se hace un análisis detallado de los espectros de absorción y de los cromatogramas de las soluciones irradiadas, con el objeto de obtener mayor información respecto de los posibles productos y de los mecanismos de reacción.

Pterina (PT). Para este estudio, se prepararon soluciones de PT en D₂O (400 μM; pD=10,5) y RB ($A^{547} = 1,5$) y se irradiaron ($\lambda_{EX}=547\text{nm}$) a distintos tiempos. En la figura 13.1a se muestra la evolución de la concentración de PT con el tiempo de irradiación. En la figura 13.1b se graficó $f([PT])$ en función del tiempo de irradiación (donde $f([PT])=\ln([PT]/[PT]_0) - (k_r^{PT}/k_d) ([PT]_0-[PT])$; ver capítulo 8), y a partir de la pendiente se calculó el valor de k_r . En las condiciones experimentales de trabajo, se obtuvo un valor de $(2,5\pm 0,3)\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Teniendo en cuenta el valor de k_T ($k_r + k_q$) publicado en la literatura^[1], puede apreciarse que k_r^{PT} es un orden de magnitud menor que la correspondiente constante de *quenching* físico ($k_q^{PT} = (2,6\pm 0,3)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

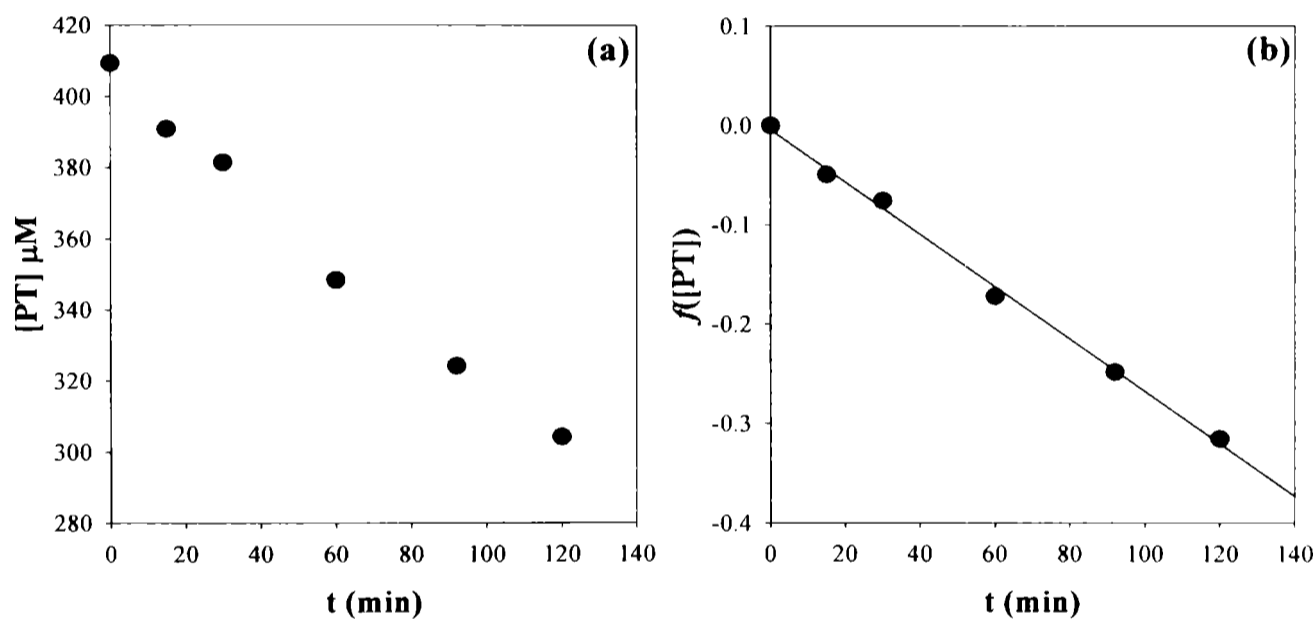


Figura 13.1: Oxidación fotosensibilizada de PT en solución alcalina en D₂O ([PT]₀=400 μM; pD=10,5), equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{EX}=547 \text{ nm}$). La concentración de PT se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de PT con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([PT])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8).

El análisis de los espectros de absorción de las soluciones irradiadas muestra pequeños cambios en función del tiempo de irradiación (figura 13.2a). Se aprecia una disminución de las bandas de absorción características de las pterinas, junto con un pequeño incremento en la absorción en la región del espectro comprendida entre 400 y 500 nm. Estos cambios pueden apreciarse, con más detalle, en los espectros DE presentados en

la figura 13.2b. Estos resultados, indican por un lado, que el $^1\text{O}_2$ reacciona directamente con el doble anillo de PT, generando así productos de naturaleza química no-pterínica. Por otro, indican la presencia de, al menos, un producto capaz de absorber en la región del espectro cercana a 450 nm.

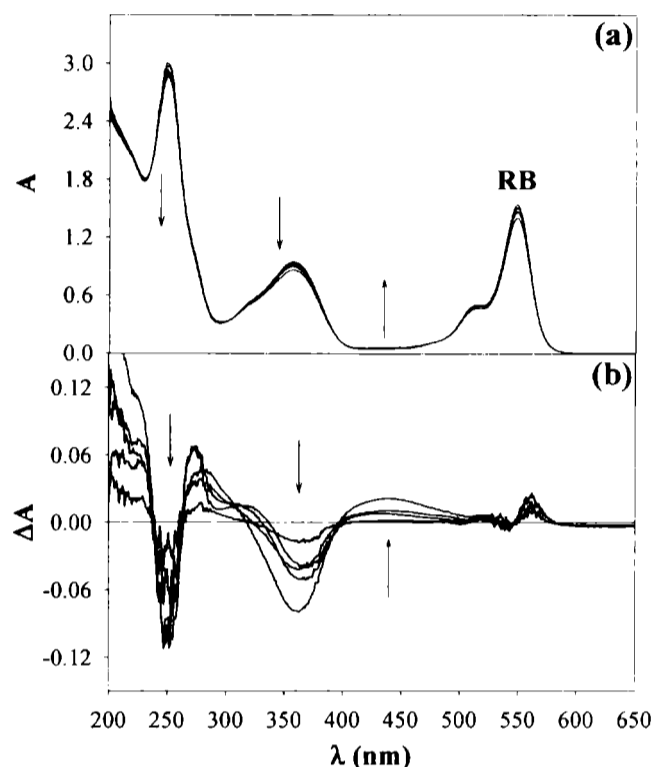


Figura 13.2: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de RB y PT ($[\text{PT}]_0=400 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) al ser irradiada en presencia de O_2 ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Los espectros fueron tomados cada 30 minutos. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y para la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de PT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación.

En la figura 13.3 se muestran cromatogramas correspondientes a soluciones de PT y RB, irradiadas a distintos tiempos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$; $\text{pD}=10,5$). Tanto en los cromatogramas obtenidos con λ de análisis 230nm (figura 13.3a), como en aquellos obtenidos a 340nm (figura 13.3b), puede apreciarse la presencia de varios picos con áreas pequeñas, correspondientes a los productos de reacción entre PT y $^1\text{O}_2$. El pico con el tiempo de retención (t_R) alrededor de 8,7 minutos, corresponde al reactivo (PT). Los picos con t_R 4,2 y 6,5 minutos pertenecen a productos que absorben tanto a 230 nm como a 340 nm. Con valores de t_R entre 1 y 3 minutos aparecen varios picos que corresponden a productos que

no presentan absorción a 340 nm; lo cual sugiere que han sufrido una ruptura del doble anillo pterínico. En la figura 13.4a, se muestran los espectros de absorción obtenidos por el equipo de HPLC (ver capítulo 8) para los picos de t_R 4,2 y 6,5 minutos, junto con el espectro correspondiente al reactivo de PT ($t_R=8,7$ minutos). Estos resultados indican que, el pico de $t_R=6,5$ minutos es el responsable del aumento en la absorción en la región del espectro comprendida entre 400 y 500nm, observado en el análisis de los espectros de absorción (figura 13.2); y que además se genera, al menos, un producto capaz de absorber entre 300 y 350 nm ($t_R=4,2$ minutos). En la figura 13.4b se muestra la evolución del área correspondiente a los productos con t_R 4,2 y 6,5 minutos.

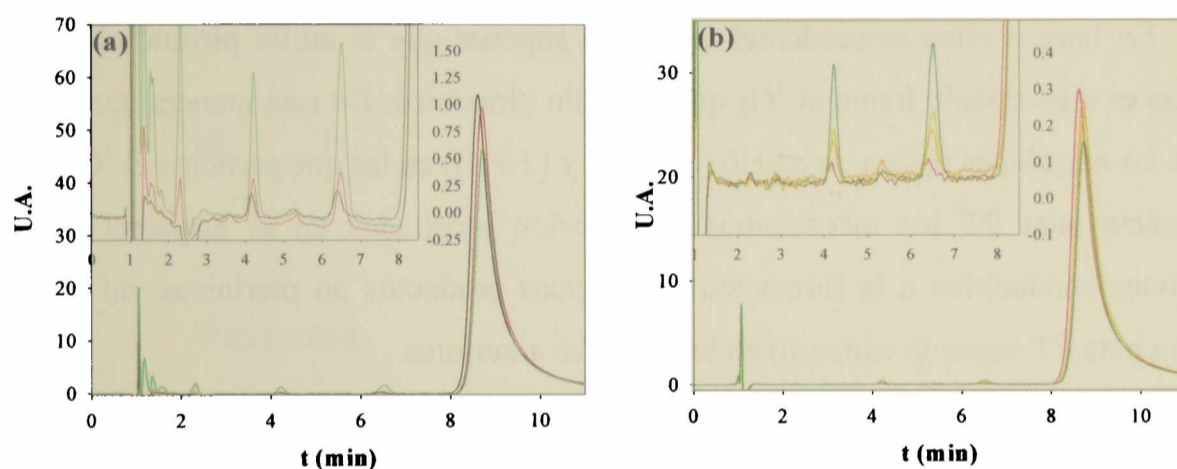


Figura 13.3: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de PT ($[PT]_0=400 \mu\text{M}$; $pD=10,5$) y RB irradiadas cada 30 minutos ($\lambda_{EX}=547\text{nm}$). a) Longitud de onda de análisis 230 nm. b) Longitud de onda de análisis 340 nm.

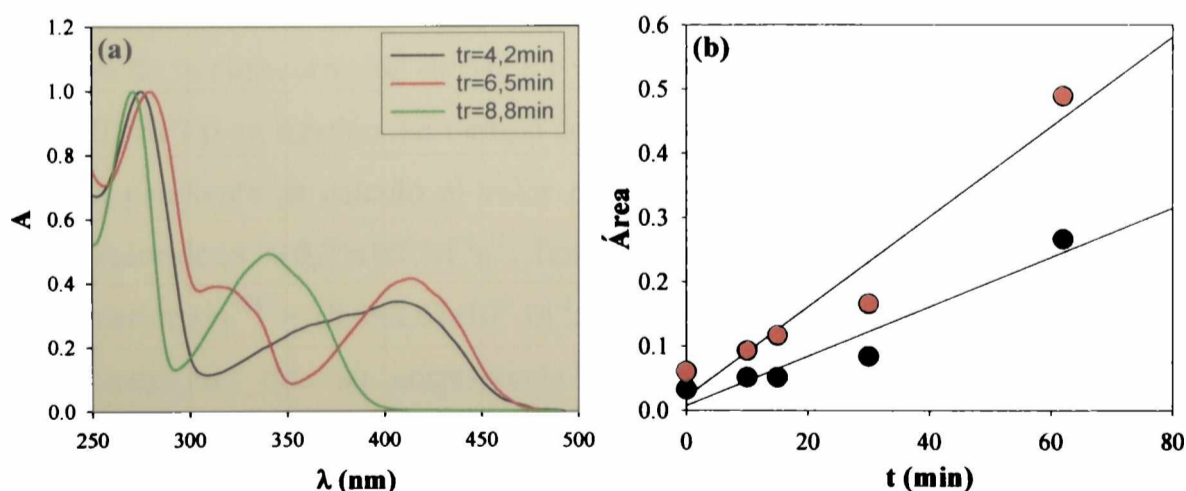
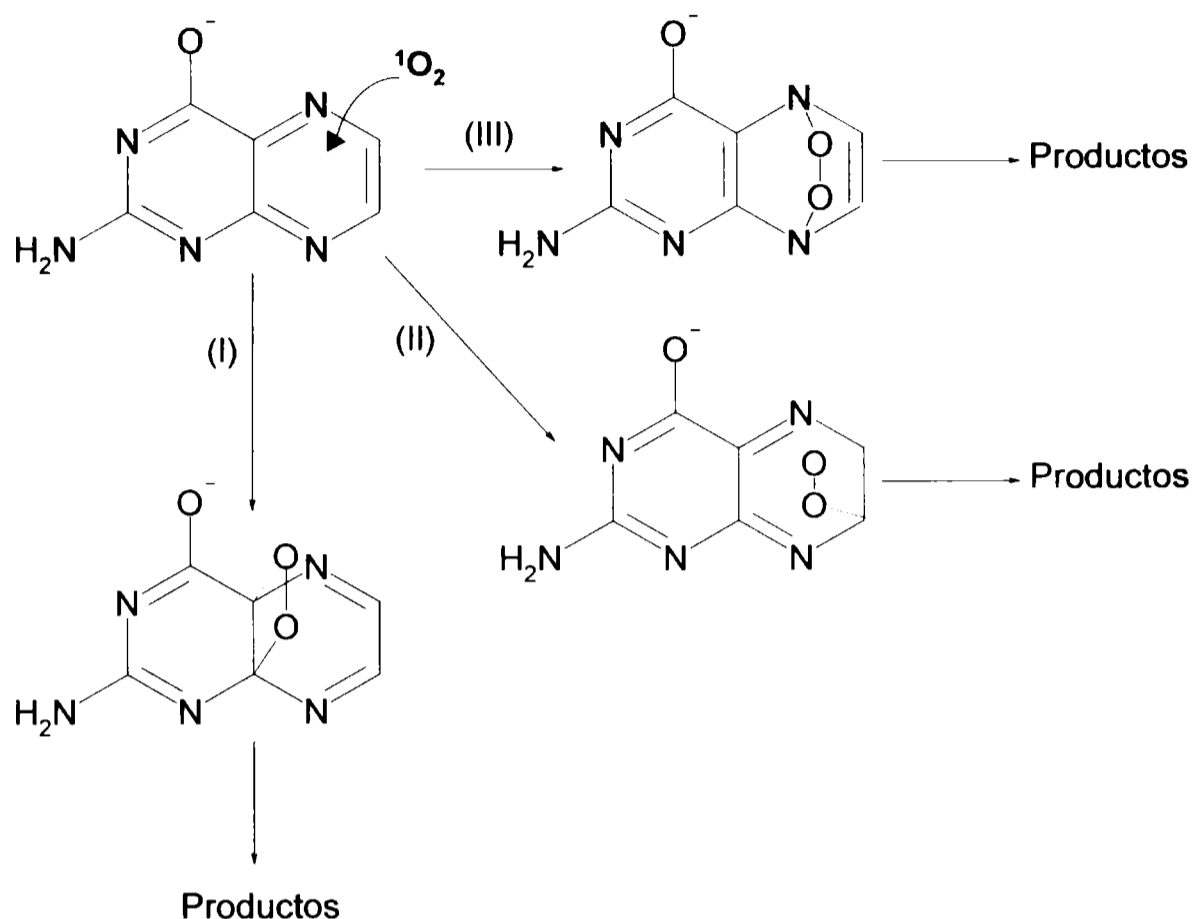


Figura 13.4: a) Espectros de absorción registrados sobre los picos con $t_R=4,2$; 6,5 y 8,8 minutos, de los cromatogramas de la figura 13.3. b) Evolución del área de los picos correspondientes a (●) t_R 4,2 minutos y (●) t_R 6,5 minutos del cromatograma analizado a 230 nm (figura 13.3a).

En el capítulo 1 se describieron los principales mecanismos de reacción del $^1\text{O}_2$ con otros compuestos de estructura química similar a las pterinas, como son las purinas. En dicho capítulo se expuso que el anillo de cinco miembros es el más susceptible a reaccionar con el $^1\text{O}_2$, mientras que el anillo pirimidínico, similar al presente en las pterinas, presenta una reactividad menor. Los valores de las constantes de reacción (k_r) entre el $^1\text{O}_2$ y las purinas están comprendidos entre 10^5 y $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes. Por otro lado, la Citosina que posee una estructura química idéntica al anillo pirimidínico de pterina presenta valores de k_r , medidos en D_2O , alrededor de $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, es decir, algo menor que el observado para PT ($2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

En base a estos antecedentes es lógico suponer que el anillo pirimidínico de las pterinas es más estable frente al $^1\text{O}_2$ que el anillo pirazínico. De esta manera, teniendo en cuenta las reacciones típicas de adición ($[2 + 2]$ y $[2 + 4]$) en las que participa el $^1\text{O}_2$, puede proponerse para PT los mecanismos de reacción mostrados en el esquema 1. Estas reacciones conducirían a la formación de diversos productos no pterínicos, tal como se observa para PT según lo expuesto en los párrafos anteriores.



Esquema 1

6-metilpterina (MPT). Se prepararon soluciones de MPT en D₂O (634 μM; pD=10,5) y RB ($A^{547} = 1,5$) y se irradiaron ($\lambda_{EX}=547\text{nm}$) a distintos tiempos. En la figura 13.5a se muestra la evolución de la concentración de MPT con el tiempo de irradiación. En la figura 13.5b se graficó $f([MPT])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8) y a partir de la pendiente se calculó el valor de k_r^{MPT} . En estas condiciones de trabajo, se obtuvo un valor de $(4,9\pm 0,7)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Teniendo en cuenta el valor de k_T presentado en el capítulo anterior ($k_T^{MPT} = (8,0\pm 0,6)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), puede apreciarse que k_r^{MPT} es del mismo orden de magnitud que su correspondiente constante de *quenching* físico ($k_q^{MPT} = (3\pm 1)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

El valor de k_r^{MPT} ($(4,9\pm 0,7)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es más de un orden de magnitud superior al obtenido para PT ($k_r^{PT} = (2,5\pm 0,3)\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Teniendo en cuenta que el $^1\text{O}_2$ es una especie electrófila, podría especularse que la mayor reactividad de MPT frente a esta especie reactiva se debe a una mayor densidad electrónica del doble anillo aportada por el

grupo metilo. Por otro lado, los valores de k_q encontrados para ambos compuestos son muy similares dentro del error experimental ($k_q^{\text{MPT}} = (3 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_q^{\text{PT}} = (2,6 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), sugiriendo que el sustituyente pequeño de MPT no afecta el *quenching* físico del $^1\text{O}_2$. Por último, queda claro que la diferencia entre los valores de k_T observados para MPT y PT ($k_T^{\text{MPT}} = 8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_T^{\text{PT}} = 2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) se debe, principalmente, a la reacción química y no al *quenching* físico.

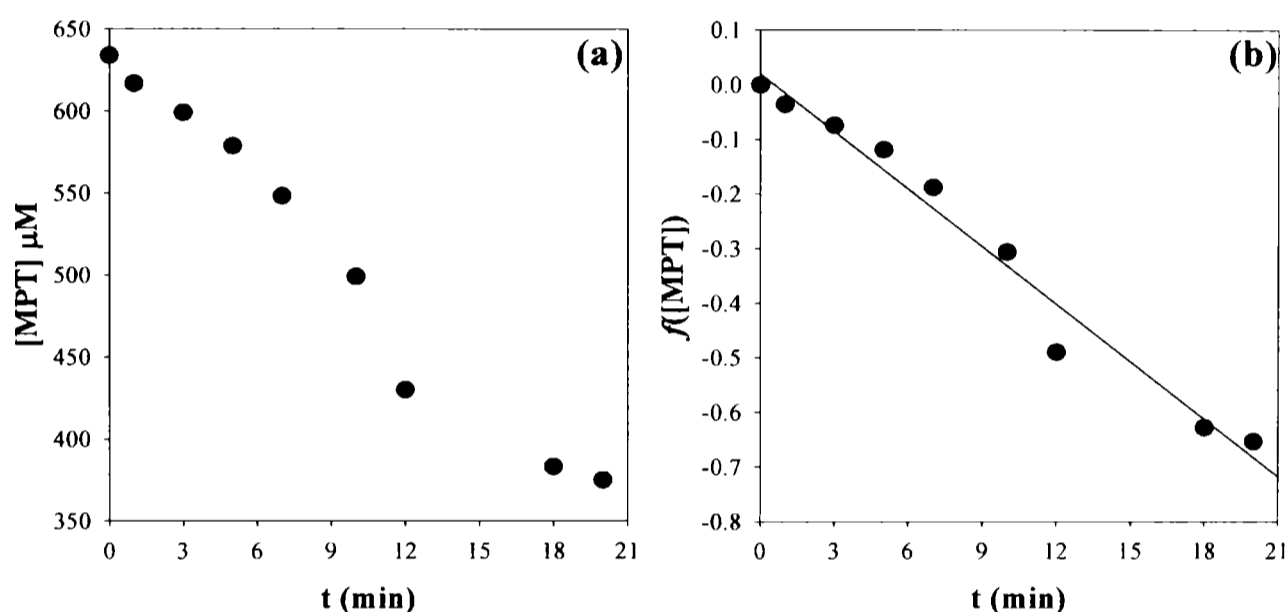


Figura 13.5: Oxidación fotosensibilizada de MPT en solución alcalina en D_2O ($[\text{MPT}]_0 = 634 \mu\text{M}$; $\text{pD} = 10,5$), equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{\text{EX}} = 547 \text{ nm}$). La concentración de MPT se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de MPT con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([\text{MPT}])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8).

Los espectros de absorción de las soluciones irradiadas (figura 13.6a), muestran diferencias en el comportamiento de MPT frente al $^1\text{O}_2$, en relación a lo observado para PT. Estos espectros, muestran una notable disminución de las bandas de absorción características de MPT. Estos cambios espectrales son mayores que los observados en la figura 13.2 para PT. Estos resultados concuerdan con el mayor valor de k_r^{MPT} observado. Los cambios espectrales, pueden apreciarse con más detalle en los espectros DE presentados en la figura 13.6b. Puede observarse que, a diferencia de lo observado para PT, no se forman productos capaces de absorber alrededor de 450 nm. En los espectros DE,

puede observarse la pérdida del carácter aromático y ruptura del doble anillo de MPT, cuando reacciona con el $^1\text{O}_2$. Para este compuesto, también puede plantearse una reacción directa del $^1\text{O}_2$ con el doble anillo pterínico y no con el sustituyente. Además, teniendo en cuenta el notable incremento en la reactividad que produce el sustituyente metilo, es razonable pensar que la reacción de $^1\text{O}_2$ tiene lugar en el anillo al cual está unido. Por lo tanto, puede plantearse un esquema de reacción similar establecido para PT (ver esquema 1).

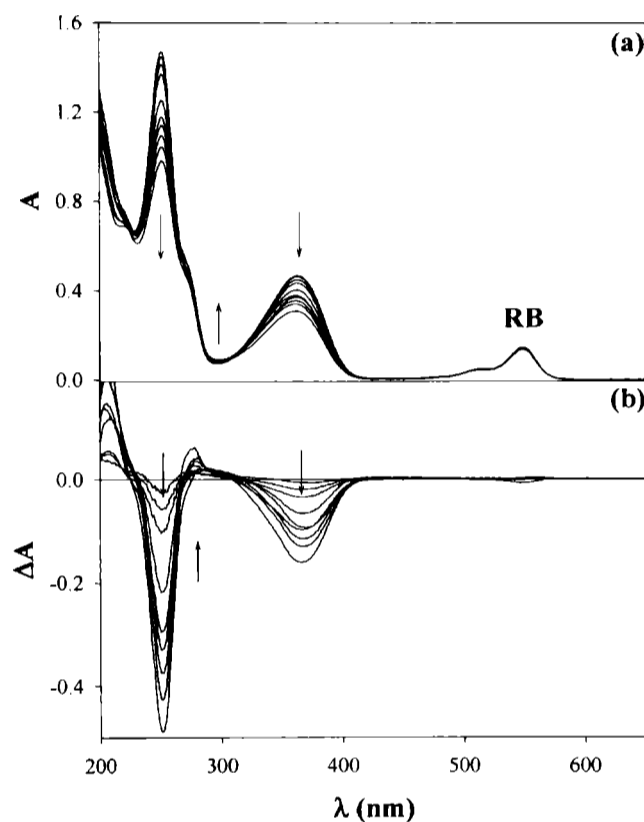


Figura 13.6: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de RB y MPT ($[\text{MPT}]_0=634 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) al ser irradiada en presencia de O_2 ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Los espectros fueron tomados cada 5 minutos. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y de 0,1 cm para la observación. b) Los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de MPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación.

En la figura 13.7 se muestran los cromatogramas correspondientes a soluciones de MPT y RB, irradiadas a distintos tiempos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$; $\text{pD}=10,4$). En ambas figuras se observa el pico correspondiente al reactivo MPT ($t_{\text{R}} \approx 6$ minutos) y un pico ancho y deformado, con $t_{\text{R}} 1,8$ minutos, que sugiere la presencia de varios productos.

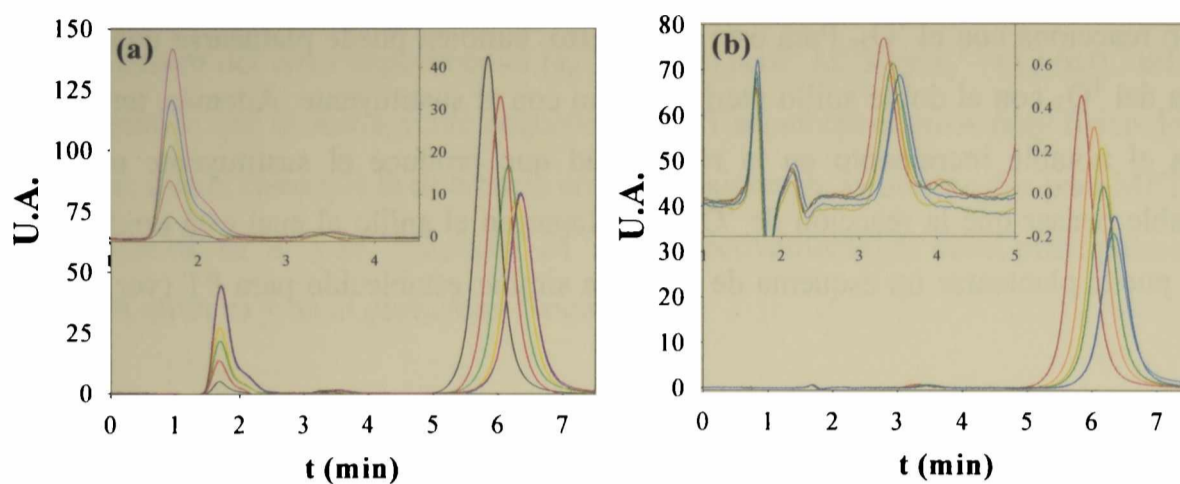


Figura 13.7: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de MPT ($[MPT]_0=634 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,4$) y RB irradiadas cada 5 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Solvente de corrida: 3% Acetonitrilo y 97% buffer fosfato. a) Longitud de onda de análisis 230 nm. b) Longitud de onda de análisis 340 nm.

Con el objeto de analizar más en detalle los productos de la reacción entre MPT y $^1\text{O}_2$, se registraron los cromatogramas de las soluciones de MPT y RB irradiadas, utilizando otras condiciones de corrida cromatográfica. En particular, se utilizó 100% buffer fosfato ($\text{pH}=5,5$). En la figura 13.8a, se muestran los cromatogramas registrados con distintas longitud de onda de análisis (230, 260, 300 y 340 nm). En esta figura puede apreciarse claramente que el área de cada pico analizado a 340 nm, es despreciable respecto de la observada en los cromatogramas analizados a 230 o 260 nm. Estos resultados sugieren que los productos han perdido su naturaleza pterínica. En la figura 13.8b, se muestran los espectros de absorción (registrados con el HPLC, ver capítulo 8) correspondientes a los picos con t_R 1,9, 3,4 y 5,0 minutos, de los cromatogramas mostrados en la figura 13.8a. En todos los casos, los productos han perdido la banda de absorción de 340 nm característica de las pterinas.

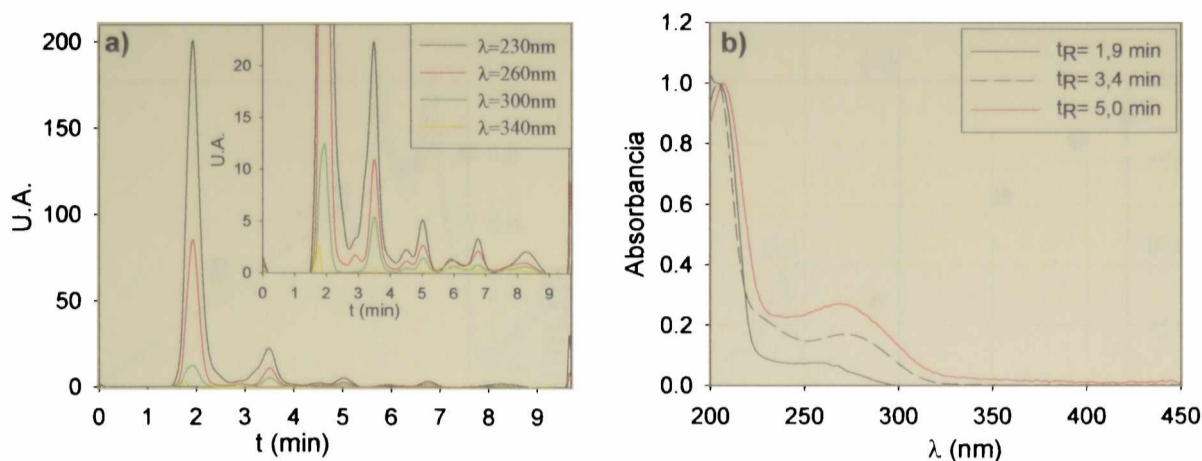


Figura 13.8: a) Cromatogramas correspondientes a las mezclas MPT y RB, irradiada 30 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Solvente de corrida: 100% de buffer fostato. b) Espectros de absorción de ambos picos de los cromatogramas de a).

6,7-dimetilpterina (DPT). Los experimentos con DPT se llevaron a cabo sobre soluciones mezcla en D_2O de DPT ($188 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) y RB ($A^{547} = 1,5$) y se irradiaron ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$) a distintos tiempos. En la figura 13.9a se muestra la evolución de la concentración de DPT con el tiempo de irradiación. En la figura 13.9b se graficó $f([\text{DPT}])$ en función del tiempo de irradiación; y de la pendiente se calculó el valor de k_r^{DPT} . Para este caso, se obtuvo un valor de $(1,0 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor de k_r^{DPT} es aproximadamente dos veces mayor que el observado para MPT ($k_r^{\text{MPT}} = 4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

De la misma manera que para MPT, el incremento en el valor de k_r puede explicarse teniendo en cuenta el carácter electrófilo del $^1\text{O}_2$ y el efecto inductivo del grupo metilo, que en el caso de DPT es mayor debido a la presencia de un metilo adicional respecto de MPT. Además, el significativo incremento del valor de k_r para DPT concuerda con la hipótesis que sugiere que el $^1\text{O}_2$ ataca el anillo pirazínico de las pterinas (ver esquema 1).

Debido a razones experimentales detalladas en el capítulo anterior, el valor de k_T obtenido ($k_T^{\text{DPT}} = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) está afectado por un error experimental muy elevado. Por consiguiente, en este caso, es imposible obtener un valor aceptable de k_q calculado como la diferencia entre k_T y k_r .

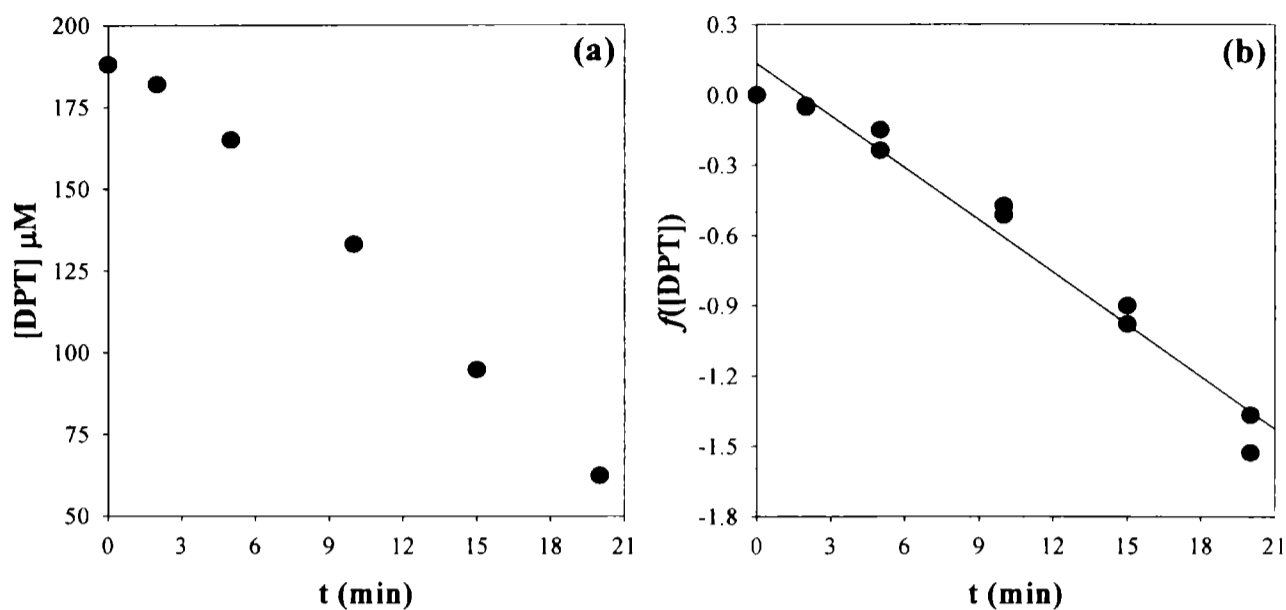


Figura 13.9: Oxidación fotosensibilizada de DPT en solución alcalina en D_2O ($[\text{DPT}]_0=188 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$), equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{\text{EX}}=547 \text{ nm}$). La concentración de DPT se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de DPT con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f(\text{DPT})$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8).

El análisis espectrofotométrico muestra que este compuesto presenta un comportamiento similar al observado para MPT. Los espectros de absorción de las soluciones irradiadas (figura 13.10), muestran una disminución en la intensidad de ambas bandas de absorción características de DPT. Nuevamente, estos resultados sugieren la ruptura del doble anillo, con la consecuente pérdida del carácter aromático, cuando DPT reacciona con el $^1\text{O}_2$.

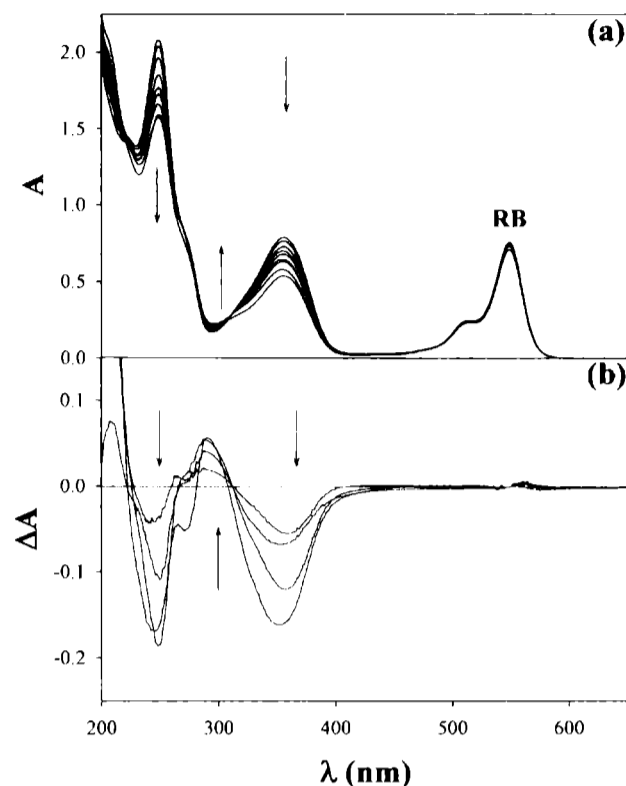


Figura 13.10: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de RB y DPT en D₂O ([DPT]₀=188 μM; pD=10,5), al ser irradiada en presencia de O₂ (λ_{EX}=547nm). Los espectros fueron tomados cada 5 minutos. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y de 0,5 cm para la observación. b) Los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de DPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación.

En la figura 13.11 se muestran los cromatogramas correspondientes a soluciones de DPT y RB, irradiadas a distintos tiempos (λ_{EX}=547nm; pD=10,4). En ambas figuras puede apreciarse la presencia de un pico relativamente ancho, correspondientes al o a los productos de reacción. Los cromatogramas analizados a 340nm (figuras 13.11b), muestran que el área del pico es mucho mas baja que la observada cuando los cromatogramas se analizan a 230nm (figura 13.11a). Estos resultados sugieren que los productos presentan coeficientes de absorción mucho más grandes a 230nm. En la figura 13.12a, se muestra el espectro de absorción registrado para el pico correspondiente al producto de t_R=1,6 minutos; junto con el espectro correspondiente al reactivo de DPT (t_R=2,2). Estos espectros fueron registrados con el HPLC (ver capítulo 8). Estos resultados muestran claramente que los productos no absorben a 340 nm; y por lo tanto no son de naturaleza pterínica. Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada, anteriormente, para la reacción del ¹O₂

con el heterociclo de DPT. Adicionalmente, en la figura 13.12b, se presenta la evolución del área del pico de $t_R=1,6$ minutos con el tiempo de irradiación.

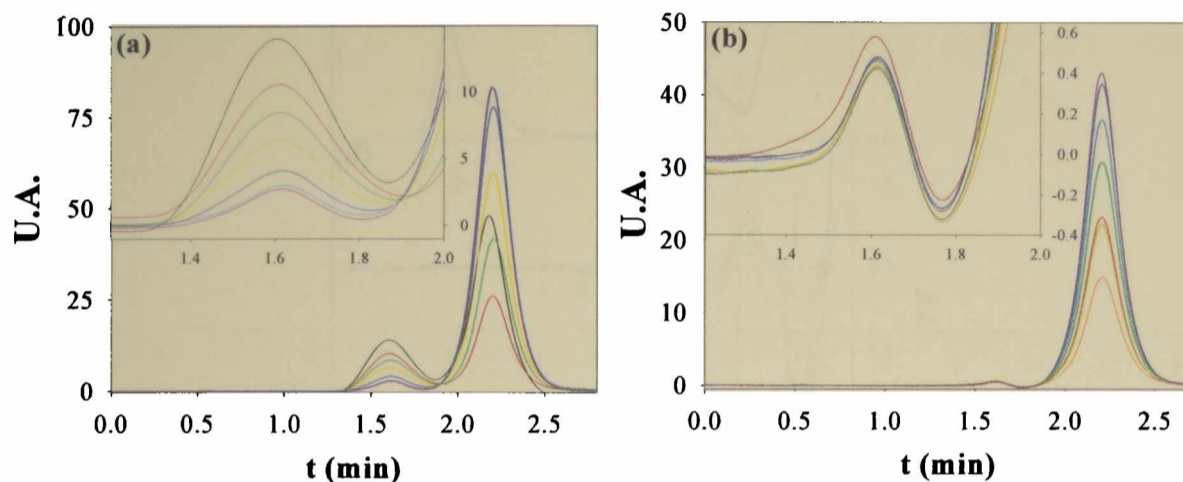


Figura 13.11: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de DPT ($[DPT]_0=188 \mu M$; $pD=10,4$) y RB, en D_2O , irradiadas cada 5 minutos ($\lambda_{EX}=547nm$). a) Longitud de onda de análisis 230 nm. b) Longitud de onda de análisis 340 nm.

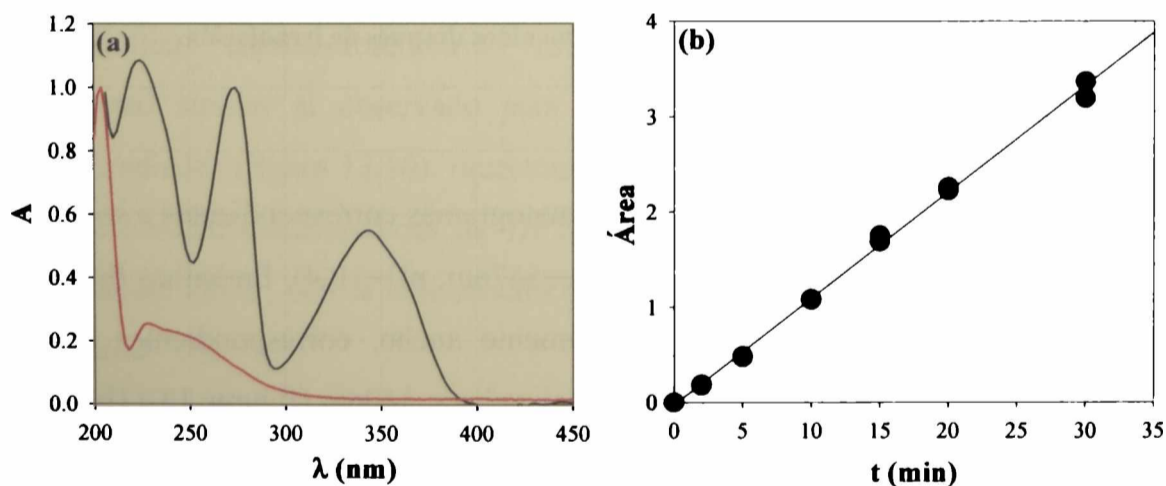


Figura 13.12: a) Espectros de absorción registrados sobre los picos con $t_R=1,6$ y 2,2 minutos, de los cromatogramas de la figura 13.11. b) Evolución del área del pico correspondiente t_R 1,6 minutos del cromatograma analizado a 230 nm (figura 13.11a).

6-hidroximetilpterina (HPT). En este caso, las determinaciones de k_r se realizaron en dos solventes diferentes (D_2O y en H_2O). Para esto, se prepararon dos grupos de experimento: el primer grupo de experimentos se realizó en D_2O , se prepararon soluciones mezcla de HPT (990 μM ; $pD=10,5$) y RB ($A^{547} = 1,5$). En el segundo grupo de experimentos se prepararon soluciones en H_2O de HPT (500 μM ; $pH=10,5$) y RB ($A^{547} = 1,5$). Todas las soluciones fueron irradiadas con $\lambda_{EX}=547nm$, a distintos tiempos.

En la figura 13.13a se muestra la dependencia de la concentración de HPT con el tiempo de irradiación, y en la figura 13.13b se graficó $f([HPT])$ como una función del tiempo de irradiación (en D_2O y en H_2O). De la pendiente se calculó un valor de k_r^{HPT} de reacción entre 1O_2 y la forma alcalina de HPT para cada solvente. En las condiciones de trabajo experimental, se obtuvo en D_2O un valor de $(1,2\pm 0,1)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y en H_2O , un valor de $(1,8\pm 0,2)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$. La diferencia entre estos dos valores, si bien pequeña teniendo en cuenta los errores experimentales relativamente altos, podrían indicar un efecto isotópico sobre el ataque del 1O_2 a HPT.

Este valor de k_r^{HPT} es un orden de magnitud superior al observado para PT ($(2,5\pm 0,3)\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la presencia del grupo $-CH_2OH-$ podría, por efecto inductivo, aumentar la densidad electrónica del doble anillo, con el consiguiente aumento de la reactividad del mismo frente al 1O_2 .

Teniendo en cuenta el valor de k_T^{HPT} medido en D_2O ($(3,1\pm 0,4)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) presentado en el capítulo anterior, puede apreciarse que el valor de k_r^{HPT} medido en D_2O , es del mismo orden de magnitud que la constante de *quenching* físico ($k_q^{HPT}=(1,9\pm 0,5)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$). El valor de k_q observado para HPT es del mismo orden de magnitud que aquellos encontrados para PT y MPT. Este hecho sugiere que, al contrario de lo que ocurre con el valor de k_r , el valor de k_q es poco afectado por la presencia y naturaleza del sustituyente; al menos para el caso de sustituyentes pequeños.

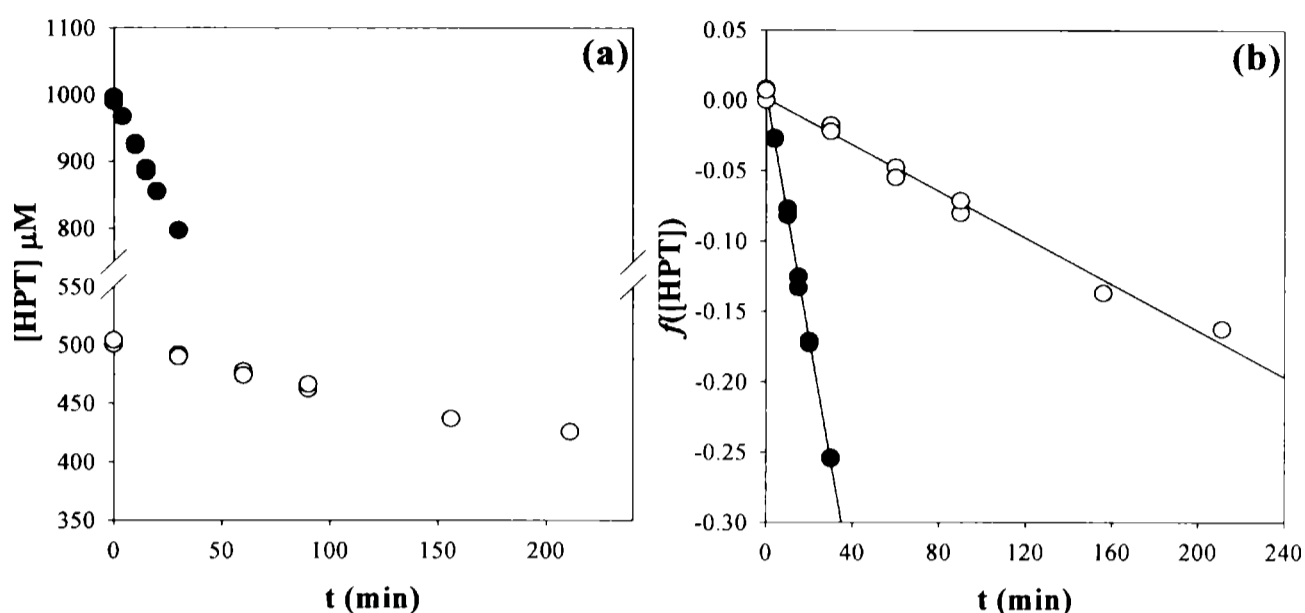


Figura 13.13: Oxidación fotosensibilizada de HPT, en solución alcalina equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{EX}=547$ nm). La concentración de HPT se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de HPT con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([HPT])$ como una función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8). (●) Solución de HPT ($[HPT]_0=990$ μ M; pD=10,5) en D₂O. (○) Solución de HPT ($[HPT]_0=500$ μ M; pH=10,5) en H₂O.

El análisis espectrofotométrico, muestra, para HPT, un comportamiento similar al observado para PT. En la figura 13.14a se muestra la evolución de los espectros de absorción registrados en los experimentos realizados en D₂O. Los espectros DE muestran que, a medida que aumenta el tiempo de irradiación, aumenta la absorción en la región del espectro comprendida entre 400 y 460 nm (figura 13.14b). Esto indica la presencia de, al menos, un producto capaz de absorber en esa región del espectro.

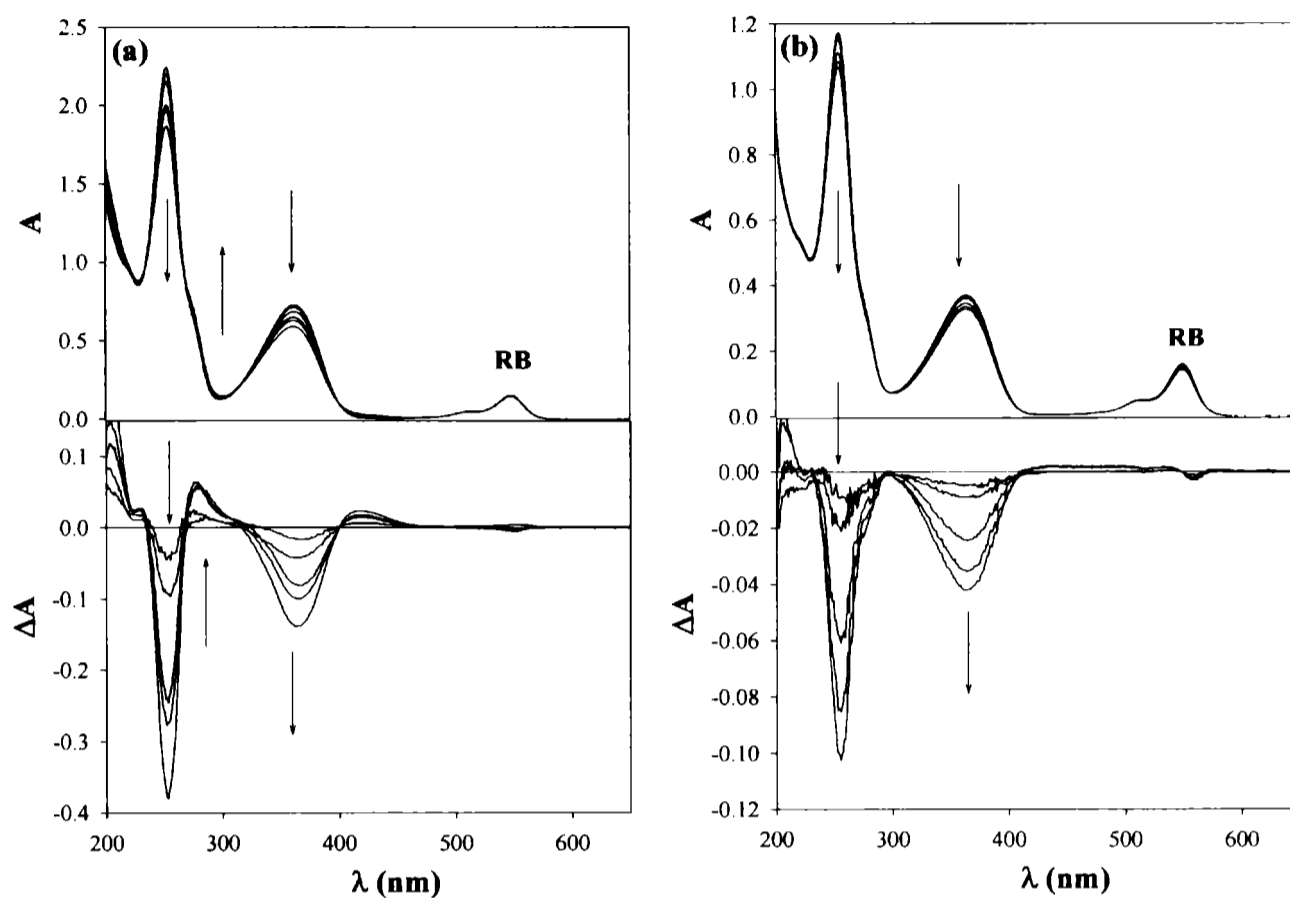


Figura 13.14: a) Superior: Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT ($[HPT]_0=990 \mu M$; $pD=10,5$) y RB en D_2O , al ser irradiada en presencia de O_2 ($\lambda_{EX}=547nm$). Los espectros fueron tomados cada 5 minutos. Inferior: Los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de la mezcla inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación. b) Idem a) en H_2O . Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y de 0,1 cm para registrar el espectro.

En la figura 13.15 se aprecia que el espectro DEN correspondiente al experimento realizado en D_2O es similar, pero no idéntico al espectro DEN del experimento realizado en H_2O . En estas condiciones, el análisis de los cambios espectrales sugiere, al igual que la pequeña diferencia en los valores de k_r medidos en ambos solventes, que la naturaleza de los procesos químicos que ocurren en D_2O podría tener alguna diferencia con la observada en H_2O .

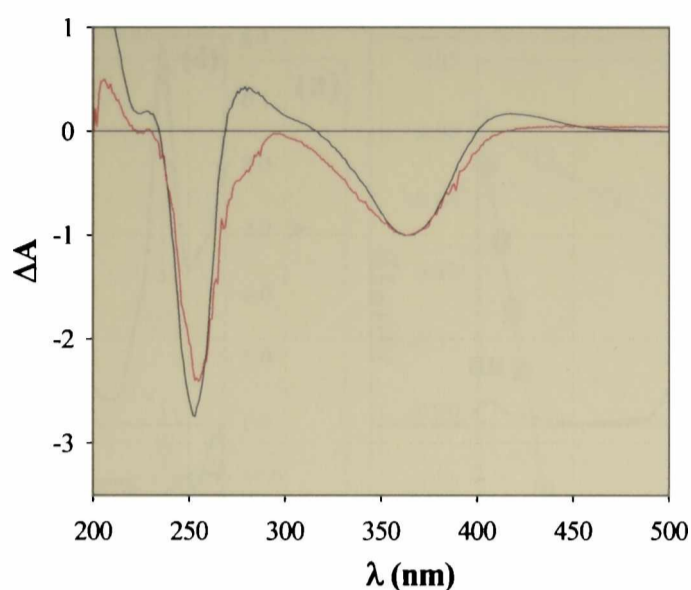


Figura 13.15: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT (990 μM ; $\text{pD}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 30 minutos de irradiación en D_2O ; El espectro DEN (-) se obtuvo restando el espectro de HPT (500 μM ; $\text{pH}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 211 minutos de irradiación en H_2O .

Analizando los cromatogramas de dichas soluciones (figura 13.16), se observa la presencia de dos picos que poseen áreas relativamente importantes. El pico con t_R alrededor de 2,8 minutos, corresponde al reactivo (HPT). El otro (P_1), es un pico con t_R cercano a 1,8 minutos; muy ancho y deformado. Esto parecería indicar la presencia de más de un producto con t_R similares, que no han sido separados adecuadamente.

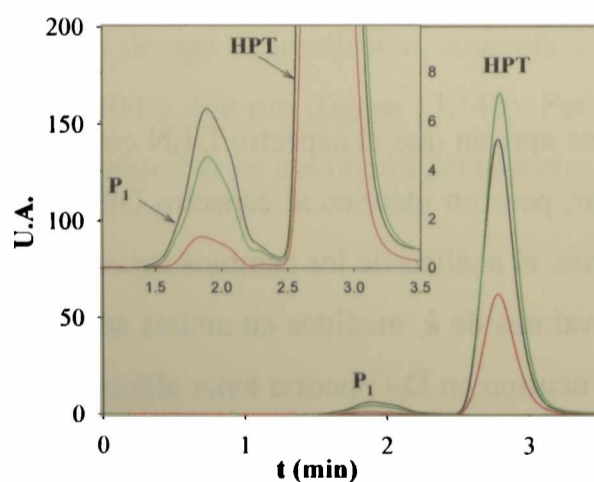
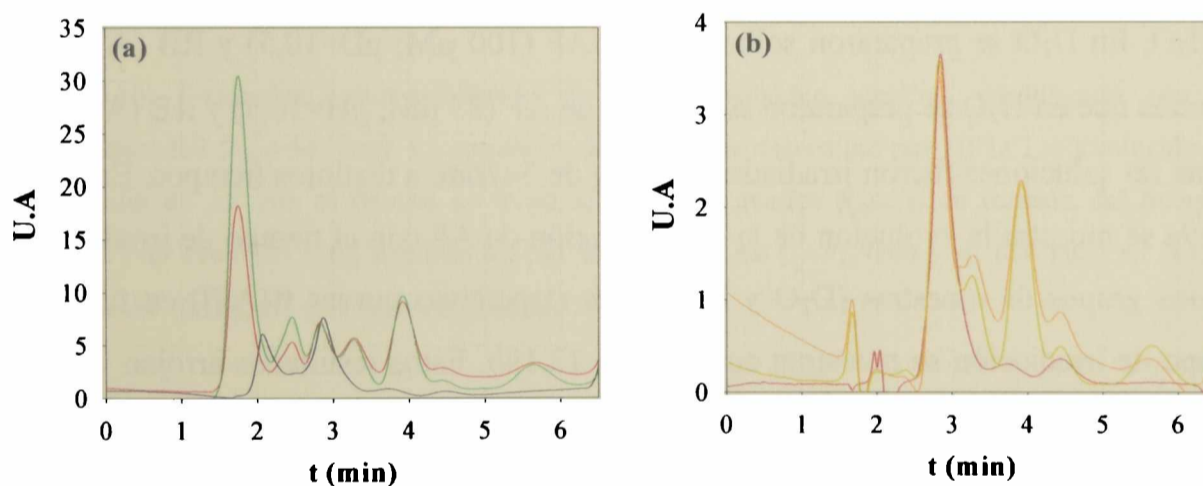


Figura 13.16: Cromatogramas correspondientes a las mezclas HPT y RB, irradiadas cada 10 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$; longitud de onda de análisis: 340 nm; Solvente de corrida: 5% Acetonitrilo y 95% de buffer fosfato).

Con el objeto de analizar con más detalle la naturaleza de los productos de la reacción entre el $^1\text{O}_2$ y HPT, se registraron los cromatogramas modificando las condiciones de corrida; esta vez usando 100% buffer fosfato como solvente de corrida (figura 13.17). En estas condiciones, el t_R de HPT es igual a 6,7 minutos. Los picos con $t_R=2,6$; 2,9 y 3,5 minutos pertenecen a productos que absorben tanto a 260 nm como a 340 nm. Con valores de t_R entre 1 y 2 minutos aparecen varios picos que corresponden a productos que no presentan absorción a 340 nm; lo cual sugiere que han sufrido una ruptura del doble anillo pterínico. En la figura 13.18, se muestran los espectros de absorción de cada pico de la figura 13.17. Estos espectros fueron registrados con el HPLC (ver capítulo 8). Estos resultados indican que los picos con $t_R=2,6$; 2,9 y 3,5 minutos son los responsables del aumento en la absorción en la región del espectro comprendida entre 400 y 450nm, observado en el análisis de los espectros de absorción (figura 13.14).



**Figura 13.17: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de HPT ($[\text{HPT}]_0=990 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,4$) y RB irradiadas cada 10 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Solvente de corrida: 100% de buffer fosfato
a) Longitud de onda de análisis: 230 nm. b) Longitud de onda de análisis: 340 nm.**

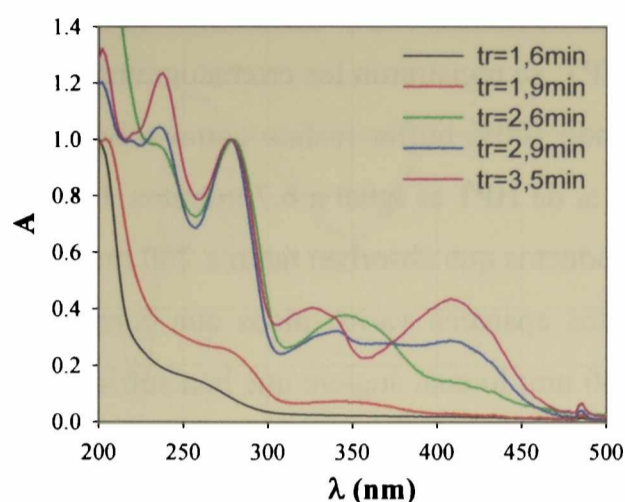


Figura 13.18: Espectros de absorción registrados sobre los picos con $t_R=1,6$; $1,9$; $2,6$; $2,9$ y $3,5$ minutos, de los cromatogramas de la figura 13.17.

Ácido fólico (AF). Para este compuesto, la determinación de k_r se hizo tanto en D_2O como en H_2O . En D_2O se prepararon soluciones de AF ($100 \mu M$; $pD=10,5$) y RB ($A^{547} = 1,5$), mientras que en H_2O se prepararon soluciones de AF ($85 \mu M$; $pH=10,5$) y RB ($A^{547} = 1,5$). Todas las soluciones fueron irradiadas con λ_{EX} de $547nm$, a distintos tiempos. En la figura 13.19a se muestra la evolución de la concentración de AF con el tiempo de irradiación, en los dos grupos de muestras (D_2O y H_2O). Las respectivas curvas $f([AF])$ en función del tiempo de irradiación se muestran en la figura 13.19b. Estos resultados arrojan valores de k_r^{AF} de $(2,8 \pm 0,3) \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ y $(5,4 \pm 0,8) \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ en D_2O y H_2O , respectivamente. La diferencia significativa entre estos dos valores sugiere la existencia de efectos isotópicos en la o las reacciones que ocurren entre el 1O_2 y el AF.

Si aparte, se compara el valor de k_r^{AF} medido en D_2O con el observado para PT también en D_2O ($k_r^{PT} = (2,5 \pm 0,3) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$), puede apreciarse que el primero es un orden de magnitud mayor respecto del segundo. Pueden plantearse dos hipótesis para justificar el elevado valor de k_r^{AF} . Por un lado, la presencia del sustituyente podría, por efecto inductivo, aumentar la densidad electrónica del doble anillo en relación a PT, con el consiguiente aumento de la reactividad del mismo frente al 1O_2 . Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que el 1O_2 reacciona con AF rompiendo y oxidando la molécula para dar FPT^[3,4,7]. La existencia de esta reacción, de naturaleza completamente diferente a la reacción de la especie reactiva con el doble anillo pterínico,

podría justificar el aumento en la reactividad del AF frente al $^1\text{O}_2$. En esta sección se discutirán en detalle la validez de estas hipótesis.

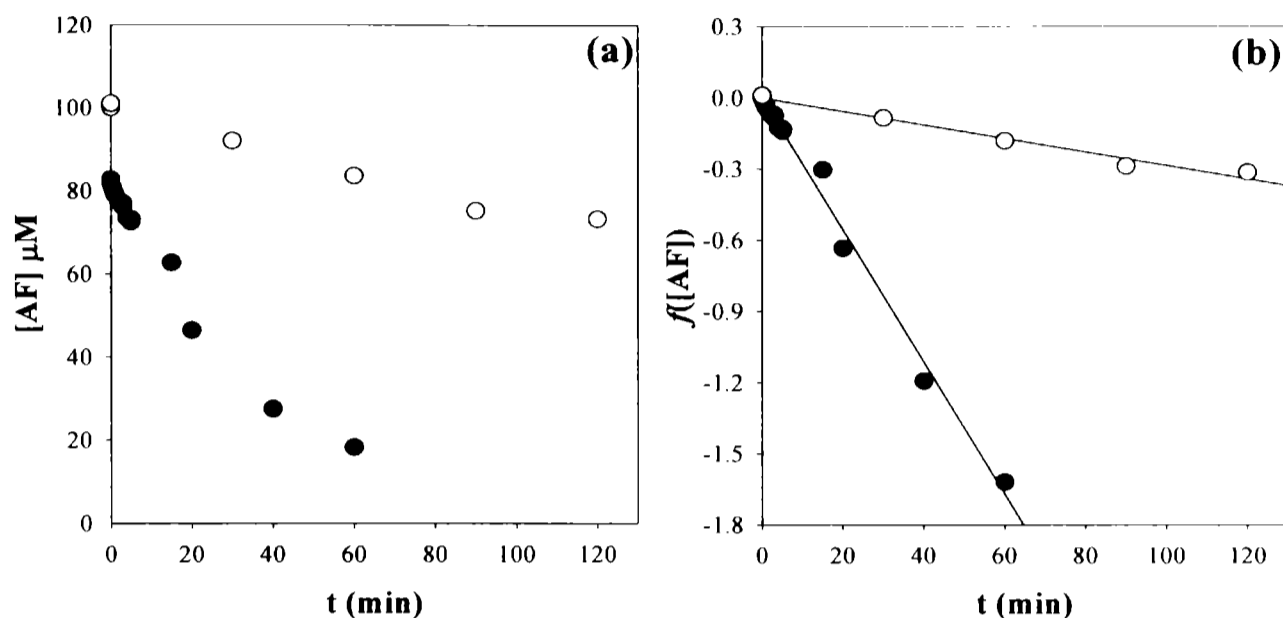


Figura 13.19: Oxidación fotosensibilizada de AF en solución alcalina, equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{\text{EX}}=547$ nm). La concentración de AF se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de AF con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([\text{AF}])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8). (●) Solución de AF ($[\text{AF}]_0=100$ μM ; $\text{pD}=10,4$) en D_2O . (○) Solución de AF ($[\text{AF}]_0=85$ μM ; $\text{pH}=10,5$) en H_2O .

El análisis cualitativo de los espectros de absorción de ambos grupos de soluciones irradiadas, muestra un comportamiento parecido, pero no idéntico. La figura 13.20 muestra los espectros de absorción y los espectros DE. Se observa una disminución en la intensidad de las bandas de absorción ubicadas en la región del espectro comprendida entre 200 y 380nm. Por otra parte, en la región del espectro comprendida entre 400 y 500nm, se observa un incremento en la absorción de la solución en función del tiempo de irradiación. En la figura 13.21 se muestran los correspondientes espectros DEN.

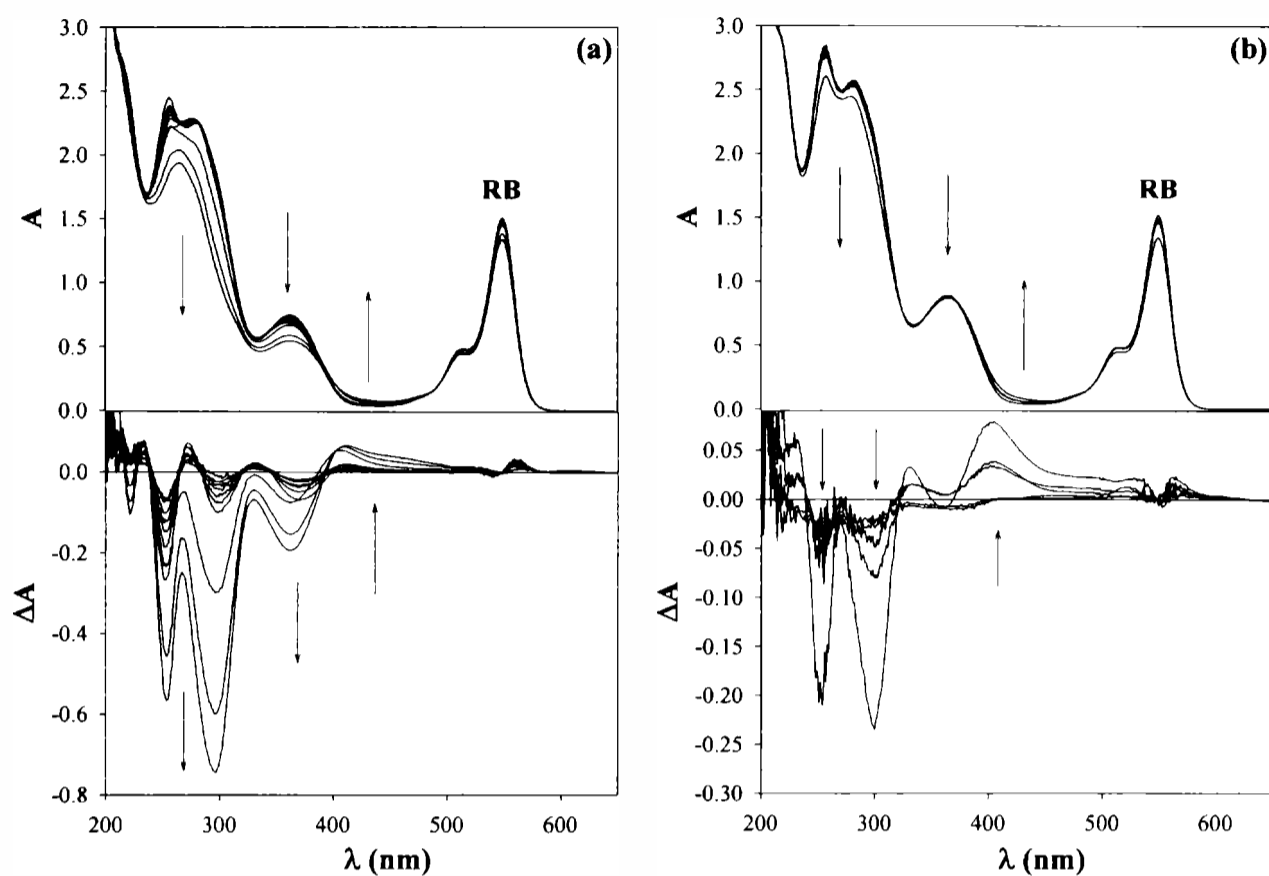


Figura 13.20: a) Superior: Evolución del espectro de absorción de una solución de AF ($[AF]_0=85 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) y RB en D_2O , con el tiempo de irradiación ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Inferior: los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de la mezcla inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiar a distintos tiempos. b) Idem a) en H_2O . Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y para registrar el espectro.

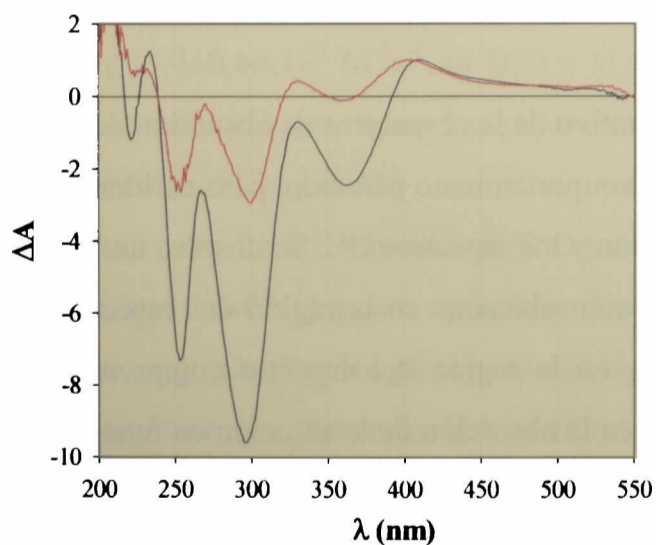


Figura 13.21: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de AF ($[AF]_0=85 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 20 minutos de irradiación en D_2O ; El Espectro DEN (---) se obtuvo restando el espectro de AF ($[AF]_0=100 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 120 minutos de irradiación en H_2O .

En la figura 13.22 se presentan los cromatogramas ($\lambda_{\text{análisis}}=340\text{nm}$) correspondientes a las soluciones de AF con RB irradiadas a distintos tiempos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$). Los resultados observados en D_2O y en H_2O son similares. En ambos medios se observa un incremento en el consumo de AF a medida que aumenta el tiempo de irradiación. También se observa la aparición de un pico que coincide con el patrón de FPT. Este resultado es significativo, porque corrobora la hipótesis que propone que el $^1\text{O}_2$ reacciona con AF para dar FPT. En la figura 13.23, se muestran los cromatogramas registrados usando como longitud de onda de análisis 254nm. En estos cromatogramas se observa claramente la presencia de un gran número de productos además de FPT. Algunos de estos productos muestran una elevada absorción a 254 nm y muy baja o nula a 340 nm; lo cual sugiere que estos productos son de naturaleza no pterínica. Estas observaciones permiten inferir que la reacción que genera FPT no es la única reacción entre el $^1\text{O}_2$ y el AF.

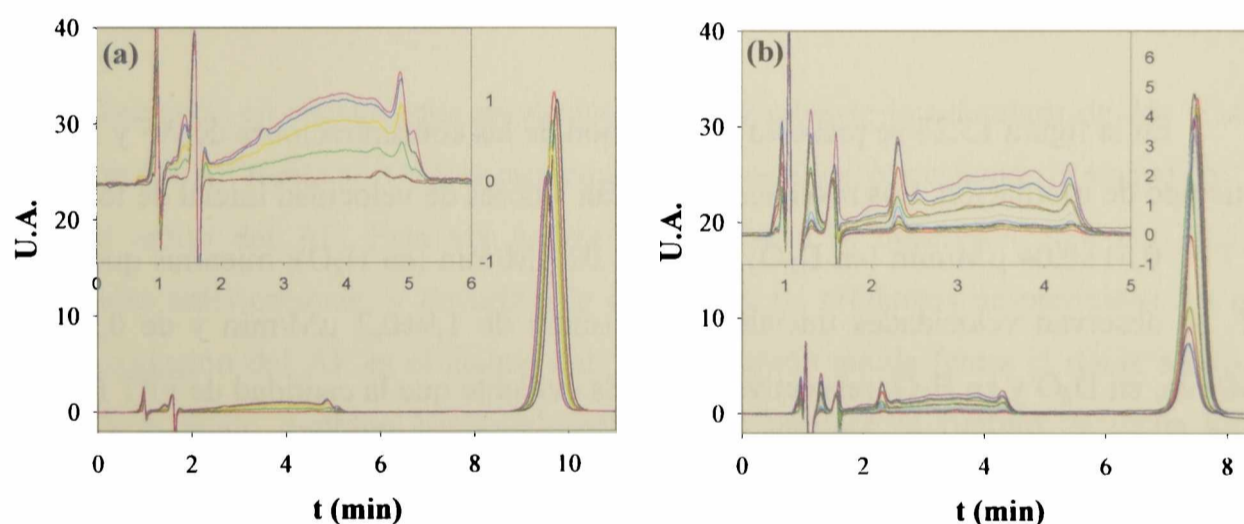


Figura 13.22: a) Cromatogramas correspondientes a las soluciones de AF en D_2O ($[\text{AF}]_0=85\ \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) en presencia de RB, irradiadas cada 5 minutos. b) Cromatogramas correspondientes a las soluciones de AF en H_2O ($[\text{AF}]_0=100\ \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) en presencia de RB, irradiadas cada 5 minutos. $\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$ y longitud de onda de análisis 340 nm.

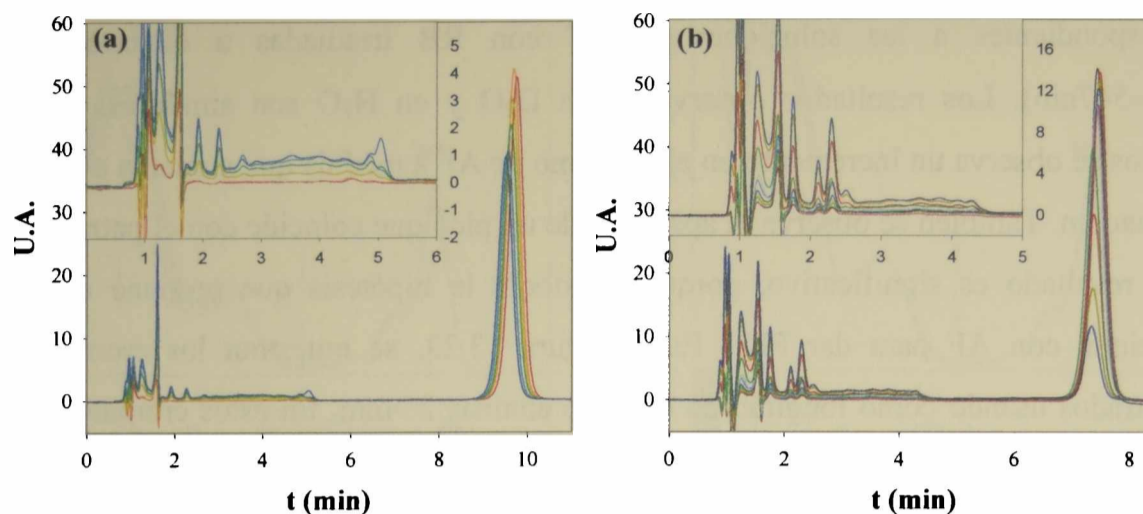


Figura 13.23: a) Cromatogramas correspondientes a las soluciones de AF en D₂O ([AF]₀=85 μM; pD=10,5) en presencia de RB, irradiadas cada 5 minutos. b) Cromatogramas correspondientes a las soluciones de AF en H₂O ([AF]₀=100 μM; pD=10,5) en presencia de RB, irradiadas cada 5 minutos. λ_{EX}=547nm y longitud de onda de análisis 254nm.

En la figura 13.24 se presenta la evolución de las concentraciones de AF y FPT con el tiempo de irradiación. Los resultados muestran valores de velocidad inicial de formación de FPT $0,51 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{min}$ (en D₂O) y $0,14 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$ (en H₂O); mientras que para el AF, se observan velocidades iniciales de consumo de $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}/\text{min}$ y de $0,28 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$, en D₂O y en H₂O, respectivamente. Es evidente que la cantidad de FPT formada, si bien es importante, es menor a la cantidad de AF consumido. Más aún, en la figura 13.24 puede apreciarse una disminución de la suma de las concentraciones de AF y FPT con el tiempo de irradiación. En D₂O, solo el 29 % del AF se convierte en FPT; mientras que en H₂O, la formación de FPT representa el 56 % del total del AF consumido.

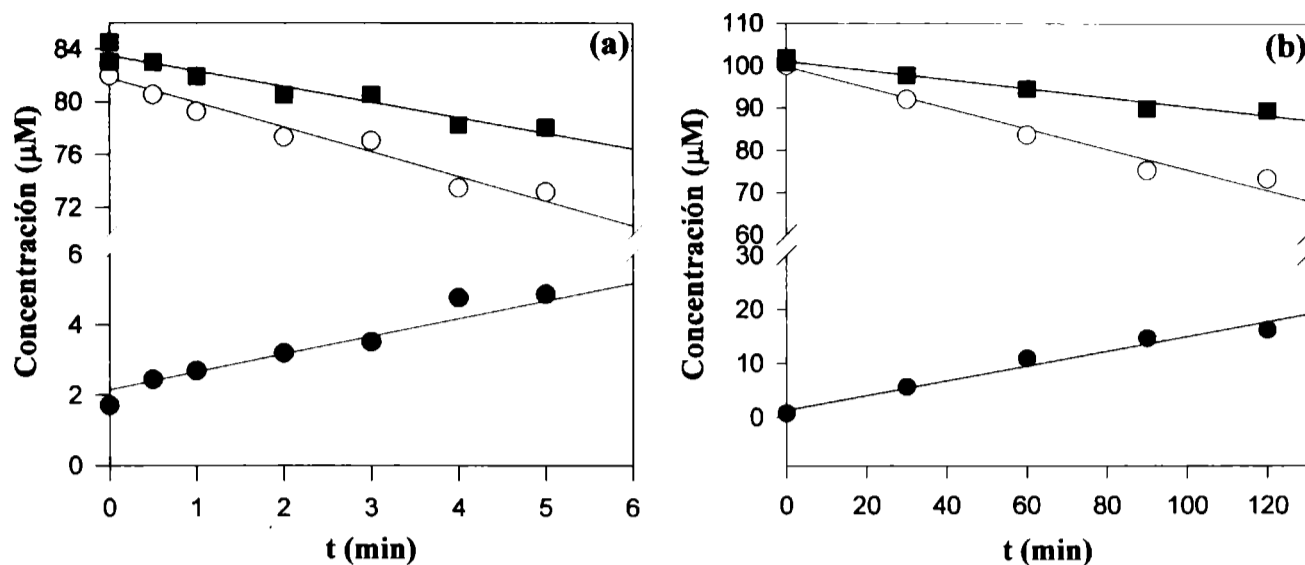
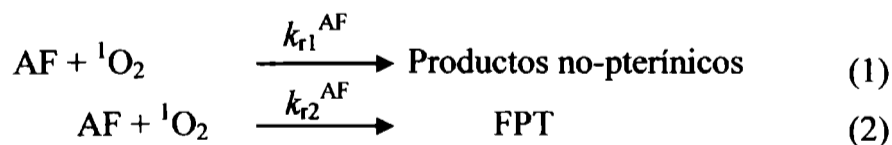


Figura 13.24: Evolución de la concentración de (○) AF y (●) FPT con el tiempo de irradiación. a) Resultados de los experimentos realizados en D₂O. b) Resultados de los experimentos realizados en H₂O. (■) Sumatoria de las concentraciones de AF y FPT.

Teniendo en cuenta estos resultados, puede plantearse la existencia de dos vías de oxidación del AF frente al ¹O₂ (ver esquema 2). Una de ellas, corresponde al ataque del ¹O₂ al doble anillo del AF. Esta vía podría ser similar a la observada para las pterinas presentadas anteriormente, y llevaría a la generación de productos no-pterínicos. La otra vía de oxidación del AF es el ataque del ¹O₂ a la unión amida (entre el doble anillo de pterina y el ácido *p*-amino benzoilglutámico), que produce la ruptura de dicha unión generando como productos FPT y el ácido *p*-amino benzoilglutámico.



Esquema 2

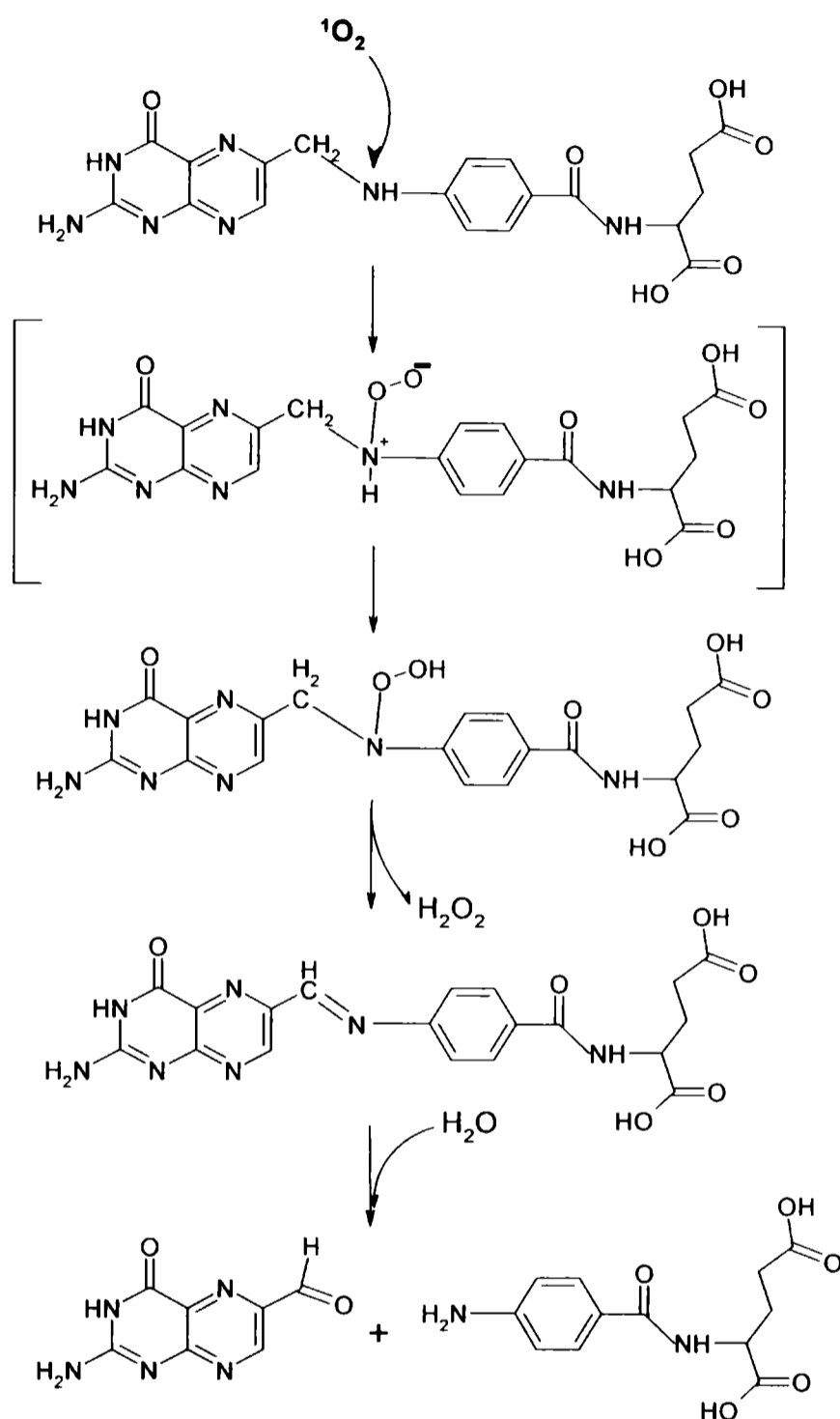
A partir de los valores de k_r^{AF} y teniendo en cuenta los porcentajes de conversión de AF en FPT presentados anteriormente, pueden calcularse valores de k_{r1}^{AF} ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en D₂O y $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en H₂O) y valores de k_{r2}^{AF} ($0,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en D₂O y $3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en H₂O). Es interesante apreciar que, dentro del error experimental, los valores de k_{r1}^{AF} son

similares en ambos solventes y que por el contrario, la mayor diferencia se encuentra en los valores de k_{r2}^{AF} que corresponden a la vía de reacción que produce FPT. Este hecho podría estar indicando la existencia de un efecto isotópico importante sobre esta reacción.

Comparando el valor de k_{r1}^{AF} obtenido en D₂O con los resultados de k_r obtenidos para PT, MPT, DPT y HPT, puede apreciarse que k_{r1}^{AF} es un orden de magnitud superior al observado para PT y del mismo orden de magnitud, aunque algo menor, que el observado para MPT ($k_r^{MPT}=4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Esto puede explicarse teniendo en cuenta el efecto inductivo del sustituyente de la posición 6 del anillo. En efecto, el sustituyente del AF es donador de electrones, pero no tanto como el grupo metilo. En consecuencia, el valor de k_{r1}^{AF} encontrado es superior al valor de k_r^{PT} , pero inferior al de k_r^{MPT} .

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas al principio de esta sección, los resultados presentados y el análisis de los mismos desarrollados en los párrafos precedentes, puede concluirse que la mayor reactividad del AF frente al ¹O₂ cuando se la compara con la correspondiente a PT se debe a la suma de, al menos, dos factores: por un lado a la mayor reactividad del doble anillo pterínico del AF, probablemente debido al efecto inductivo del sustituyente y, por otro lado, a la existencia de una reacción en la cual el ¹O₂ ataca al sustituyente.

Respecto de esta última reacción, resulta interesante realizar algunos comentarios considerando ciertos procesos ya descritos en la literatura. En el capítulo 3 se presentó evidencia en favor de la reactividad de las aminas frente al ¹O₂ por medio de mecanismos de transferencia de electrones^[8]. Por lo tanto, en el caso del AF, es altamente probable que ocurra un ataque del ¹O₂ al nitrógeno unido al grupo metileno de la posición 6 del anillo de pterina. Esta reacción podría transformar la amina secundaria (-CH₂-NH-) en un intermediario imina (-CH=N-). La hidrólisis de este último intermediario en solución acuosa, produciría la ruptura y oxidación del AF, generando así, como productos, FPT y ácido *p*-aminobenzoilglutámico. Este mecanismo de reacción ha sido propuesto para las aminas primarias y secundarias^[9] (esquema 3).



Esquema 3

Thomas *et.al.* publicaron en la literatura el valor de k_T^{AF} $((3,0 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^{[1]}$ medido en D_2O y en idénticas condiciones de trabajo que las empleadas para la determinación de los valores de k_T presentados en el capítulo anterior, para otros derivados pterínicos. Teniendo en cuenta este valor de k_T y el valor de k_r^{AF} en D_2O presentado anteriormente $((2,8 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$, puede calcularse un valor de k_q^{AF} igual a

$(2,7 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor de k_q , comparado con los observados para PT, MPT, DPT y HPT, es un orden de magnitud mayor. Aquí es importante tener en cuenta la naturaleza química del sustituyente en la posición 6 del AF, para dar una explicación a esta gran diferencia en los valores de k_q . Por un lado, hay que tener en cuenta los factores estéricos debido a la presencia, en el AF, de un sustituyente mucho más voluminoso. Esto podría conferirle a la molécula una mayor capacidad para desactivar físicamente al $^1\text{O}_2$, que la que le confieren los sustituyentes “pequeños” que cuentan con un solo átomo de carbono. También hay que tener en cuenta la presencia del grupo amino en el sustituyente del AF. Las aminas son bien conocidas como desactivantes del $^1\text{O}_2$ por mecanismos de transferencia de carga^[8,9]. Por otro lado, hay antecedentes en la literatura que describen la capacidad que posee el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) para secuestrar $^1\text{O}_2$, estableciendo una eficiencia de secuestro mayor que la observada para la azida sódica (otro secuestrador selectivo de $^1\text{O}_2$)^[10,11]. En base a esto, el resto PABA podría ser el responsable de la mayor eficiencia en la desactivación del $^1\text{O}_2$ que presenta el AF. De una manera u otra, no cabe duda que la naturaleza química especial del sustituyente es la responsable del valor tan elevado de k_q^{AF} .

En el trabajo publicado por Thomas *et. al.*^[1], donde se listan los valores de k_T de varios derivados pterínicos (PT, CPT, FPT, BPT, NPT y AF), se sugirió (sobre la base de estudios e hipótesis previas^[3,4]) que el elevado valor de k_T^{AF} comparado con el del resto de los compuestos estudiados podría deberse a un elevado valor de k_r , debido a su vez, a la reacción que genera FPT como producto. A la luz de los resultados presentados en este capítulo, queda claro que las diferencias en los valores de k_T observados para AF y PT ($k_T^{\text{AF}} = (3,0 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_T^{\text{PT}} = (2,9 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) se deben principalmente a una mayor eficiencia del proceso de *quenching* físico y no a la mayor reactividad del AF frente al $^1\text{O}_2$.

Ácido *N* metil fólico (MAF). Para este compuesto, también se determinaron los valores de k_r en los dos solventes (D_2O y H_2O). Para esto, se prepararon soluciones en D_2O de MAF (488 μM ; $\text{pD}=10,4$) y RB ($A^{547}=1,5$) y en soluciones en H_2O de MAF (450 μM ; $\text{pH}=10,5$) y RB ($A^{547}=1,5$). Todas las soluciones fueron irradiadas con $\lambda_{\text{EX}} 547\text{nm}$, a distintos

tiempos.

En la figura 13.25a se muestra la dependencia de la concentración de MAF con el tiempo de irradiación, y en la figura 13.25b se graficó la evolución de la función $f([MAF])$ con el tiempo de irradiación (en D_2O y en H_2O). De la pendiente se calculó un valor de k_r de reacción entre 1O_2 y la forma alcalina de MAF para cada solvente. En las condiciones experimentales de trabajo, los valores obtenidos fueron $(1,9 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $(3,3 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en D_2O y en H_2O , respectivamente.

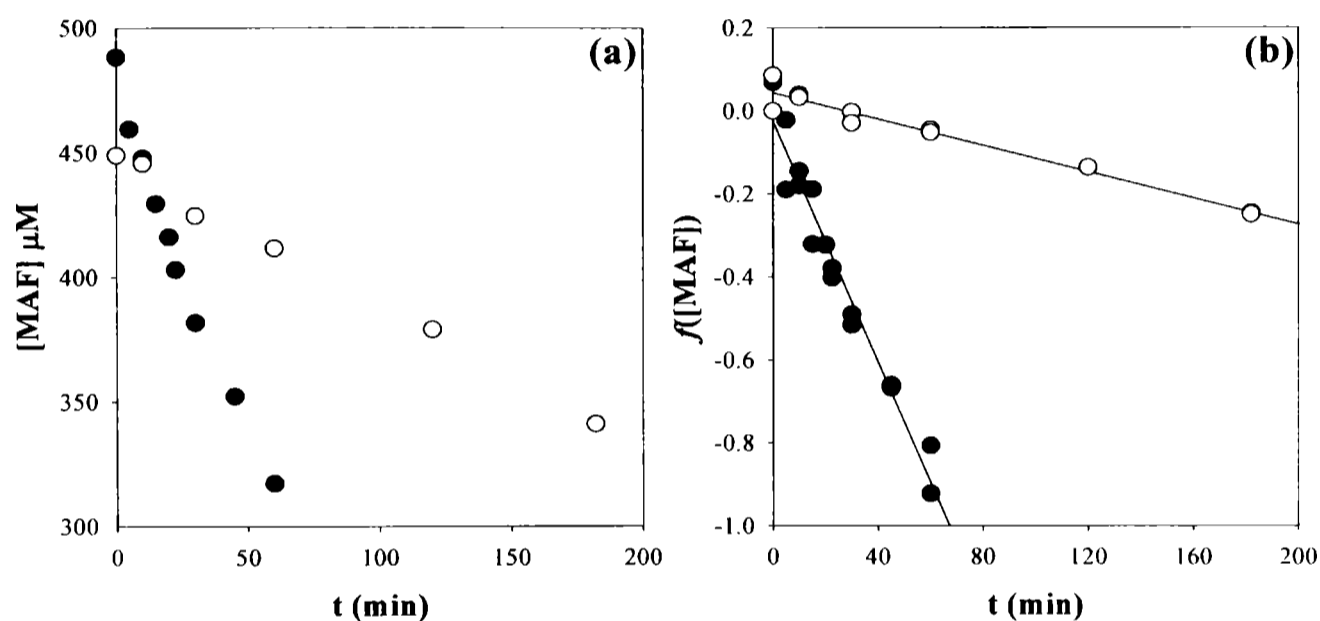


Figura 13.25: Oxidación fotosensibilizada de MAF en solución alcalina, equilibrada con aire. Sensibilizador: RB ($\lambda_{\text{EX}}=547 \text{ nm}$). La concentración de MAF se determinó por HPLC. a) Evolución de la concentración de MAF con el tiempo de irradiación. b) Se graficó $f([MAF])$ en función del tiempo de irradiación (ver ecuación (20), capítulo 8). (●) Solución de MAF en D_2O ($[MAF]_0=488 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$). (○) Solución de MAF en H_2O ($[MAF]_0=450 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$).

El análisis de los espectros de absorción de las soluciones irradiadas muestra un comportamiento similar tanto en D_2O como en H_2O . La figura 13.26 muestra los espectros de absorción y los espectros DE. Se observa una disminución en la intensidad de todas las bandas de absorción del MAF con el tiempo de irradiación. Este comportamiento es similar al observado para PT, DPT y MPT. En este caso, también podría sugerirse que la reacción del 1O_2 es directamente con el doble anillo pterínico del MAF.

En la figura 13.27 se aprecia que el espectro DEN del experimento realizado en D₂O es similar al espectro DEN del experimento realizado en H₂O. En estas condiciones, el análisis de los cambios espectrales sugiere que la naturaleza de los procesos químicos que ocurren en D₂O es similar a la observada en H₂O.

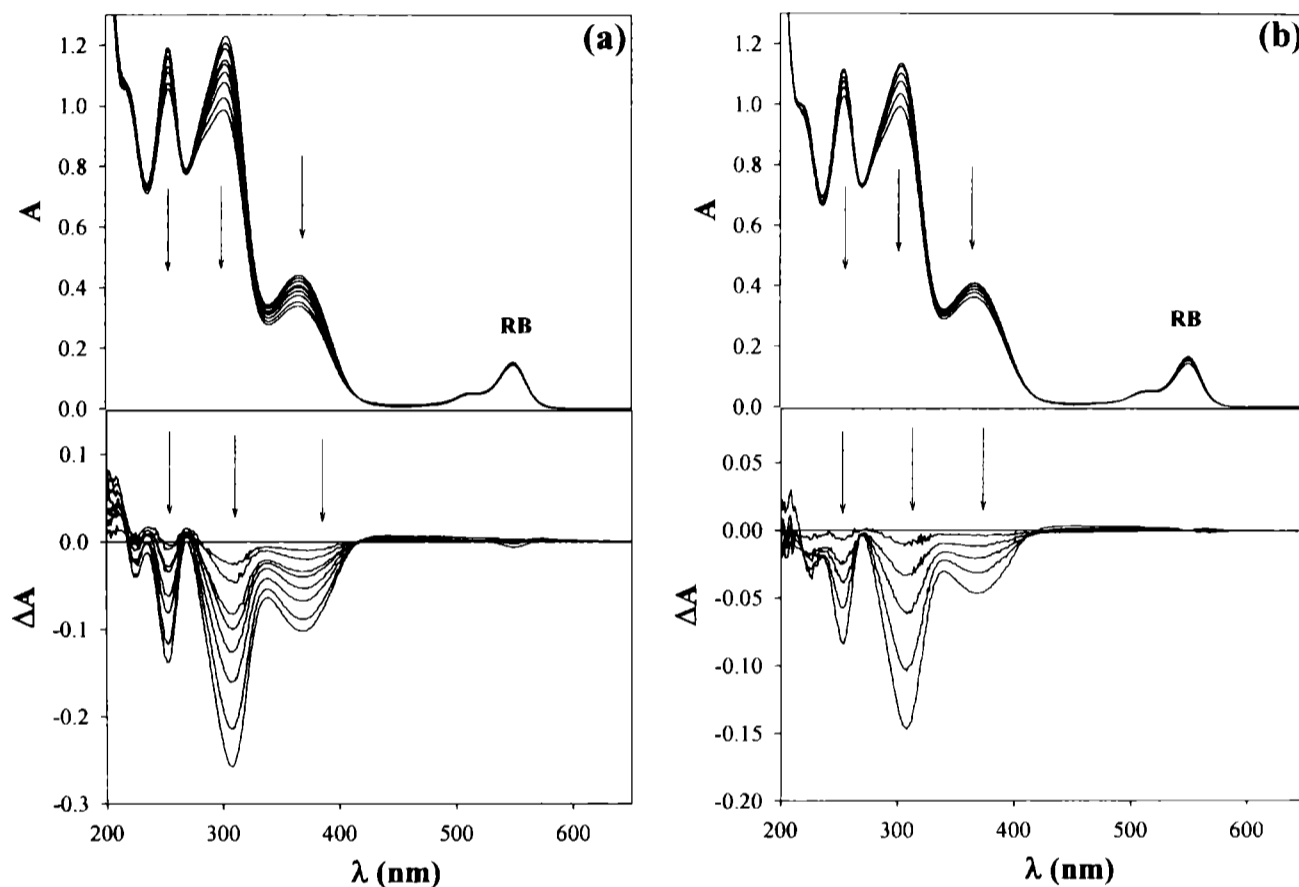


Figura 13.26: a) Superior: evolución del espectro de absorción de una solución de MAF ($[MAF]_0=488 \mu M$; pD 10,5) y RB en D₂O, al ser irradiada en presencia de O₂ ($\lambda_{EX}=547nm$). Los espectros fueron tomados cada 15 minutos. Inferior: los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de la mezcla inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación. b) Idem a) en H₂O. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y de 0,1 cm para registrar el espectro.

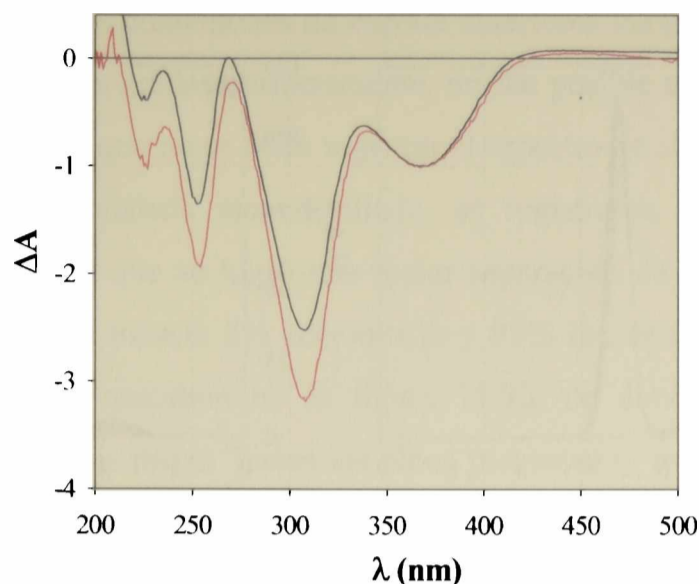


Figura 13.27: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de MAF (488 μM ; $\text{pD}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 30 minutos de irradiación en D_2O ; El espectro DEN (-) se obtuvo restando el espectro de MAF (450 μM ; $\text{pH}=10,5$) inicial al espectro obtenido después de 30 minutos de irradiación en H_2O .

En la figura 13.28 se muestran los cromatogramas correspondientes a soluciones en D_2O , irradiadas a distintos tiempos ($\lambda_{\text{EX}}=547\text{nm}$; $\text{pD}=10,4$). Estos cromatogramas se registraron usando como solvente de corrida una mezcla de 7% acetonitrilo y 93% buffer fosfato (ver capítulo 8). La figura 13.29 muestra con mayor detalle, los primeros minutos de los cromatogramas presentados en la figura 13.28. De manera comparativa, se presentan los cromatogramas registrados con cuatro longitudes de onda de análisis (230, 260, 300 y 340 nm). Puede apreciarse la presencia de varios picos (al menos 5) correspondientes a los productos de reacción entre el $^1\text{O}_2$ y el MAF; entre los cuales no parece estar presente FPT. En los cromatogramas registrados a 340 nm puede apreciarse que el área de los picos es menor que la observada en el análisis a 230 y 260 nm (figuras 13.29d, 13.29b y 13.29c, respectivamente). Estos resultados indican que los productos de reacción presentan mayores coeficientes de absorción a bajas longitudes de onda.

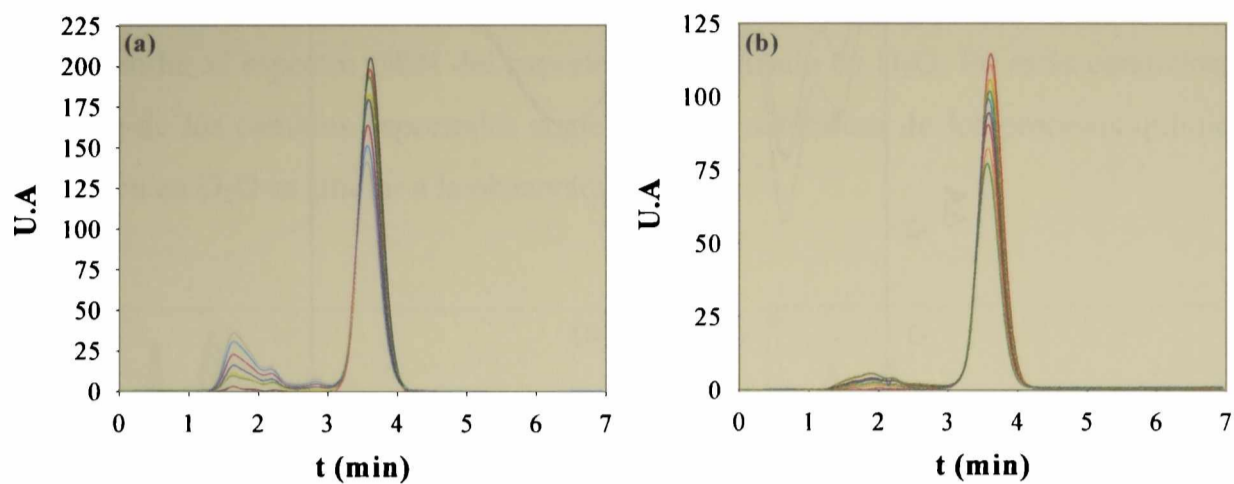


Figura 13.28: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de MAF ($[MAF]_0=488 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) y RB en D_2O , irradiadas cada 5 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547 \text{ nm}$). Solvente de corrida: mezcla 7% acetonitrilo y 93% buffer fosfato. a) $\lambda_{\text{análisis}}=230 \text{ nm}$. b) $\lambda_{\text{análisis}}=340 \text{ nm}$.

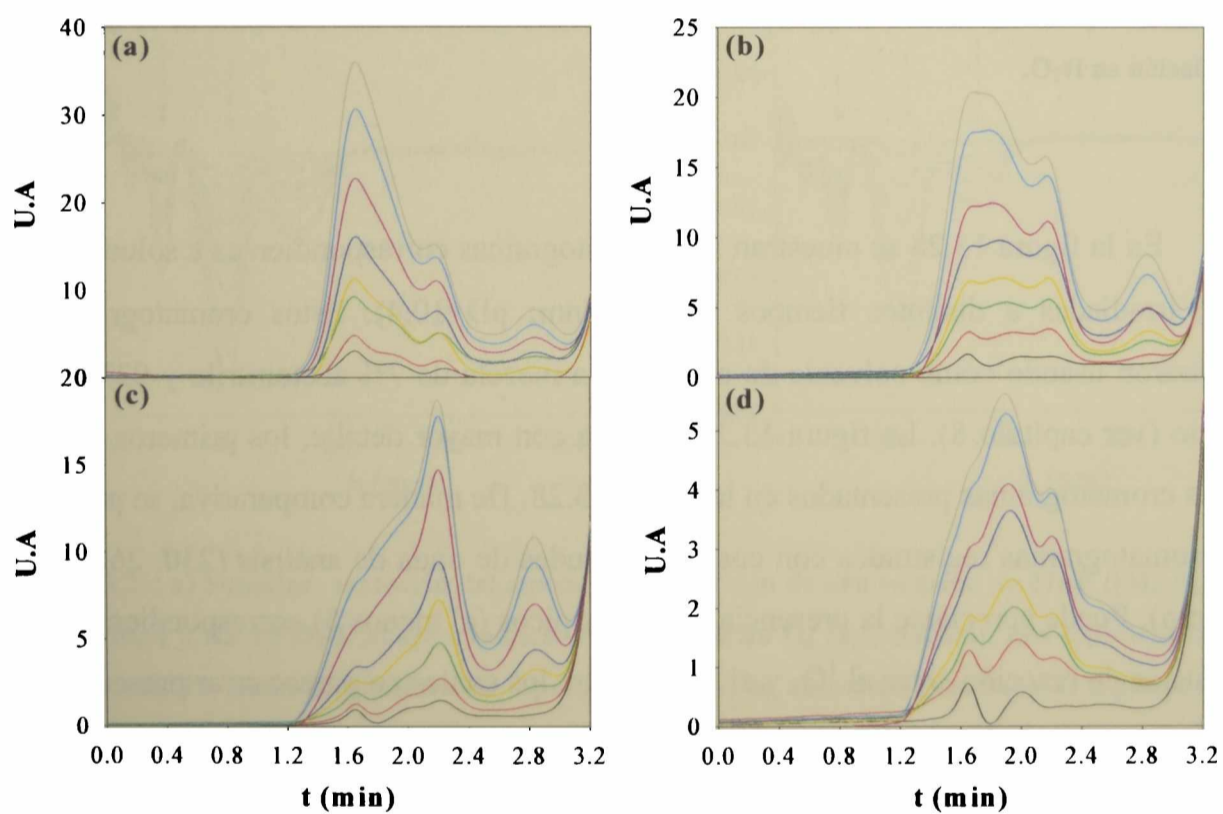


Figura 13.29: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de MAF ($[MAF]_0=488 \mu\text{M}$; $\text{pD}=10,5$) y RB en D_2O , irradiadas cada 5 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=547 \text{ nm}$). Solvente de corrida: mezcla 7% acetonitrilo y 93% buffer fosfato. a) $\lambda_{\text{análisis}}=230 \text{ nm}$. b) $\lambda_{\text{análisis}}=260 \text{ nm}$. c) $\lambda_{\text{análisis}}=300 \text{ nm}$. d) $\lambda_{\text{análisis}}=340 \text{ nm}$.

Debido a que en las condiciones de corrida anteriores los picos correspondientes a los productos no fueron separados correctamente, no fue posible un análisis más riguroso de los mismos; de manera que no se pudo registrar el espectro de absorción de los mismos. Para llevar a cabo un análisis más detallado, se registraron los cromatogramas en condiciones de corrida tal que se logró una mejor separación de los picos. Para esto, el solvente de corrida fue la mezcla 5% acetonitrilo y 95% buffer fosfato (ver capítulo 5). Estos cromatogramas se muestran en la figura 13.30, de donde puede apreciarse la presencia de, al menos, seis picos. Todos los picos presentan t_R menores a los 5 minutos. En estas condiciones de corrida el patrón de FPT presenta un t_R cercano a los 6 minutos; esto permite concluir que FPT no es uno de los productos de la reacción del MAF con el 1O_2 . Por otro lado, en la figura 13.31 se muestran los espectros de absorción, registrados con el HPLC, para los 4 picos con áreas más significativas, junto con el espectro del patrón de FPT. En esta figura puede apreciarse que los productos tienen espectros de absorción muy diferentes al de FPT. Este análisis corrobora la hipótesis que sostiene que FPT no es uno de los productos de la reacción de oxidación del MAF por 1O_2 .

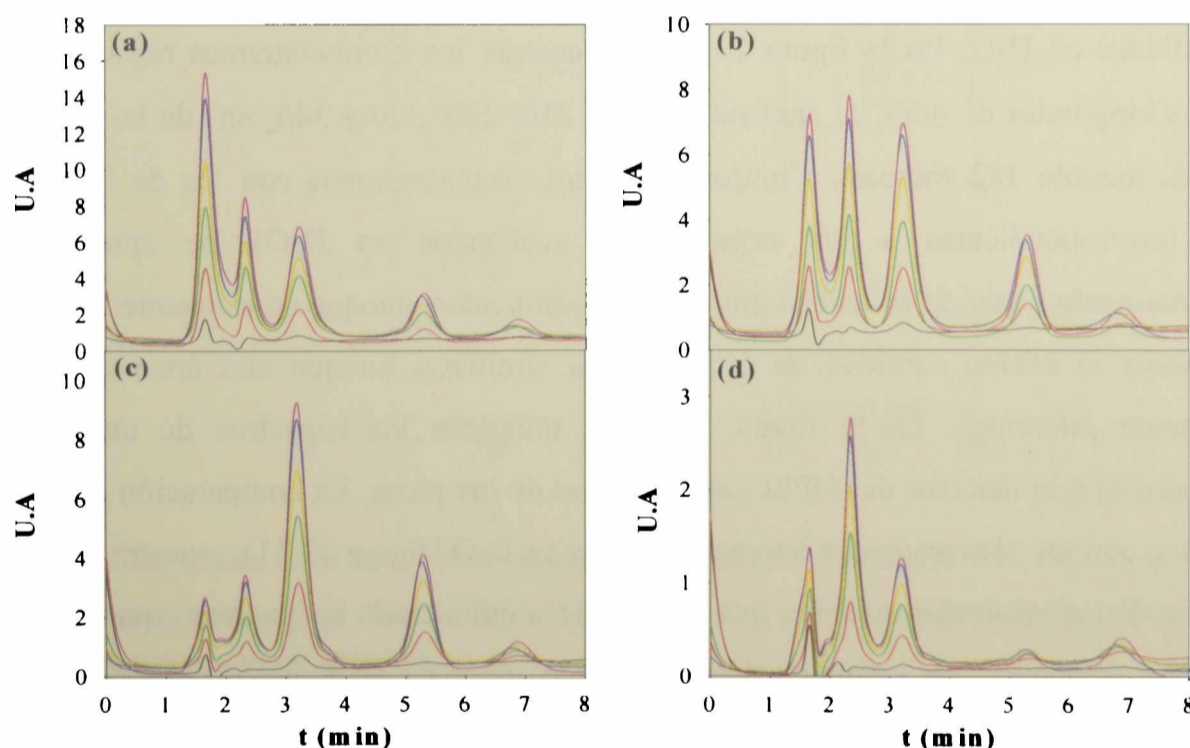


Figura 13.30: Cromatogramas correspondientes a las soluciones mezclas de MAF ($[MAF]_0=488 \mu M$; $pD=10,5$) y RB en D_2O , irradiadas cada 5 minutos ($\lambda_{EX}=547 \text{ nm}$). Solvente de corrida: mezcla 5% acetonitrilo y 95% buffer fosfato. a) $\lambda_{análisis}=230 \text{ nm}$. b) $\lambda_{análisis}=260 \text{ nm}$. c) $\lambda_{análisis}=300 \text{ nm}$. d) $\lambda_{análisis}=340 \text{ nm}$.

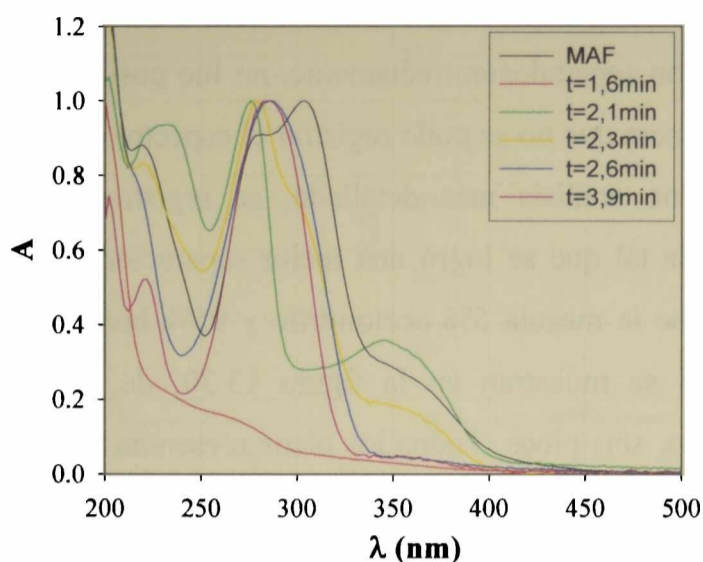


Figura 13.31: Espectros de absorción registrados sobre los picos con $t_R=1,6$; 2,1; 2,3; 2,6 y 3,9 minutos, de los cromatogramas de la figura 13.30. En negro se muestra el espectro de absorción correspondiente al MAF (pH=5,5).

Por otro lado, se realizó el mismo análisis cromatográfico para los experimentos desarrollados en H_2O . En la figura 13.32 se muestran los cromatogramas registrados a distintas longitudes de onda de análisis ($\lambda_{\text{análisis}}=230, 260, 300$ y 340 nm) de la solución irradiada durante 182 minutos. Comparando estos cromatogramas con los de la figura 13.30 (correspondientes a los experimentos realizados en D_2O), se aprecia un comportamiento parecido en ambos grupos de experimentos, aunque no exactamente igual. Se observa la misma cantidad de picos con t_R similares, aunque con áreas relativas ligeramente diferentes. En la figura 13.33 se muestran los espectros de absorción, registrados con el detector del HPLC, de cada uno de los picos. La comparación de estos espectros, con los observados en los experimentos en D_2O (figura 13.31), muestra que son similares. Estos resultados sugieren que la naturaleza química de los procesos que ocurren en ambos solventes son similares desde el punto de vista cualitativo; pero presentan diferencias desde el punto de vista cuantitativo. Estos resultados podrían justificar las diferencias observadas en los valores de k_r determinados en ambos solventes (en $(3,3\pm 0,5)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ en H_2O y $(1,9\pm 0,2)\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ en D_2O).

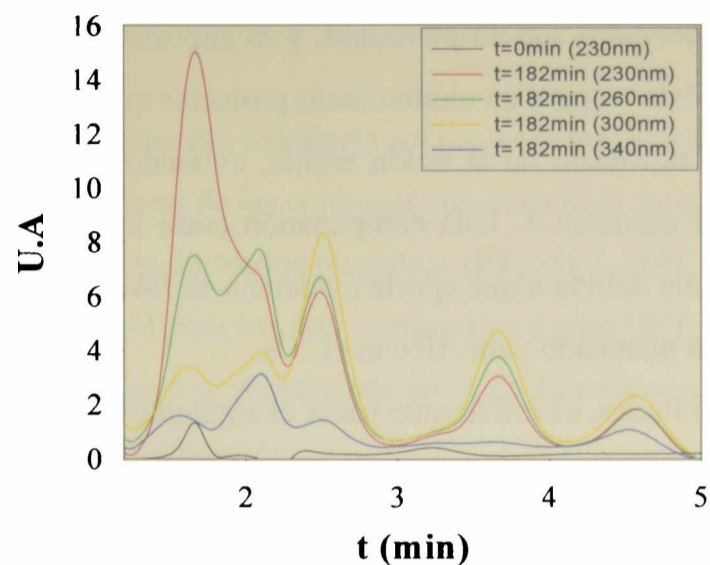


Figura 13.32: Cromatograma correspondiente a la mezcla MAF y RB en H₂O, irradiada 182 minutos ($\lambda_{EX}=547$ nm; las longitudes de onda de análisis son: 230, 260, 300 y 340 nm). En color negro se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla sin irradiar. Solvente de corrida: mezcla de 5% acetonitrilo y 95% de buffer fosfato.

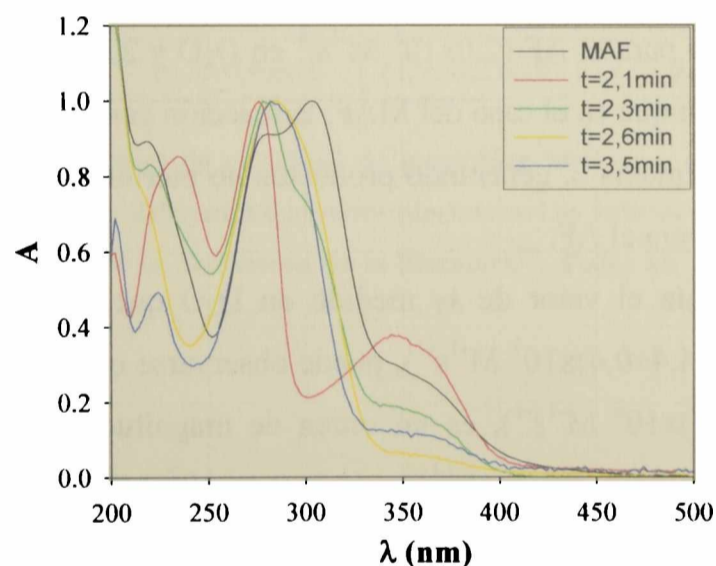


Figura 13.33: Espectros de absorción registrados sobre los picos con $t_R=2,1$; 2,3; 2,6 y 3,5 minutos, de los cromatogramas de la figura 13.32. En color negro se muestra el espectro de absorción correspondiente al MAF (pH=5,5).

En este punto es importante hacer una comparación con los resultados obtenidos para AF, donde se observaba la formación de FPT como producto de reacción, además de la presencia de otros productos de no pterínicos. Para el caso del MAF, los productos de

reacción con el $^1\text{O}_2$ observados son no-pterínicos, y es importante aclarar que no se observa la formación de FPT. Esto sugiere un cierto efecto protector que ejerce el grupo metilo que se encuentra unido al nitrógeno de la unión amida, evitando así la ruptura de la misma como se plantea en el esquema 3. Esta comparación entre los resultados obtenidos para MAF y AF es importante debido a que aporta evidencia en favor de las hipótesis acerca del mecanismo de reacción planteado para AF con el $^1\text{O}_2$.

En base a estos resultados, es interesante hacer el siguiente análisis comparativo:

- ✓ El valor de k_r^{MAF} medido en D_2O ($(1,9 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), es un orden de magnitud mayor al observado para PT ($k_r^{\text{PT}} = (2,5 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), también medido en D_2O . Nuevamente, esta diferencia puede explicarse en base al efecto donador de electrones del sustituyente en la posición 6 del anillo.
- ✓ Por otro lado, cabe destacar la similitud que existe, dentro de los errores experimentales, entre los valores de k_r^{MAF} ($(1,9 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $(3,3 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en D_2O y en H_2O , respectivamente) con los valores observados de k_{r1}^{AF} , presentados en la sección anterior para el AF ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en D_2O y $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en H_2O). Estos resultados sugieren que en el caso del MAF, la reacción con el $^1\text{O}_2$ sigue la ecuación (1) propuesta en el esquema 2, generando productos no pterínicos con la misma eficiencia que la observada para el AF.
- ✓ Teniendo en cuenta el valor de k_T medido en D_2O que se presentó en el capítulo anterior ($k_T^{\text{MAF}} = (4,4 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), puede observarse que el valor de k_r^{MAF} medido en D_2O ($(1,9 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), es un orden de magnitud menor comparado con la constante de *quenching* físico ($k_q^{\text{MAF}} = (4,2 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Esta diferencia puede explicarse sobre la base de lo expuesto en la sección anterior para el AF. El sustituyente de la posición 6 del doble anillo de pterina en el MAF es el ácido metil *p*-aminobenzoilglutámico, el cual está estructuralmente muy relacionado con el sustituyente del AF. Como se expuso anteriormente, estos sustituyentes pueden producir un aumento en la eficiencia de desactivación del $^1\text{O}_2$, no sólo por su tamaño relativamente grande, sino también por la presencia de grupos aminos, los cuales desactivan muy eficientemente $^1\text{O}_2$. Se ha descrito en la literatura que el PABA, que forma parte de la composición química de estos sustituyentes, presenta una elevada eficiencia de desactivación del $^1\text{O}_2$ ^[10].

13.2 Conclusiones.

En este capítulo se presentó evidencia acerca de la reactividad de las pterinas frente al $^1\text{O}_2$. Se calcularon los valores de las constantes de velocidad de la reacción química entre $^1\text{O}_2$ y la forma alcalina de seis derivados pterínicos (PT, MPT, DPT, HPT, AF y MAF). Las medidas se realizaron en D_2O para los seis compuestos y para HPT, AF y MAF también se hicieron las correspondientes determinaciones en H_2O . Los valores de k_r determinados en D_2O se listan en la tabla a continuación:

Compuesto	k_T ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_r ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_q ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
PT	^{a)} $(2,9\pm 0,3)\times 10^6$	$(2,5\pm 0,3)\times 10^5$	$(2,6\pm 0,3)\times 10^6$
HPT	$(3,1\pm 0,4)\times 10^6$	$(1,2\pm 0,1)\times 10^6$	$(1,9\pm 0,5)\times 10^6$
MPT	$(8,0\pm 0,6)\times 10^6$	$(4,9\pm 0,7)\times 10^6$	$(3\pm 1)\times 10^6$
DPT	$(4\pm 1)\times 10^7$	$(1,0\pm 0,2)\times 10^7$	---
AF	^{a)} $(3,0\pm 0,3)\times 10^7$	$(2,8\pm 0,3)\times 10^6$	$(2,7\pm 0,3)\times 10^7$
MAF	$(4,4\pm 0,4)\times 10^7$	$(1,9\pm 0,2)\times 10^6$	$(4,2\pm 0,4)\times 10^7$

Tabla 13.1: Valores de constantes de velocidad de *quenching* total (k_T), *quenching* químico (k_r) y *quenching* físico (k_q) de $^1\text{O}_2$ con diferentes derivados pterínicos. Los valores de k_T se presentaron en el capítulo anterior, excepto ^{a)} que se obtuvieron de la literatura^[1]. Todos los valores presentados en la tabla fueron medidos en D_2O .

De la tabla se observa que, PT presenta el valor de k_r más bajo, siendo este un orden de magnitud menor que el observado para los demás compuestos. Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta el efecto donador de electrones que ejercen los sustituyentes del anillo, aumentando así la densidad electrónica del mismo y consecuentemente su reactividad con el $^1\text{O}_2$. Por otro lado, para el AF, la diferencia también puede explicarse teniendo en cuenta la vía de reacción adicional que genera FPT como producto (ver esquemas 2 y 3).

En el caso de PT, MPT y HPT, los valores de las constantes de velocidad de *quenching* físico (k_q) observados son similares, dentro del error experimental. Esto indica que el proceso físico de desactivación del $^1\text{O}_2$ está dominado por la estructura química del

doble anillo pterínico y es independiente de la naturaleza del sustituyente.

El AF y MAF son los compuestos que presentan valores de k_q un orden de magnitud mayor que los valores de sus respectivas k_r . Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta la naturaleza química de los sustituyentes. El gran volumen relativo de los mismos y la presencia del grupo amino produce un incremento considerable en la desactivación del $^1\text{O}_2$. El ácido *p*-aminobenzoico forma parte de la estructura química de ambos sustituyentes, y se ha propuesto en la literatura que este compuesto presenta una eficiencia de desactivación del $^1\text{O}_2$ muy elevada, incluso mayor que la que presenta la azida sódica, que es un secuestrador muy selectivo de $^1\text{O}_2$.

13.3 Referencias.

- [1] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Martínez C. G., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 245 (2003).
- [2] "Fotofísica y Propiedades Fotosensibilizadoras de Pterinas en solución acuosa." Tesis doctoral Bioqca. Lorente C. (2003).
- [3] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **135**, 147 (2000).
- [4] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., García Einschlag F. S., Martino R., Baiocchi C., Pramauro E. y Capparelli A. L.; *Helvetica Chimica Acta*, **85**, 2300 (2002)
- [5] Thomas A. H., Lorente C., Capparelli A. L., Pokhrel M. R., Braun A. M. y Oliveros E.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 1 (2002).
- [7] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" Tesis doctoral Bioqco Thomas A, H. (2001).
- [8] Darmany A. P., Jenks W. S. y Jardon P.; *J. Phys. Chem. A*, **102**, 7420 (1998).
- [9] Gollnick K. y Lindner J. H. E.; *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1903 (1973).
- [10] Hu M-L., Chen Y-K, Chen L-C. y Sano M.; *Nutritional Biochemistry*, **6**, 504 (1995)
- [11] Foot C., Valentine J. S., Greenberg A. y Liebman J. F.; Chapman & Hall, ISBN 0751402923 (HB) 0751403717 (PB) (1995).

FOTÓLISIS DE 6-HIDROXIMETILPTERINA EN MEDIO ÁCIDO

En este capítulo, se expondrán los resultados del estudio fotoquímico realizado sobre soluciones ácidas de 6-hidroximetilpterina (HPT). Todos los experimentos descritos en este capítulo fueron realizados en condiciones de pH comprendidas entre 5,0 y 5,5. Teniendo en cuenta el equilibrio ácido-base detallado en el capítulo 2, la especie predominante, en estas condiciones de pH, es la denominada forma ácida o neutra de HPT. En particular, se desarrollaron experimentos de fotólisis con luz UV-A (350 nm) en diferentes atmósferas para determinar la participación del O₂ en las vías de fotooxidación. Para esto, un grupo de experimentos se realizó en soluciones aireadas (en presencia de O₂) y otro grupo en soluciones saturadas con Ar (en ausencia de O₂). Además, se determinó el valor del rendimiento cuántico de consumo de HPT (Φ^{HPT}) y el rendimiento cuántico de formación de H₂O₂ ($\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$), tanto en presencia como en ausencia de O₂. Se discute la participación del ¹O₂ en la reacción de fotooxidación directa de HPT, y se postula un mecanismo para dicha reacción.

14.1 Fotólisis en presencia de oxígeno.

En la figura 14.1a se muestra la evolución de los espectros de absorción de una solución de HPT (180 μM; pH=5,5) con el tiempo de irradiación. En la figura 14.1b se muestran los espectros DE obtenidos durante la fotólisis, en la cual se observa un punto isobéptico en 279 nm. Este punto isobéptico permanece sin cambios significativos durante los primeros 60 minutos de irradiación. A mayores tiempos de irradiación, se observan cambios en la posición del punto isobéptico, indicando la aparición de nuevos procesos químicos. Es importante destacar que no se observaron cambios en los espectros cuando se almacenaron las soluciones, previamente irradiadas, en la oscuridad. Esto indica que los cambios químicos son inducidos por la radiación incidente.

Con el propósito de obtener información sobre los productos de la reacción fotoquímica observada, se compararon los espectros DEN obtenidos durante el experimento de fotólisis con diferentes espectros DTN obtenidos, a su vez, a partir de distintos patrones. El procedimiento detallado de este tipo de análisis fue expuesto en la sección 8.3.2. En la figura 14.2a, se muestra el espectro DEN calculado a partir de la resta del espectro inicial de HPT al espectro obtenido después de irradiar 20 minutos. Este espectro DEN se compara con dos espectros DTN obtenidos de diferentes maneras: el espectro DTN-1 se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de 6-formilpterina (FPT), mientras que el espectro DTN-2 se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de 6-carboxipterina (CPT). Puede apreciarse que el espectro DEN es parecido al espectro DTN-2, lo cual sugiere que CPT podría ser un fotoproducto. Sin embargo, se logran mejores resultados obteniendo espectros DTN a partir de la combinación de espectros de CPT y FPT en distintas proporciones. En efecto, en la figura 14.2.6 se compara el espectro DEN con un espectro DTN que se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT a una combinación de los espectros de los patrones de FPT y CPT, en proporciones 15% y 85%, respectivamente. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones de pH, se forman al menos dos productos con espectros UV-visible similares al de FPT y CPT.

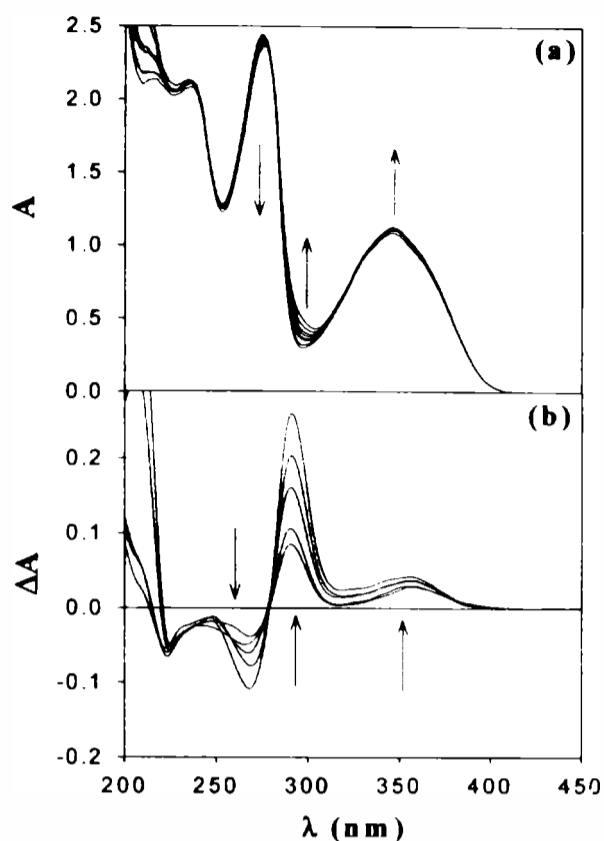


Figura 14.1: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT ($[HPT]_0=180 \mu M$; $pH=5,5$) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 5 min. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Espectros DE obtenidos restando el espectro de HPT inicial a los espectros obtenidos después de la irradiación.

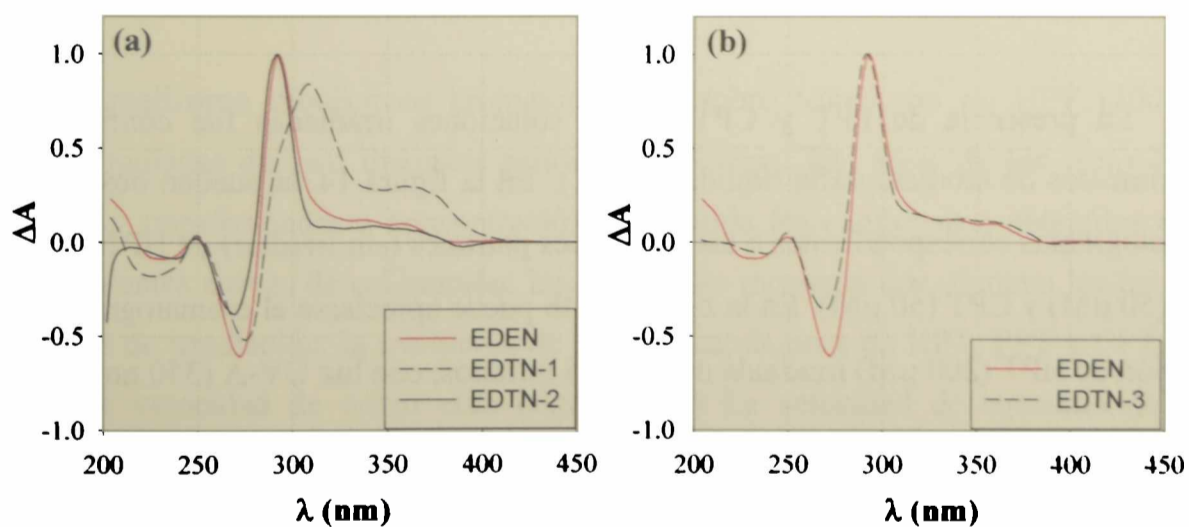


Figura 14.2: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 20 minutos de irradiación. a) El espectro DTN-1 (- - -) se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de FPT; el espectro DTN-2 (· · ·) se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de CPT. b) El espectro DTN-3 (- - -) se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT a una combinación de espectros de los patrones FPT y CPT, en proporciones 15 % y 85%, respectivamente.

Los experimentos de TLC muestran la presencia de tres compuestos fluorescentes en las soluciones irradiadas de HPT. Los valores de R_f de las correspondientes manchas coinciden con los R_f de los patrones de HPT, FPT y CPT (figura 14.3). La intensidad de la mancha correspondiente al reactivo disminuye al aumentar el tiempo de irradiación, a la vez que las correspondientes a FPT y CPT aumentan. Esto sugiere que durante los experimentos de irradiación hay un consumo de HPT y un aumento gradual de la concentración de FPT y CPT.

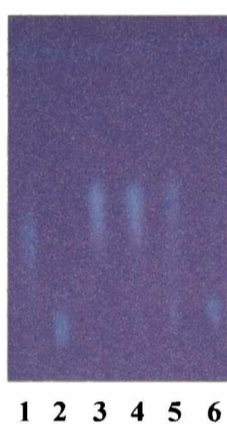


Figura 14.3: Corrida de TLC. Calle 1: solución patrón de FPT (100 μM). Calle 2: solución patrón de CPT (150 μM). Calle 3: solución patrón de HPT (150 μM). Calles 4 a 6: solución de HPT ($[\text{HPT}]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) irradiada 10, 30 y 55 minutos, respectivamente.

La presencia de FPT y CPT en las soluciones irradiadas fue confirmada por experimentos de cromatografía líquida (HPLC). En la figura 14.4a pueden observarse los cromatogramas correspondientes a las soluciones patrones (sin irradiar) de HPT (200 μM), FPT (50 μM) y CPT (50 μM). En la figura 14.4b puede apreciarse el cromatograma de una solución de HPT (200 μM) irradiada durante 15 minutos, con luz UV-A (350 nm).

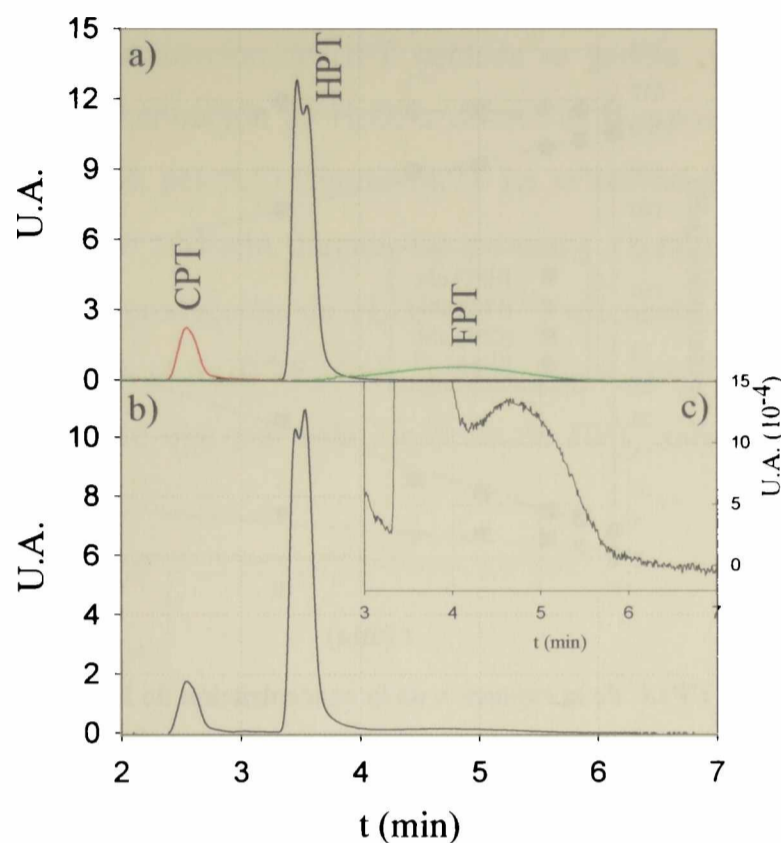


Figura 14.4: Cromatogramas. a) Soluciones patrón de HPT 200 μM ; FPT 50 μM y CPT 50 μM . b) Solución de HPT ($[\text{HPT}]_0=200 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) irradiada durante 15 minutos, con luz UV-A (350 nm). La longitud de onda de análisis es de 340 nm. c) Idem b), detalle de la banda FPT.

Se realizaron monitoreos cromatográficos sobre soluciones de HPT (200 μM ; $\text{pH}=5,5$) 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. Estas medidas muestran que, durante los primeros 15 minutos de irradiación, la evolución de las concentraciones de HPT, FPT y CPT sigue una ley de velocidad de orden cero (figura 14.5) La velocidad de consumo de HPT obtenida fue de $1,9\pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$, a su vez la velocidad de formación de FPT y CPT fue de $0,4\pm 0,1$ y $1,5\pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente. Teniendo en cuenta la luz absorbida por HPT ($P_a=8,2\times 10^{-4} \text{ E l}^{-1}\text{min}^{-1}$), el rendimiento cuántico de consumo de HPT es $(2,3\pm 0,2)\times 10^{-3}$, el valor del rendimiento cuántico de formación de FPT y CPT es $(5\pm 1)\times 10^{-4}$ y $(1,8\pm 0,3)\times 10^{-3}$, respectivamente. En la figura 14.5 se observa además que, durante los primeros 15 minutos de irradiación, la suma de las concentraciones de HPT, FPT y CPT permanece constante, indicando que FPT y CPT son los principales fotoproductos.

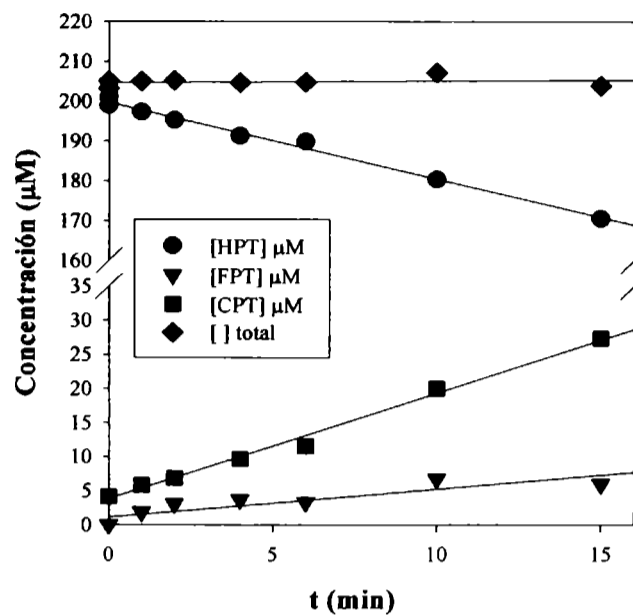


Figura 14.5: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de HPT, FPT y CPT en soluciones irradiadas de HPT ($[HPT]_0=200 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) en función del tiempo.

La evolución de la concentración de O_2 disuelto durante la irradiación fue monitoreada usando un electrodo selectivo. En la figura 14.6 se muestran estos resultados, donde puede apreciarse que la concentración de O_2 disminuye con el tiempo de irradiación.

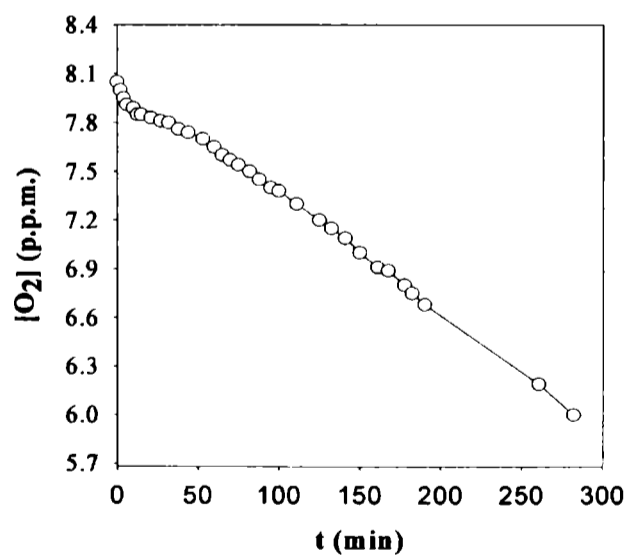


Figura 14.6: Evolución de la concentración de O_2 disuelto en soluciones de HPT ($[HPT]_0=150 \mu\text{M}$, $\text{pH}=5,4$) con el tiempo de irradiación.

Se detectó la presencia de H_2O_2 , en soluciones irradiadas de HPT, indicando que como producto de la fotooxidación de HPT también se genera esta especie reactiva de oxígeno. Se midió la concentración de H_2O_2 a diferentes tiempos de irradiación de una solución de HPT ($150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) (figura 14.7). La velocidad de producción de H_2O_2 estimada fue de $0,98 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 25 minutos de irradiación. El rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 ($\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$) calculado teniendo en cuenta el correspondiente valor de P_a ($4,6 \times 10^{-4} \text{ E l}^{-1} \text{ min}^{-1}$), es de $2,2 \pm 0,2 \times 10^{-3}$. La comparación entre el $\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$ y el Φ^{HPT} sugiere que por cada molécula de HPT consumida se produce una molécula de H_2O_2 .

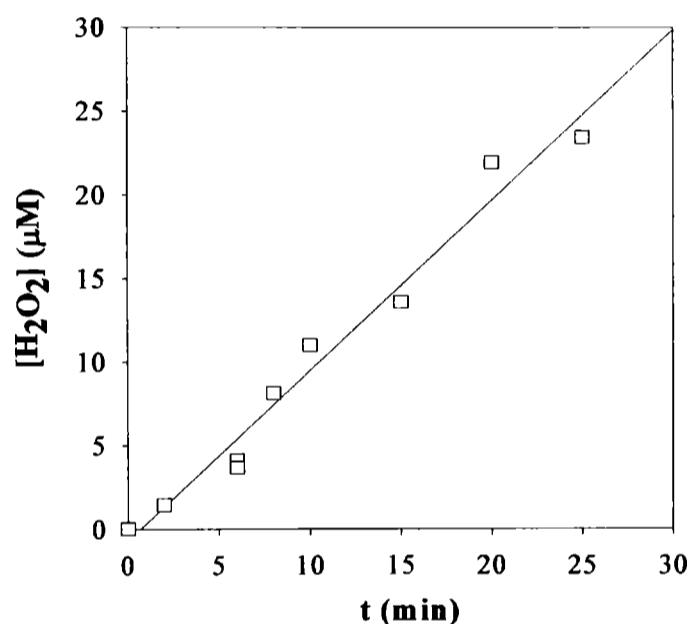


Figura 14.7: Evolución de la concentración de H_2O_2 en soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) con el tiempo de irradiación.

14.2 Fotólisis en ausencia de oxígeno.

En el capítulo 4 se expuso que FPT es un derivado pterínico fotosensible, cuya fotólisis da lugar a la formación de CPT. Sobre la base de estos conocimientos previos y teniendo en cuenta los resultados expuestos en la sección anterior, es importante determinar si en la fotólisis directa de la forma ácida de HPT, CPT es un fotoproducto de la fotólisis secundaria de FPT o si ambos fotoproductos observados (FPT y CPT) se generan a partir del reactivo HPT por vías paralelas. Para obtener mayor información en este

sentido y para conocer cuál es la participación del O_2 en la fotoquímica de HPT, se desarrollaron experimentos de fotólisis en ausencia de O_2 . En particular, se irradiaron soluciones de HPT previamente burbujeadas con Argón (Ar). Bajo estas condiciones se observaron cambios leves en el color de las soluciones. En la figura 14.8 puede apreciarse que la fotólisis anaeróbica de soluciones ácidas de HPT, llevan a la formación de, al menos, un compuesto con una banda ancha de absorción, de muy bajo coeficiente de absorción molar a 480nm. Los reactivos de pterinas comerciales disponibles, no presentan estas características espectrofotométricas y, por lo tanto, los espectros NED de estas fotólisis no coinciden con los espectros NRD obtenidos de las soluciones de los patrones comerciales.

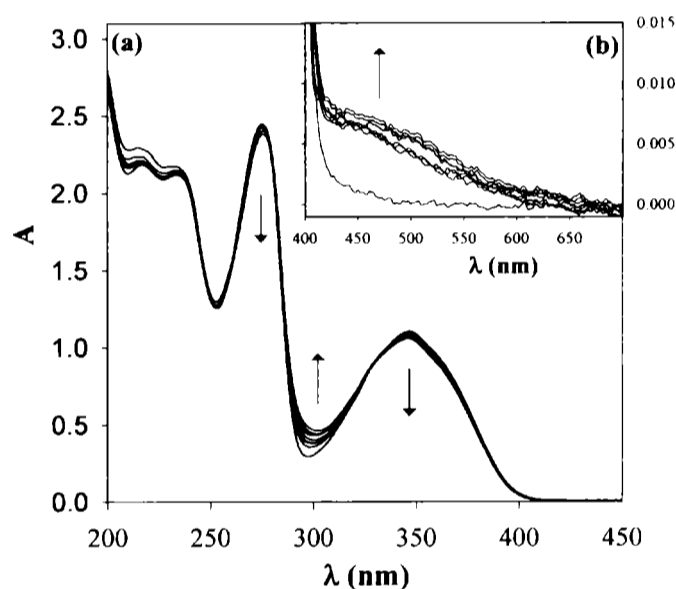


Figura 14.8: Evolución del espectro de absorción de soluciones irradiadas de HPT ($[HPT]_0=180 \mu M$; $pH=5,5$) con el tiempo. Los experimentos fueron desarrollados en ausencia de O_2 . Los espectros fueron registrados cada 10 minutos, las flechas indican los cambios observados a diferentes longitudes de onda.

Cuando se ponen en contacto las soluciones irradiadas en condiciones anaeróbicas, con aire u O_2 , se observa una reacción térmica. La banda con el máximo alrededor de 480 nm desaparece. Los espectros DEN obtenidos de la resta del espectro de una solución no irradiada de HPT con el espectro de una solución irradiada e inmediatamente aireada, coinciden con el espectro DTN-3 (ver sección 14.1) obtenido a partir de la resta del espectro del patrón de HPT a una combinación de los espectros de los patrones de FPT y

CPT. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones de pH, se forma un cromóforo como CPT y otro cromóforo como FPT, siendo estos los productos estables finales de la oxidación.

El análisis por TLC de soluciones irradiadas de HPT en condiciones anaeróbicas y después aireadas muestra la presencia de, al menos tres manchas fluorescentes, cuyos valores de R_f coinciden con los patrones de HPT, FPT y CPT (figura 14.9). La intensidad de la mancha fluorescente de HPT disminuye con el tiempo de irradiación. Mediante esta técnica no se detecta ningún otro fotoproducto.



Figura 14.9: Corrida de TLC. Calles 1: solución patrón de FPT (50 μM). Calle 2: solución patrón de CPT (100 μM). Calle 3: solución patrón de HPT (180 μM). Calles 4 a 6: solución de HPT ($[\text{HPT}]_0=180 \mu\text{M}$; pH=5,5) irradiada 10, 20 y 25 minutos, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el análisis por HPLC concuerdan con los de TLC, e indican que, tanto FPT como CPT son los únicos dos fotoproductos encontrados en soluciones de HPT irradiadas en ausencia de O_2 e inmediatamente aireadas. Durante los primeros 60 minutos de irradiación ($[\text{HPT}]_0=180\mu\text{M}$), la evolución de las concentraciones de HPT, FPT y CPT sigue una ley de velocidad de orden cero (figura 14.10). La velocidad de consumo de HPT fue de $0,21\pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$, a su vez la velocidad de formación de FPT y CPT fue de $0,02\pm 0,01$ y $0,19\pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente. Bajo las condiciones experimentales de irradiación ($P_a=1,1\times 10^{-4} \text{ E l}^{-1}\text{min}^{-1}$) el rendimiento cuántico de consumo de HPT es de $(2,0\pm 0,3)\times 10^{-3}$, el valor del rendimiento cuántico de formación de FPT y CPT es de $(2\pm 1)\times 10^{-4}$ y $(1,8\pm 0,3)\times 10^{-3}$, respectivamente. En la figura 14.10 puede apreciarse que, durante los primeros 60 minutos de irradiación, la concentración total de

compuestos de naturaleza pterínica (la suma de las concentraciones μM de HPT, FPT y CPT) permanece constante, indicando que FPT y CPT son los principales fotoproductos. Además, estos resultados son comparables con los valores de los rendimientos cuánticos observados en los experimentos realizados en presencia de O_2 ($\Phi_{\text{HPT}} = (2,3 \pm 0,2) \times 10^{-3}$, $\Phi_{\text{FPT}} = (5 \pm 1) \times 10^{-4}$ y $\Phi_{\text{CPT}} = (1,8 \pm 0,3) \times 10^{-3}$).

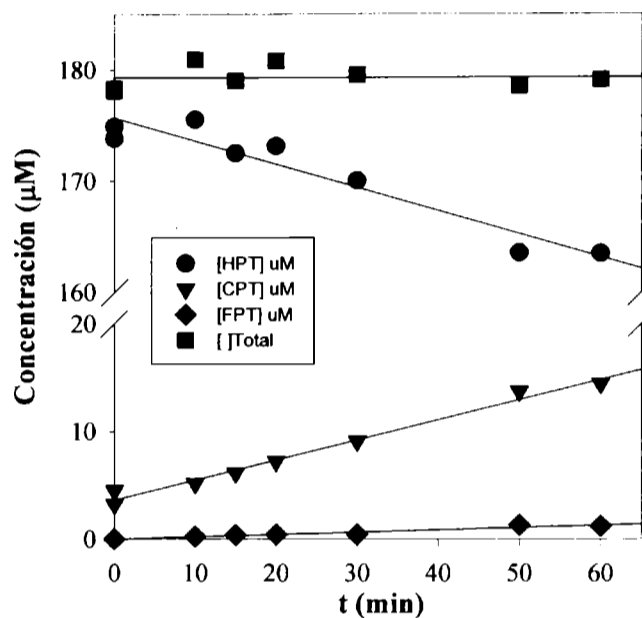


Figura 14.10: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de HPT, FPT y CPT con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0 = 180 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$). Los experimentos se desarrollaron en ausencia de O_2 . (■) Representa la suma algebraica de las concentraciones de HPT, FPT y CPT para cada tiempo de irradiación.

Adicionalmente, se realizaron medidas de H_2O_2 en soluciones de HPT ($180 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5,5$) irradiadas a diferentes tiempos e inmediatamente aireadas. Los resultados revelan que se genera H_2O_2 bajo estas condiciones experimentales. La velocidad de producción de H_2O_2 , durante los primeros 50 minutos de irradiación, fue de $0,27 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$. El rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 calculado a partir de este valor de velocidad, teniendo en cuenta que P_a fue $1,1 \times 10^{-4} \text{ E l}^{-1} \text{ min}^{-1}$, arrojó un valor de $(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$. Este valor de $\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$ es similar, dentro del error experimental, al rendimiento cuántico de consumo de HPT observado en los experimentos de fotólisis en ausencia de O_2 y luego aireando rápidamente ($\Phi^{\text{HPT}} = (2,3 \pm 0,2) \times 10^{-3}$). Estos resultados sugieren que se genera una molécula de H_2O_2 por cada molécula de HPT consumida. Por otro lado, el valor de $\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$

observado en esta sección es similar, dentro del error experimental, al $\Phi^{\text{H}_2\text{O}_2}$ observado en los experimentos realizados en presencia de O_2 ($(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$).

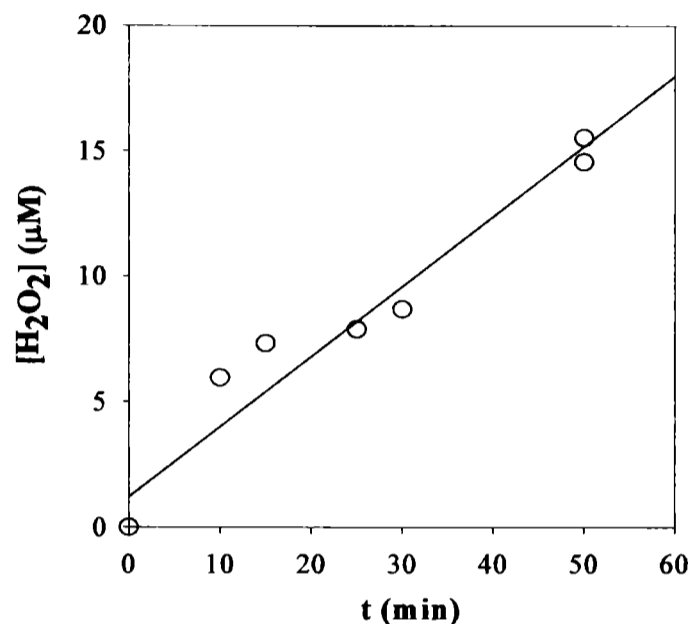
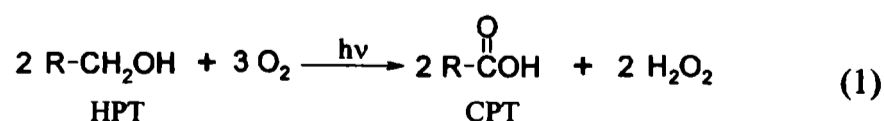
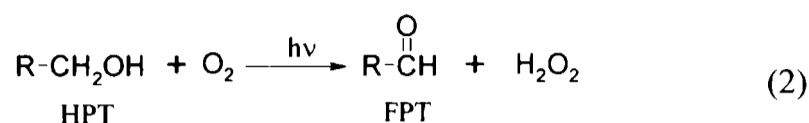


Figura 14.11: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación, cuando se irradia en ausencia de O_2 , e inmediatamente se airean soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0 = 180 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5,5$).

Comparando los resultados obtenidos en la fotólisis en presencia y ausencia de O_2 (sección 14.1 y 14.2, respectivamente) puede apreciarse que en ambos grupos de experimentos se forman los mismos fotoproductos (FPT, CPT y H_2O_2), y con la misma eficiencia. Estos resultados sugieren que en ambas condiciones experimentales la reacción ocurre a través del mismo mecanismo de reacción, en donde el átomo de carbono del sustituyente sufre diferentes grados de oxidaciones, para formar los fotoproductos FPT y CPT. Este átomo de carbono, en HPT tiene un estado de oxidación igual a -1, en FPT el estado de oxidación es igual a +1 y en CPT es +3. Teniendo en cuenta los resultados presentados hasta aquí, pueden plantearse las siguientes reacciones químicas globales para interpretar los cambios observados:





En el capítulo 4 se hizo una breve descripción de los antecedentes en la literatura acerca del comportamiento fotoquímico de las pterinas. En ese capítulo se expuso que, para algunos derivados pterínicos^[1-4], las reacciones de fotooxidación ocurren a través de la formación de un intermediario rojo (estable en ausencia de O₂) con una banda de absorción a 480 nm muy característica. En todos estos casos, se describe la formación de un único intermediario, y en particular, se ha propuesto que se trata de un 6-acil-5,8-dihidropterina, el cual reacciona rápidamente con el O₂, oxidándose. Tal como se muestra en la figura 14.8, durante la fotólisis anaeróbica de HPT se forma un producto que, por sus características espectroscópicas, podría ser un 6-acil-5,8-dihidroderivado. Sin embargo, en este caso tal intermediario, que podría ser 6-formil-5,8-dihidropterina, parece estar en una concentración muy baja.

Sobre la base de estos antecedentes, podría plantearse que la irradiación de la forma ácida de HPT en condiciones de anaerobiosis da lugar a la formación de dos intermediarios, cada uno de los cuales podría reaccionar con el O₂ disuelto en el medio, para dar los productos de oxidación FPT y CPT, respectivamente (ver figura 14.12). Esta hipótesis está planteada esquemáticamente en la figura 14.12.

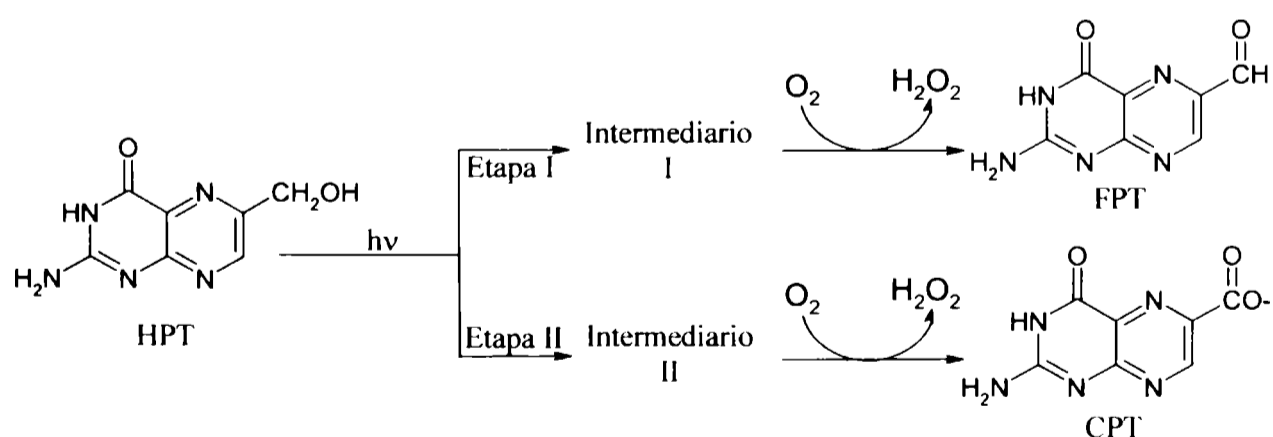


Figura 14.12: Esquema de la fotooxidación de HPT en soluciones acuosas ácidas (pH comprendido entre 5,0 y 5,5) bajo irradiación con luz UV-A (350 nm).

El Intermediario I podría ser 6-formil-5,8-dihidropterina, el cual podría reaccionar con O_2 de forma similar a la que reaccionan los otros 5,8-dihidroderivados descritos en la literatura (BPT, NPT, FPT), es decir podría oxidarse a FPT. Por otra parte, CPT podría generarse por la reacción del O_2 con un tautómero de la 6-formil-5,8-dihidropterina, el cual se encuentra representado en la figura 14.13. Este tipo de reacciones han sido descritas en la literatura^[5,6].

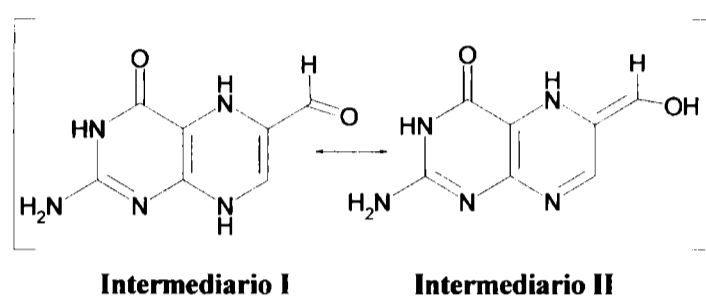


Figura 14.13: Equilibrio tautomérico entre los intermediarios I y II.

Considerando el esquema de reacción planteado en la figura 14.12, conjuntamente con la estructura química posible de cada uno de los intermediarios (I y II) y en base a las relaciones estequiométricas, puede plantearse el siguiente esquema de reacción general (figura 14.14).

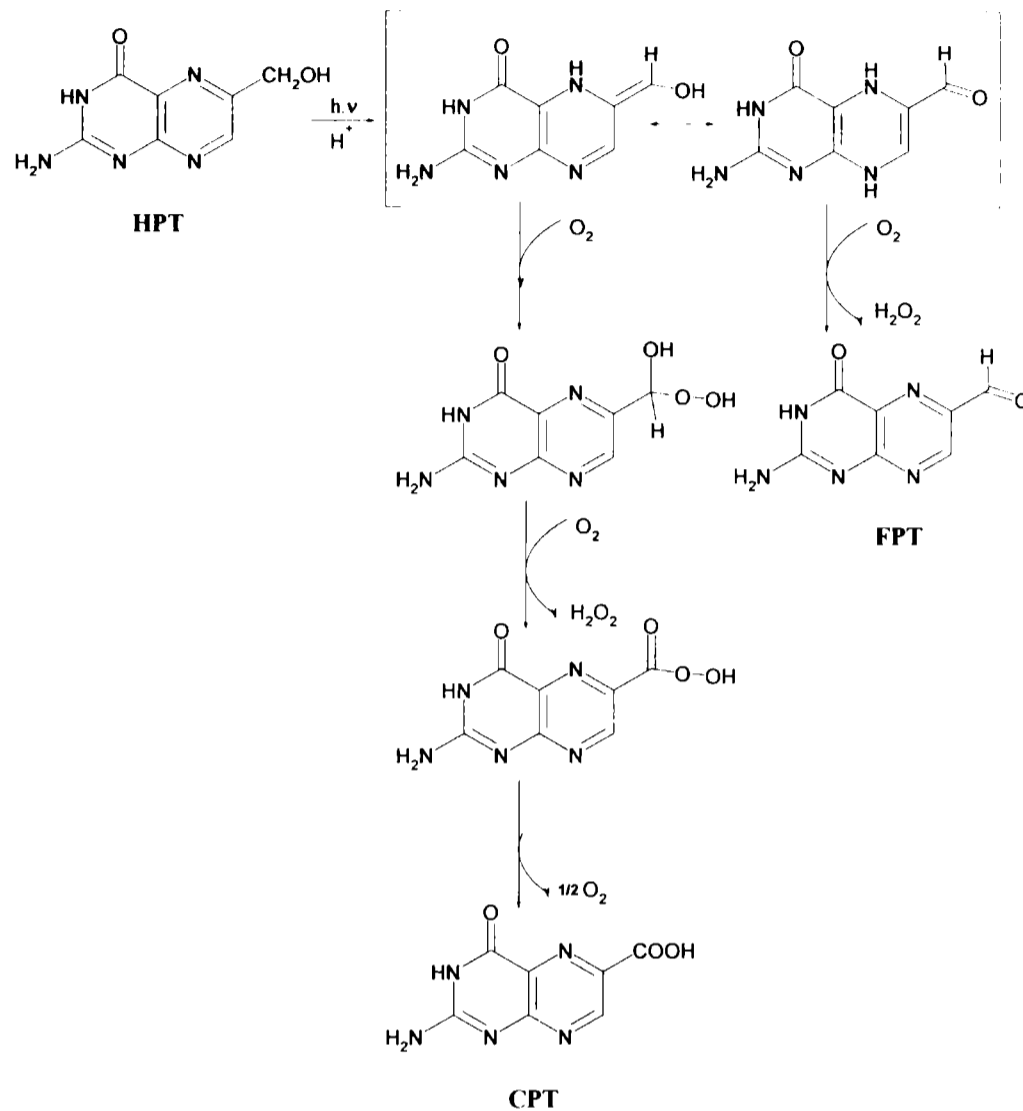


Figura 14.14: Esquema de fotooxidación de HPT en soluciones acuosas alcalinas (pH comprendido entre 10,0 y 10,5) bajo irradiación con luz UV-A (350 nm).

14.3 El rol del oxígeno singlete.

Los resultados expuestos en las secciones 14.1 y 14.2 sugieren que el oxígeno singlete (1O_2) no participa en las etapas que conducen a la formación de FPT y CPT, porque la formación de FPT y CPT a partir de los intermediarios I y II, respectivamente, tiene lugar en ausencia de radiación UV-A. En esta sección se analizará con mayor detalle cual es el rol del 1O_2 en las vías de fotooxidación de HPT, y para esto se presentarán los resultados de los experimentos de fotólisis realizados en D_2O .

14.3.1 Fotólisis en agua deuterada.

Como se explicó en el capítulo 8, esta clase de experimentos permiten evaluar, indirectamente, la participación del $^1\text{O}_2$ en los mecanismos de fotooxidación de HPT. Para esto, se irradiaron soluciones aireadas de HPT ($260 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) en D_2O y los resultados se compararon con aquellos obtenidos en las fotólisis en H_2O . Se registraron los espectros de absorción de ambos experimentos de fotólisis en función del tiempo de irradiación, y se calcularon los correspondientes Espectros DE (figura 14.15). En esta figura pueden apreciarse las diferencias observadas entre ambos grupos de experimentos, principalmente, en la región del espectro comprendida entre 320 y 400 nm. En la figura 14.16 se comparan los espectros DEN obtenidos para los experimentos realizados en los dos solventes (H_2O y D_2O) donde puede apreciarse con mayor claridad las diferencias observadas. Estos resultados sugieren que la naturaleza química de los procesos que ocurren en ambos grupos de experimentos es diferente. Esto indica que la reacción de HPT con $^1\text{O}_2$ no es la vía principal del mecanismo de fotooxidación de HPT.

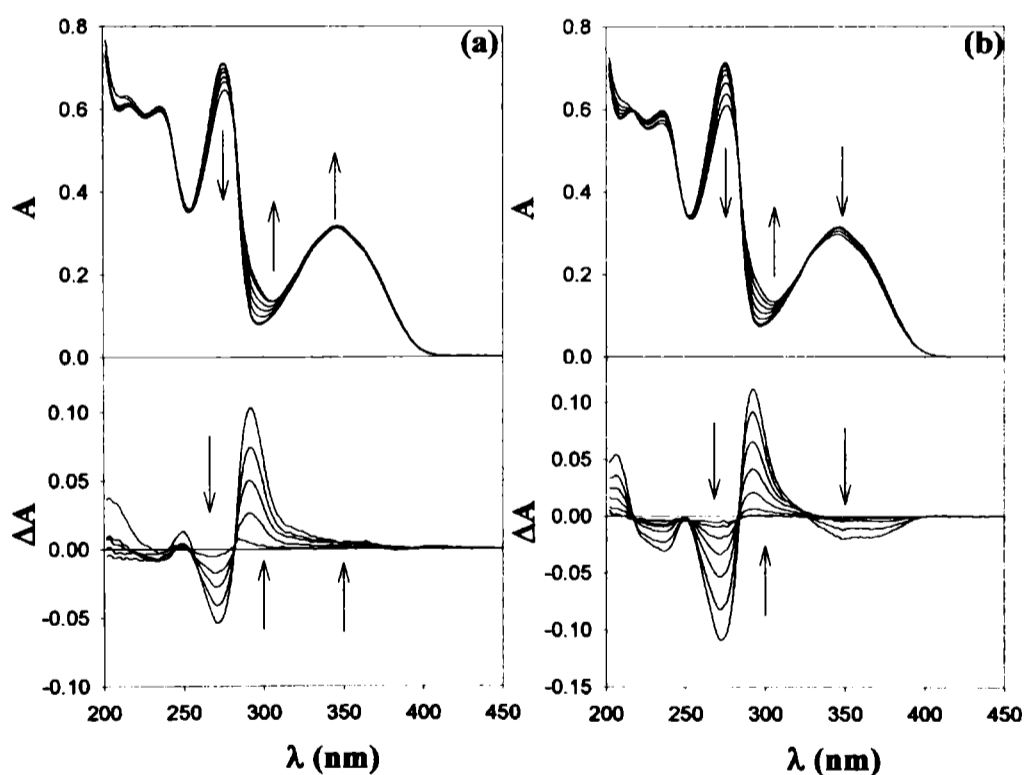


Figura 14.15: a) Superior: evolución del espectro de absorción de una solución en H_2O de HPT ($[\text{HPT}]_0=260 \mu\text{M}$; $\text{pD}=5,5$) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 5 minutos; inferior: los espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de HPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación. b) Idem a) en D_2O . Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y 0,2 cm para la observación.

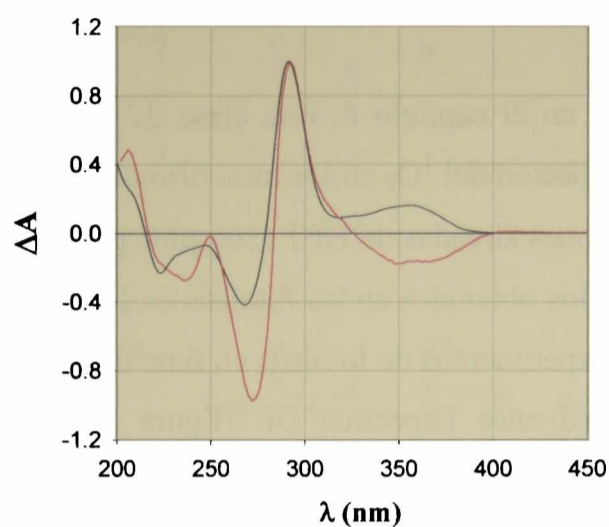


Figura 14.16: El espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 45 minutos de irradiación en H₂O. El espectro DEN () se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 45 minutos de irradiación en D₂O.

14.4 Conclusión.

La excitación con luz UV-A (350 nm) de la forma ácida de HPT, en presencia de O₂, lleva a la oxidación de la molécula, en particular del sustituyente en la posición 6 del anillo pterínico. Los productos de fotooxidación generados son FPT y CPT, ambos de naturaleza pterínica. El rendimiento cuántico asociado al consumo de HPT es $(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ y los rendimientos cuánticos de formación de FPT y CPT son $(5 \pm 1) \times 10^{-4}$ y $(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-3}$, respectivamente. Estos resultados sugieren que FPT y CPT son los únicos fotoproductos generados.

Los resultados de los experimentos de fotólisis irradiando en ausencia de O₂ y aireando inmediatamente, muestran un comportamiento similar al descrito en el párrafo anterior, con valores de rendimientos cuánticos similares, dentro del error experimental. Estos resultados sugieren que el mecanismo de fotooxidación global es el mismo en ambas condiciones atmosféricas. La fotooxidación de HPT parece ocurrir a través de dos etapas principales: la primera ocurre en ausencia de O₂, y debido a la absorción de luz por parte de HPT, se generan dos intermediarios (intermediarios I y II, ver figura 14.13); en la segunda etapa, cada uno de estos intermediarios reacciona con O₂ para dar FPT y CPT, respectivamente. Debido al perfil espectral y la reactividad frente al O₂ que presentan estos intermediarios, se ha postulado que el intermediario I podría ser 6-formil-5,8-

dihidropterina y el intermediario II podría ser un tautómero del intermediario I cuya estructura química se muestra en la figura 14.13.

Durante la fotooxidación de HPT se genera H_2O_2 , con un rendimiento cuántico igual a $(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$. Estos resultados sugieren que se genera una molécula de H_2O_2 por cada molécula de HPT consumida. En los experimentos de fotólisis en atmósfera de Ar y luego aireados rápidamente, se observa un rendimiento cuántico de formación de H_2O_2 igual a $(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-3}$. Estos resultados sugieren que el H_2O_2 es probablemente el producto de la reacción térmica entre los intermediarios I y II y el O_2 .

En el capítulo 12 se presentó evidencia en favor de la capacidad sensibilizadora de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que tiene la molécula de HPT bajo los efectos de la radiación UV-A en soluciones acuosas ácidas ($\Phi_{\Delta}^{\text{ap}} = 0,15 \pm 0,02$). Sin embargo, los experimentos realizados en D_2O indican que el $^1\text{O}_2$ no participa en la principal vía de fotooxidación de HPT para dar FPT y CPT.

14.5 Referencias.

- [1] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Capparelli A. L., *Helv. Chim. Acta*, **84**, 3849 (2001).
- [2] Baur R., Kappel M., Mengel R., Pfeleiderer W.; in “*Chemistry and Biology of Pteridines*”, Eds. R. L. Kisliuk, G. M. Brown, Elsevier/North Holland, New York, (1979).
- [3] Pfeleiderer W., Kappel M., Baur R., in “*Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*”, Eds. W Pfeleiderer, H. Wachter, H. Ch. Curtius, Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York, **3**, 3 (1984).
- [4] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R., Capparelli A. L., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **135**, 147 (2000).
- [5] Griesbeck A. G., El-Idreesy T. T., Adam W., Krebs O., “*Ene-reaction with Singlet Oxygen*”, in “*CRC Handbook of Photochemistry and Photobiology*”, Eds. W. M Horspool and P.-S Sing, CRC, Boca Raton, Florida, Cap. 8, p. 8, (2004).
- [6] March J. “*Advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms and structure*”, 4th edition. Ed. Wiley Interscience, (1992).

FOTÓLISIS DE 6-HIDROXIMETILPTERINA EN MEDIO ALCALINO

En el capítulo 14 se expusieron los resultados del estudio fotoquímico realizado sobre soluciones ácidas de 6-hidroxipterina (HPT). Puede apreciarse una transformación química de 6-hidroxipterina (HPT) en 6-carboxipterina (CPT) inducida por la radiación absorbida. Teniendo en cuenta el comportamiento observado en medio ácido, se decidió investigar que ocurre en condiciones de pH donde sólo se encuentra la forma alcalina (pH 10,5). Este estudio se realizó en soluciones aireadas y en soluciones en ausencia de O₂ (saturadas en Ar). De esta manera, se hizo un análisis comparativo entre las distintas condiciones experimentales, postulándose un posible mecanismo de reacción. Además, se realizaron medidas para determinar la capacidad que tiene HPT, en estas condiciones de pH, de generar H₂O₂.

15.1 Fotólisis en presencia de oxígeno.

En la figura 15.1a se aprecian los cambios espectrales generados al irradiar una solución alcalina de HPT con luz UV-A (350nm). Los espectros DE obtenidos durante la fotólisis se muestran en la figura 15.1.b, en la cual se observa un punto isobéptico en 268 nm. Este punto isobéptico, permanece sin cambios significativos durante los primeros 14 minutos de irradiación. A mayores tiempos de irradiación, se observan variaciones en la posición del punto isobéptico, indicando la aparición de nuevos procesos químicos. Es importante destacar que no se observaron cambios cuando se almacenaron las soluciones previamente irradiadas en la oscuridad. Esto indica que los cambios químicos son inducidos por la radiación incidente.

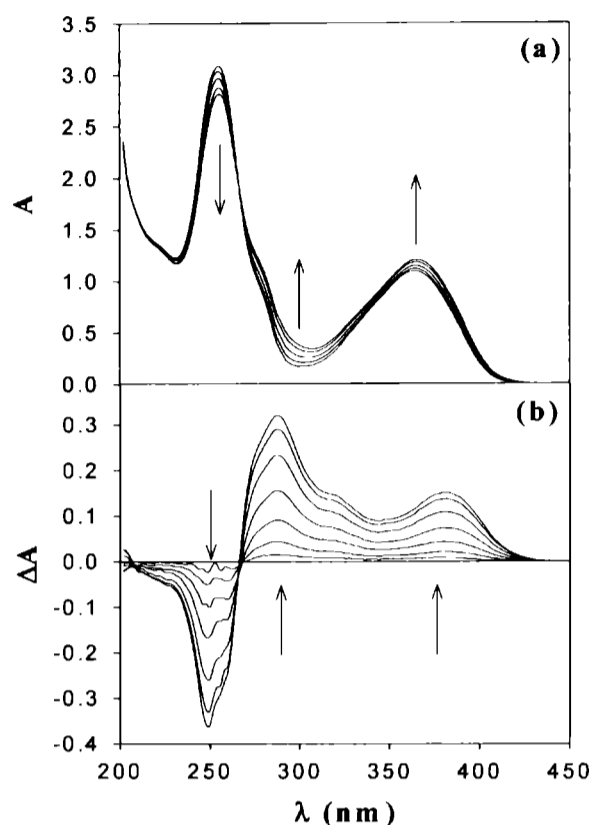


Figura 15.1: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT ($[HPT]_0=150 \mu M$, pH 10,5) al ser irradiada en presencia de O_2 . Los espectros fueron tomados cada 2 min. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm. para la irradiación y la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de HPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación (cada 2 minutos).

Los resultados presentados en el capítulo anterior mostraron que, cuando se irradian soluciones acuosas de HPT ($\lambda_{EX}=350 \text{ nm}$) en medio ácido, se obtiene CPT como producto mayoritario. En base a estos resultados, se decidió hacer el análisis espectral comparando los EDEN obtenidos a partir de los espectros mostrados en la figura 15.1, con el espectro DTN-1 obtenido a partir de la resta de los espectros de soluciones patrón de HPT y CPT, ambas de igual concentración y pH (ver capítulo 9). En la figura 15.2a, se aprecia que el espectro DEN es muy diferente en relación al espectro DTN-1. Estos resultados sugieren que, en medio alcalino, el mecanismo de fotooxidación de HPT es diferente al observado en medio ácido.

Por el contrario, si se supone que en medio alcalino el producto de reacción es FPT, puede calcularse el correspondiente espectro DTN-2, obtenido a partir de la resta de los espectros de soluciones patrón de HPT y FPT, ambas de igual concentración y pH. En la

figura 15.2b, se observa que el espectro DEN es similar al espectro DTN-2. En estas condiciones de pH, el análisis de los cambios espectrales sugiere la conversión de HPT en un producto con un espectro de absorción UV-visible similar al de FPT.

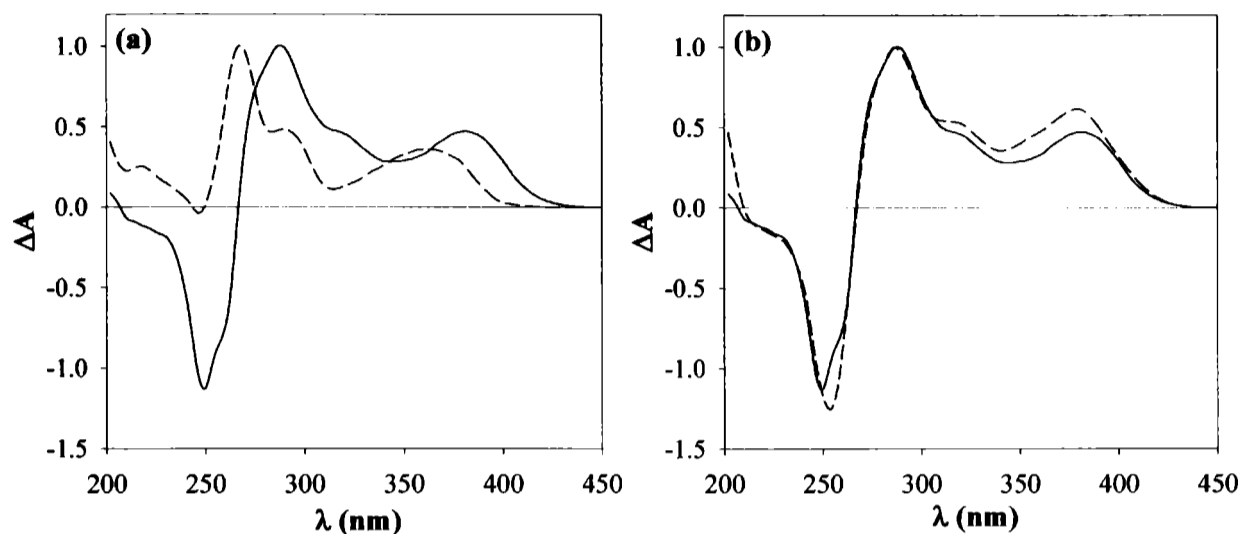


Figura 15.2: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de (HPT) inicial al espectro obtenido después de 4 minutos de irradiación; a) El Espectro DTN-1 (- - -) se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de (CPT) de igual concentración y pH. b) El Espectro DTN-2 (- - -) se obtuvo restando el espectro del patrón de HPT al espectro del patrón de (FPT) de igual concentración y pH.

Los experimentos de TLC muestran la presencia de dos o tres manchas fluorescentes en las soluciones irradiadas de HPT, según sea el tiempo de irradiación ($t=0$, 10, 30 y 55 minutos), con valores de R_f similares a los patrones de HPT, FPT y CPT (figura 15.3). Los experimentos llevados a cabo a diferentes tiempos de irradiación, revelan que CPT aparece en las manchas correspondientes a tiempos de irradiación largos. En este punto es importante tener en cuenta los resultados publicados en la literatura para la fotoquímica de FPT en soluciones acuosas alcalinas en presencia de O_2 , donde FPT se transforma en CPT^[1]. Estos resultados, sumados a otros que se detallan más adelante, nos permiten suponer que la presencia de CPT, a tiempos largo de irradiación, se debe a la fotólisis secundaria que sufre FPT. En la figura 15.3, puede observarse que no se detectan otros productos fluorescentes además de los tres mencionados. Esto sugiere que la única vía de descomposición de HPT, en estas condiciones, es su oxidación a FPT.

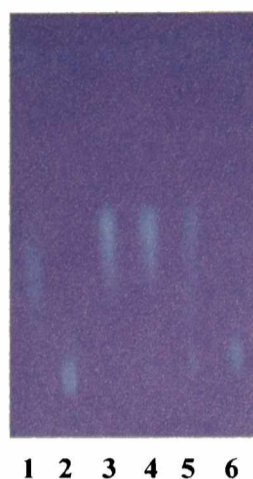


Figura 15.2: Corrida de TLC. Calles: 1, solución de FPT 100 μM ; 2, solución de CPT 150 μM ; 3 y 4, solución de HPT ($[\text{HPT}]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) irradiada 0, 10, 30 y 55 minutos respectivamente.

La presencia de FPT y CPT en las soluciones irradiadas fue confirmada por experimentos de cromatografía líquida HPLC. En la figura 15.4a se muestran los cromatogramas correspondientes a soluciones patrones (sin irradiar) de HPT (100 μM), FPT (100 μM) y CPT (50 μM). En la figura 15.4b se muestra el cromatograma de una solución de HPT (350 μM) irradiada durante 20 minutos ($\lambda_{\text{EX}}=350 \text{ nm}$). En todos los casos, la longitud de onda de análisis fue de 340 nm.

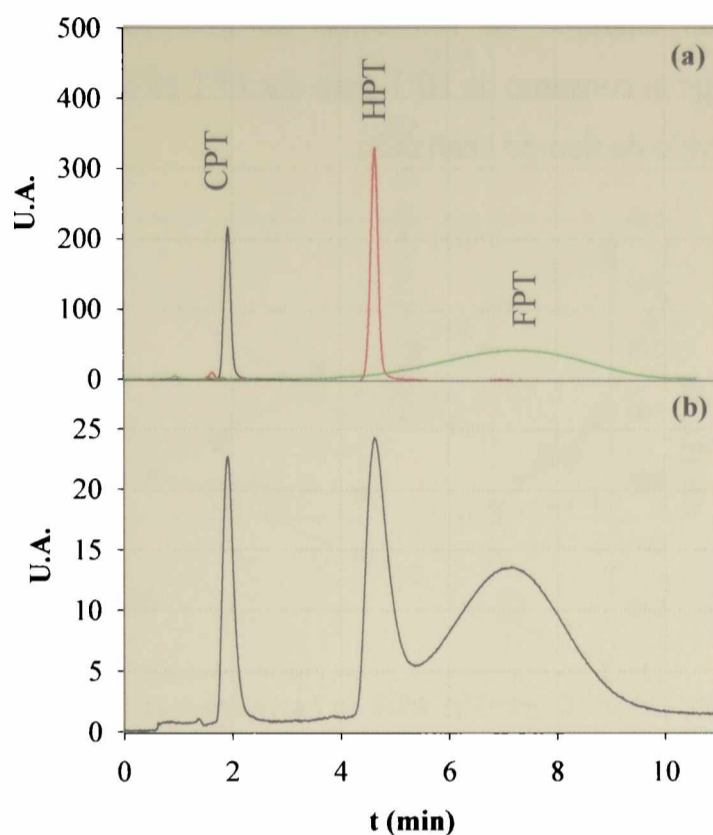


Figura 15.3: Cromatogramas. a) Soluciones patrón de HPT 100 μM ; FPT 100 μM y CPT 50 μM . b) Solución de HPT 350 μM (pH=10,5) irradiada durante 20 min, con luz UV-A de longitud de onda de 350 nm. La longitud de onda de análisis es de 340 nm.

Se realizaron experimentos irradiando soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0=350 \mu\text{M}$; pH=10,5). Se registraron los cromatogramas de soluciones irradiadas a distintos intervalos de tiempo. Se integró el área de cada pico, y dichas áreas fueron transformadas a concentración empleando los coeficientes obtenidos en las correspondientes curvas de calibración (ver capítulo 9).

Los resultados obtenidos muestran que durante los primeros 5 minutos de irradiación, la evolución de las concentraciones de HPT y FPT con el tiempo de irradiación, sigue una ley de velocidad de orden cero (figura 15.4). La velocidad de degradación de HPT obtenida fue de $13,7 \pm 0,8 \mu\text{M}/\text{min}$, a su vez la velocidad de formación de FPT fue de $12,9 \pm 0,9 \mu\text{M}/\text{min}$. En esta primera etapa no se observa un incremento significativo en la concentración de CPT. Bajo estas condiciones experimentales puede asumirse que HPT absorbe la totalidad de la radiación incidente. En estas condiciones, el rendimiento cuántico de consumo de HPT medido arrojó un valor de $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-2}$ y el

valor del rendimiento cuántico de formación de FPT fue de $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$. Estos resultados sugieren que el consumo de HPT para dar FPT es el único proceso químico que tiene lugar en el intervalo de tiempo analizado.

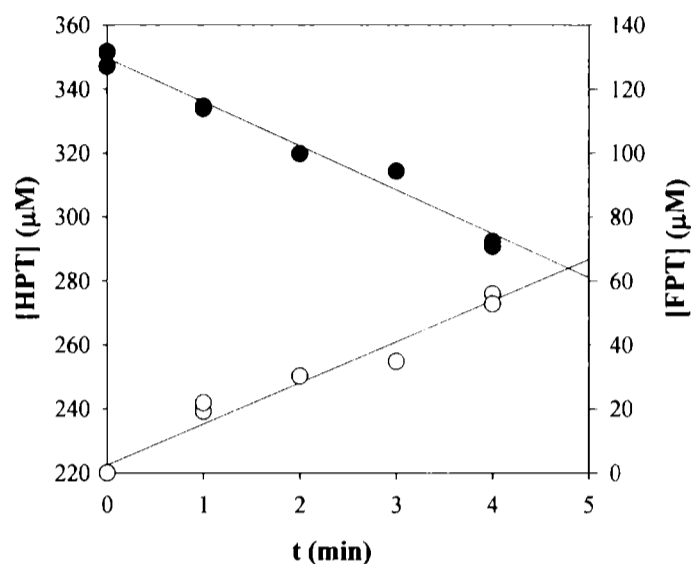


Figura 15.4: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de (●) HPT y (○) FPT con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[HPT]_0 = 350 \mu M$; $pH = 10,5$). Los resultados corresponden a los 4 primeros minutos de fotólisis.

Luego de los primeros 5 minutos de fotólisis se observa la aparición de CPT en las soluciones irradiadas (figura 15.5b y 15.6). Este resultado coincide con el análisis por TLC presentado anteriormente. Tal como se comentó anteriormente, CPT puede provenir de la fotooxidación de FPT^[1]. Adicionalmente, se observa que después de los 5 minutos de irradiación aparece un importante incremento en la velocidad de consumo de HPT, conjuntamente con un incremento en la velocidad de formación de FPT. Estos resultados se muestran en la figura 15.5 que corresponde al mismo experimento presentado en la figura 15.4. Obsérvese que el inicio del efecto de aceleración, coincide temporalmente con el aumento en la concentración de CPT; es decir, con el momento en el que FPT absorbe una fracción significativa de la radiación incidente. De esta manera, la transformación química de HPT en FPT parece acelerada por la participación de FPT excitada (FPT*).

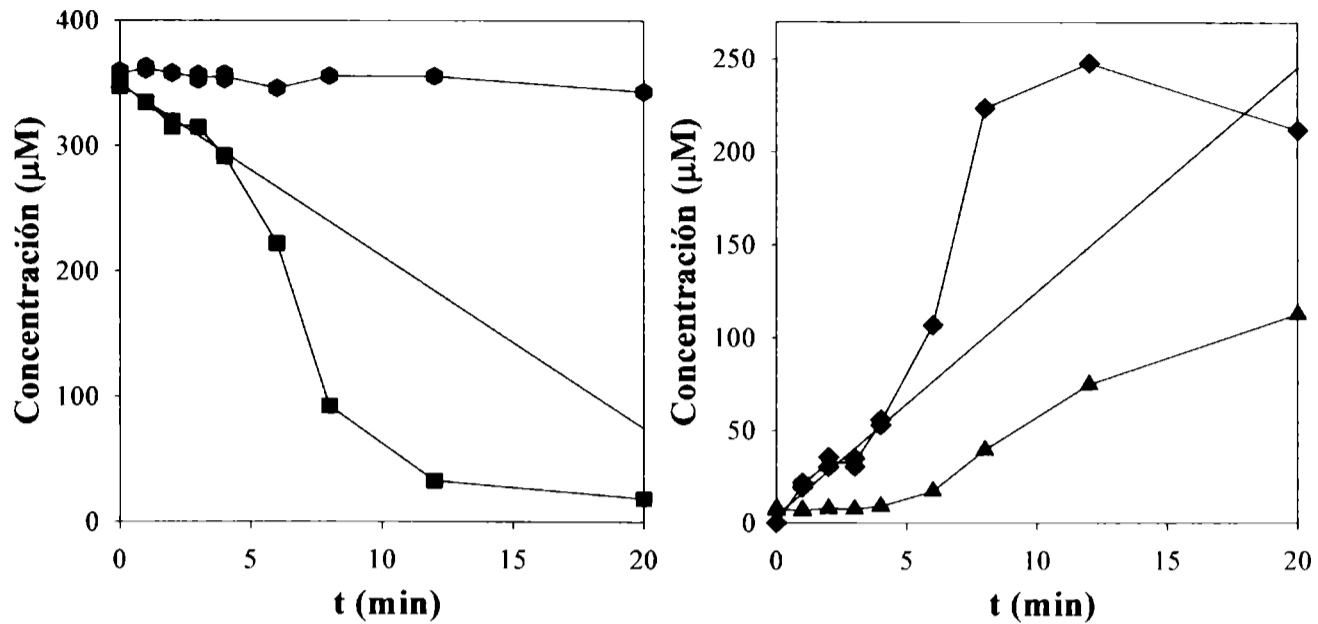


Figura 15.5: a) Evolución de la concentración de HPT ($[HPT]_0=350 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) con el tiempo de irradiación. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 15.4. Se observa también la sumatoria de las concentraciones de HPT, FPT y CPT. b) Evolución de las concentraciones de FPT y CPT con el tiempo de irradiación. La recta corresponde a la regresión lineal de la figura 15.4.

En la figura 15.6 se muestran los resultados del experimento completo. Puede observarse que la velocidad de consumo de HPT disminuye luego de los 12 minutos de irradiación. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la cantidad de luz absorbida por HPT ha disminuido significativamente en esta etapa. La competencia entre las velocidades de producción y consumo de FPT hace que su concentración pase por un máximo a los 12 minutos aproximadamente y luego comience a disminuir. La concentración de CPT, por su parte, aumenta desde los 5 minutos de irradiación en adelante. Como se puede ver durante los primeros 20 minutos de irradiación, la suma de las concentraciones de las tres especies (HPT, FPT y CPT) se mantiene constante, indicando que FPT y CPT son los principales foto-productos.

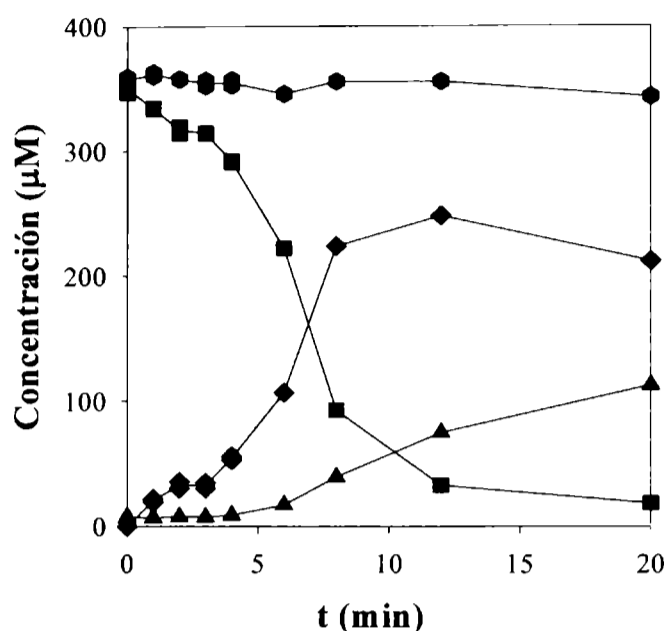


Figura 15.6: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de (■) HPT, (◆) FPT y (▲) CPT con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[HPT]_0=350 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$). (●) Suma algebraica de las concentraciones de HPT, FPT y CPT para cada tiempo de irradiación.

Para corroborar la existencia del fenómeno de aumento de la velocidad de descomposición de HPT por la presencia de FPT se realizó otra serie de experimentos en los cuales se irradiaron soluciones mezclas de ambas sustancias en distintas proporciones. En particular se prepararon dos grupos de soluciones independientes: el primero (grupo I) contenía HPT ($47\mu\text{M}$) y FPT ($315\mu\text{M}$); y el grupo II contenía HPT ($200\mu\text{M}$) y FPT ($310\mu\text{M}$). Ambos grupos de soluciones fueron irradiados ($\lambda_{EX}=350 \text{ nm}$) en atmósfera de aire y helio.

En cada caso, puede calcularse, según las ecuaciones (1) y (2), 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.

$$P_a^{\text{HPT}} = \frac{\epsilon_{350}^{\text{HPT}} \cdot [\text{HPT}]}{\sum_i \epsilon_{350}^i \cdot [i]} \cdot P_a \quad (1)$$

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

en estas ecuaciones [HPT] y [FPT] representan la concentraciones de HPT y de FPT, respectivamente. P_a^i es la intensidad de luz absorbida por el componente i (en este caso, HPT y FPT). P_a es la intensidad de luz absorbida total (ΣP_a^i).

Considerando despreciable la luz absorbida inicialmente por CPT, puede calcularse P_a a partir de la absorbancia de HPT (A^{HPT}) y la absorbancia de FPT (A^{FPT}), ecuaciones (3) a (6).

$$A^{HPT} = \epsilon_{350}^{HPT} \cdot l \cdot [HPT] \quad (3)$$

$$A^{FPT} = \epsilon_{350}^{FPT} \cdot l \cdot [FPT] \quad (4)$$

La absorbancia total de la solución (A^T) está dada por la siguiente ecuación:

$$A^T = A^{HPT} + A^{FPT} \quad (5)$$

La ecuación que relaciona P_a , con A^T y la intensidad de luz incidente (P_0) es la siguiente.

$$P_a = P_0 \cdot (1 - 10^{-A^T}) \quad (6)$$

En el capítulo 9 se describe como se determinó P_a . Las intensidades de luz tienen unidades de Einstein por minuto ($E \text{ min}^{-1}$). Como se dijo anteriormente, usando las ecuaciones (1) y (2); teniendo en cuenta el valor de P_a calculado con la ecuación (6) y que los valores de los ϵ a 350 nm para HPT y FPT son $6066 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $9779 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente; se pueden calcular los valores de P_a^{HPT} y P_a^{FPT} en la etapa inicial de irradiación.

Grupo I				Grupo II		
Compuesto (i)	[i] μM	P_a^i	% P_a^i	[i] μM	P_a^i	% P_a^i
HPT	47	$6,6 \times 10^{-5}$	8	200	$2,3 \times 10^{-4}$	30
FPT	315	$7,1 \times 10^{-4}$	92	310	$5,5 \times 10^{-4}$	70

Tabla 15.1: Cálculo de P_a^i y % P_a^i por HPT y FPT en los dos grupos de mezclas preparados.

Nótese que en el caso del grupo I, HPT absorbe una muy baja proporción de la radiación incidente (8%) y FPT absorbe aproximadamente el 92%. En el grupo II, HPT

tiene una absorción del 30% y FPT del 70%. En todos los casos, FPT absorbe la mayor proporción de la luz. De esta manera, se parte de una situación en la cual ambas sustancias son excitadas por la irradiación. En la figura 15.7 se muestran los resultados de estos experimentos y puede observarse la evolución de las concentraciones con el tiempo de irradiación.

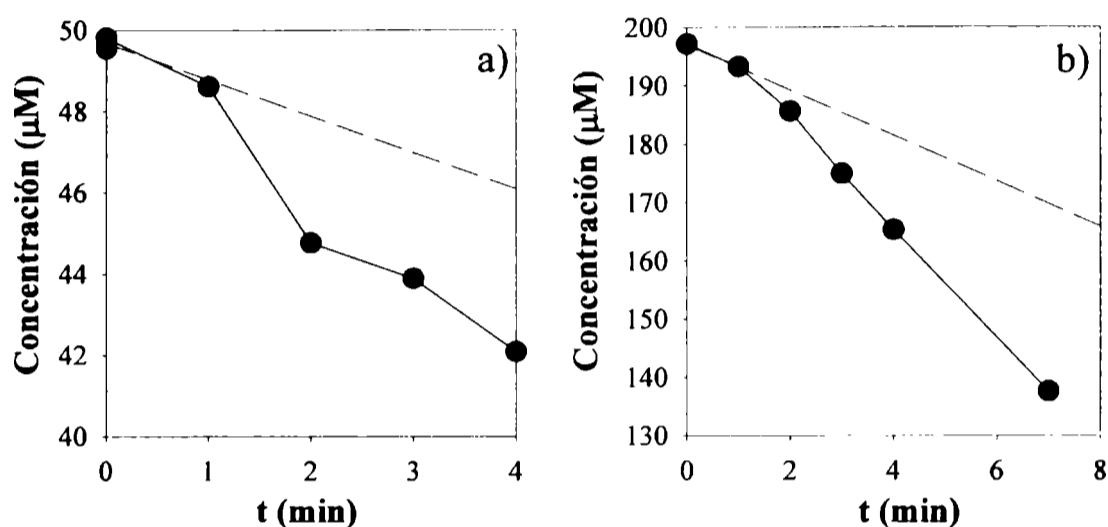


Figura 15.7: (●) Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de HPT con el tiempo de irradiación de soluciones conteniendo mezclas de HPT y FPT. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de O₂. La línea punteada indica la velocidad de consumo de HPT calculada (ver tabla 15.2)
a) Resultados correspondientes al grupo I: mezcla de HPT ([HPT]₀=47 µM) y FPT ([FPT]₀=315 µM); pH=10.5. b) Resultados correspondientes al grupo II: mezclas de HPT ([HPT]₀=200 µM) y FPT ([FPT]₀=310 µM); pH=10.5.

Puede calcularse, en cada caso, la velocidad inicial de conversión de HPT en FPT ($v_0^{\text{HPT} \rightarrow \text{FPT}}$) en estas condiciones, teniendo en cuenta el valor de P_a^{HPT} y el rendimiento cuántico calculado en la sección anterior ($\Phi_{\text{HPT}}=1,8 \times 10^{-2}$):

$$v_0^{\text{HPT} \rightarrow \text{FPT}} = \Phi_{\text{HPT}} \cdot P_a^{\text{HPT}} \quad (7)$$

En la tabla 15.2 se muestran los valores de $v_0^{\text{HPT} \rightarrow \text{FPT}}$ calculados a partir de la ecuación (7), (1,2µM/min y 3,9µM/min para el grupo I y II respectivamente). Sin embargo, en todos los casos, la velocidad de desaparición de HPT, como puede observarse

a simple vista en figura 15.7, es mucho mayor que la velocidad calculada con la ecuación (7).

Grupo	v_0^{calc}	v_0^{exp}
I	1,2	$5,3 \pm 0,3$
II	3,9	$8,8 \pm 0,4$

Tabla 15.2: Comparación de los valores de las velocidades iniciales calculadas a partir de la ecuación (7) (v_0^{calc}), con los valores de obtenidos en los experimentos mostrados en la figura 15.7 (v_0^{exp}). Las unidades de v_0 son $\mu\text{M min}^{-1}$.

Estos resultados muestran que existe un proceso que acelera esta reacción y que en dicho proceso FPT tiene un rol importante. Además puede observarse que la suma de las concentraciones de los tres compuestos se mantiene constante en todo el transcurso del experimento indicando que sólo se producen las dos reacciones consideradas. Esto descarta el consumo de HPT por otras vías que generen foto-productos distintos de FPT y CPT.

La evolución de la concentración de O_2 disuelto durante la irradiación fue monitoreada usando un electrodo selectivo (ver capítulo 9). Como se muestra en la figura 15.7, la concentración de O_2 disminuye con el tiempo de irradiación. Además, luego de unos minutos de irradiación se observó un incremento en la velocidad de consumo de O_2 . La degradación de HPT inducida por FPT y la propia fotooxidación de FPT pueden explicar la aceleración observada.

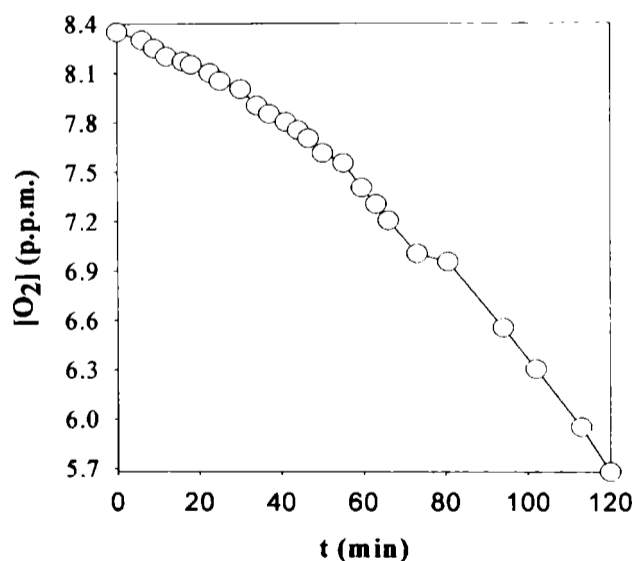


Figura 15.7: Evolución de la concentración de O_2 disuelto con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,2$).

En soluciones irradiadas de HPT se detectó la presencia de H_2O_2 , indicando que como producto de la fotooxidación de HPT también se genera esta especie reactiva de oxígeno. Se midió la concentración de H_2O_2 a diferentes tiempos de irradiación de una solución de HPT ($360 \mu\text{M}$; $\text{pH } 10,5$). Los resultados se muestran en la figura 15.8. La velocidad de producción de H_2O_2 estimada fue de $14(\pm 2) \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 4 minutos de irradiación. El rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 se calculó a partir de ese valor de velocidad, teniendo en cuenta la intensidad de luz incidente (ver capítulo 8). De este modo, se obtuvo un valor de $(1,7\pm 0,2)\times 10^{-2}$. La comparación entre el rendimiento cuántico de formación de H_2O_2 y los rendimientos cuánticos de consumo de HPT y formación de FPT sugiere que por cada molécula de HPT consumida se produce una molécula de H_2O_2 y una molécula de FPT.

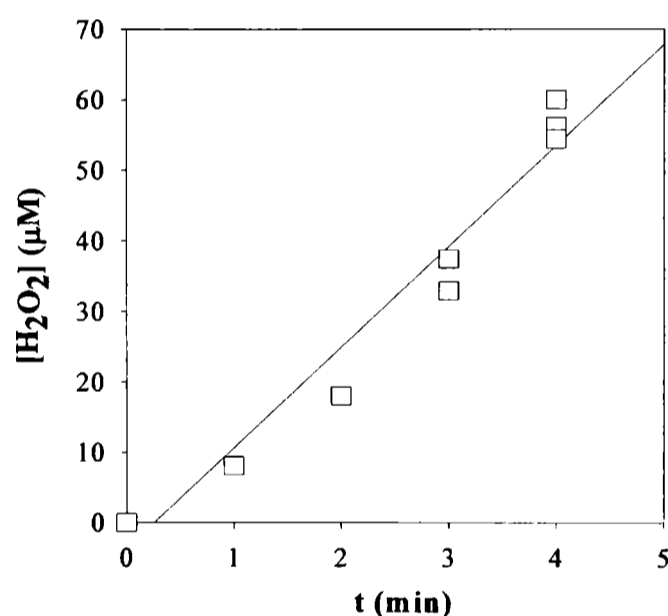


Figura 15.8: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0=360 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,2$).

Para saber si el radical hidroxilo (HO^\bullet) participa en el mecanismo de fotooxidación de HPT, se realizaron experimentos de fotólisis en presencia de 2-propanol y etanol (ver sección 8.3, capítulo 8). Se irradiaron soluciones de HPT ($350 \mu\text{M}$; $\text{pH } 10,5$) en presencia de diferentes concentraciones de alcohol ($3,5\text{--}350 \text{ mM}$). Se registraron los espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación ($t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10$ y 15 minutos) y se

obtuvieron los correspondientes espectros ED. Estos resultados se muestran en la figura 15.9.

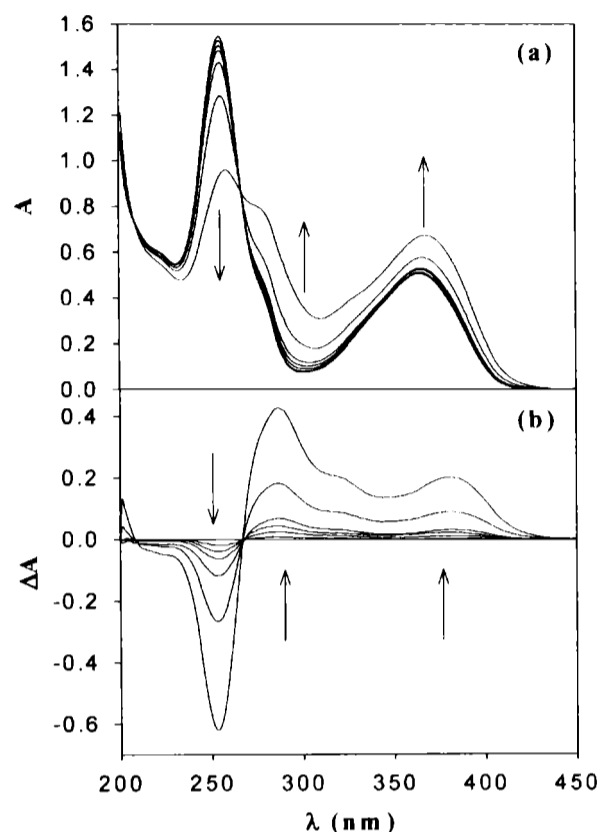


Figura 15.9: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT ($[HPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) al ser irradiada en presencia de 2-propanol. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de HPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación.

En la figura 15.10 se muestran los espectros DEN y se comparan con aquellos obtenidos durante la fotólisis en ausencia de alcoholes. Puede observarse que no existen diferencias significativas entre los espectros DEN correspondientes a ambos grupos de experimentos. Esto sugiere que la naturaleza química de los procesos que ocurren en la fotólisis en presencia de alcohol es similar a la que ocurre en ausencia del mismo.

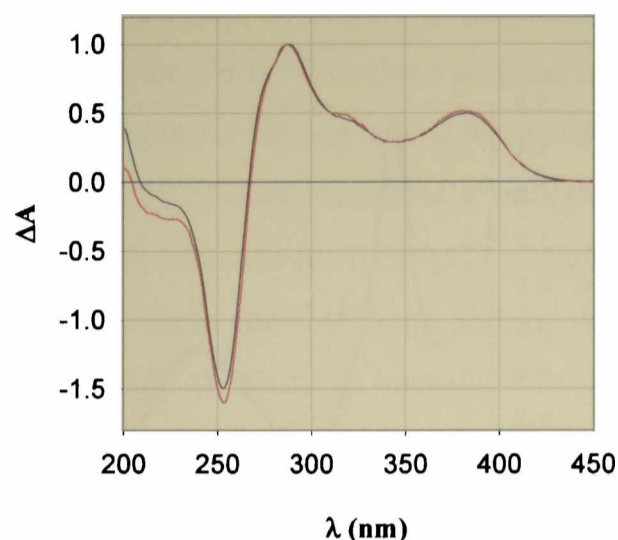


Figura 15.10: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 8 minutos de irradiación en ausencia de 2-propanol; El Espectro DEN (---) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido luego de 8 minutos de irradiación en presencia de 2-propanol.

Por otro lado, analizando la evolución de la absorbancia (a distintos λ) con el tiempo de irradiación (figura 15.11), se observa que la velocidad de cambio de la absorbancia es la misma en los experimentos con y sin alcoholes. Estos resultados sugieren que el radical HO^\bullet no participa en el proceso de degradación fotoquímica de HPT en medio alcalino.

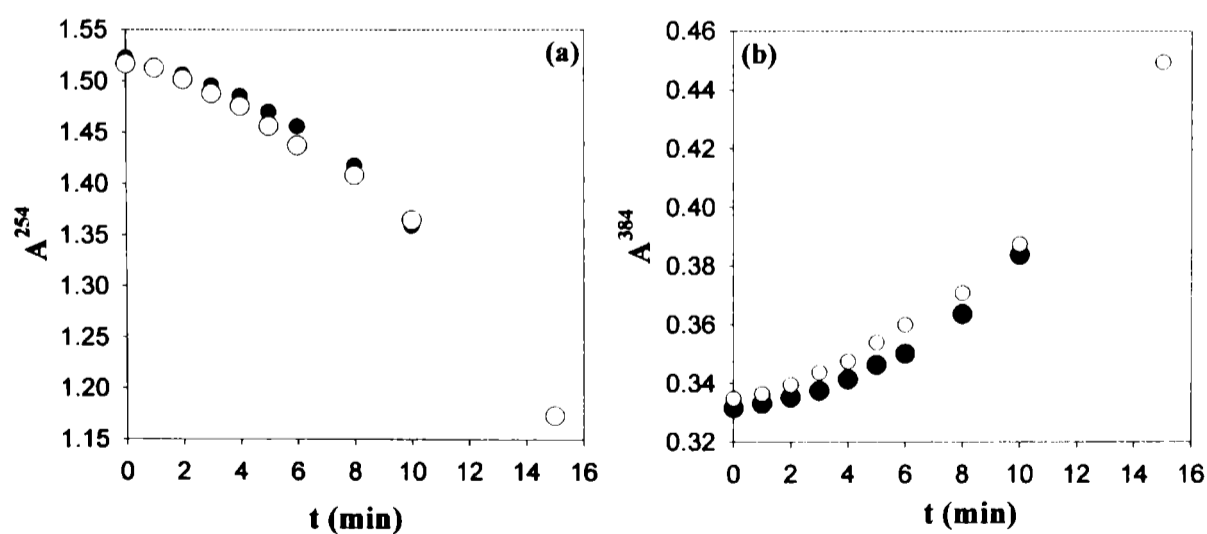


Figura 15.11: Evolución de la absorbancia de soluciones de HPT con el tiempo de irradiación. (○) Fotólisis en ausencia de 2-propanol y (●) fotólisis en presencia de 2-propanol. a) λ análisis 254 nm. b) λ análisis 384 nm.

Adicionalmente, se determinó la concentración de H_2O_2 a diferentes tiempos de irradiación, de soluciones de HPT ($350 \mu\text{M}$; $\text{pH } 10,5$) en presencia de 2-propanol (350 mM). Los resultados se muestran en la figura 15.11, donde se observa que la velocidad promedio de producción de H_2O_2 fue de $11 \pm 3 \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 4 minutos de irradiación. Este valor es similar, dentro del error experimental, al obtenido bajo las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de alcoholes ($14 \pm 2 \mu\text{M}/\text{min}$). Estos resultados sugieren que, en las condiciones de trabajo, el radical HO^\bullet tampoco participa en el proceso oxidativo que conduce a la producción de H_2O_2 .

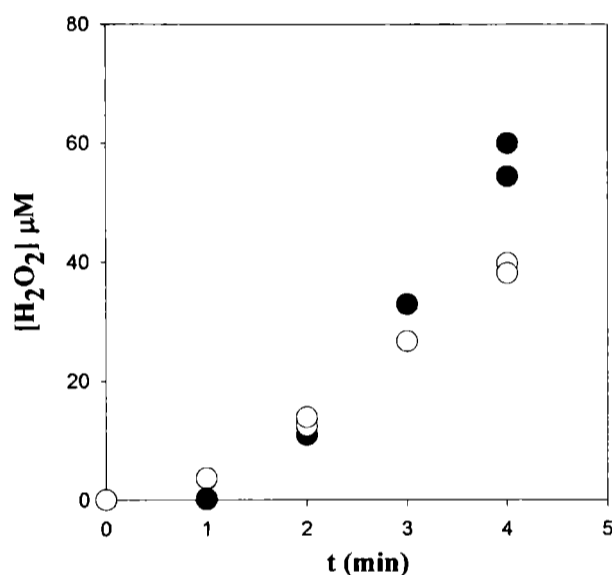


Figura 15.12: a) Concentración de H_2O_2 presente en soluciones de HPT ($[\text{HPT}]_0 = 350 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 10,5$) irradiadas a distintos tiempos. (●) Fotólisis en ausencia de 2-propanol y (○) fotólisis en presencia de 2-propanol (350 mM).

15.2 Fotólisis en ausencia de oxígeno.

Para dilucidar cuál es el rol del O_2 en la fotoquímica de HPT, se irradiaron soluciones de HPT previamente burbujeadas con Ar. Bajo estas condiciones se observó que la solución sin irradiar, prácticamente incolora, adquiere un color rojizo al ser irradiada y que la intensidad de dicho color aumenta con el tiempo de irradiación. Como se muestra en la figura 15.13, el tono rojo de las soluciones irradiadas se debe a la aparición en el espectro de absorción de una banda relativamente ancha que presenta su máximo alrededor

de los 480 nm. Ninguno de los patrones comerciales de pterinas disponibles, presenta estas características espectrales y, por lo tanto, los espectros NED de estas fotólisis no coinciden con los espectros NRD obtenidos de las soluciones de los patrones comerciales. En consecuencia, no puede proponerse la identidad del foto-producto formado durante la irradiación de soluciones de HPT en condiciones anaeróbicas, a partir del análisis espectral.

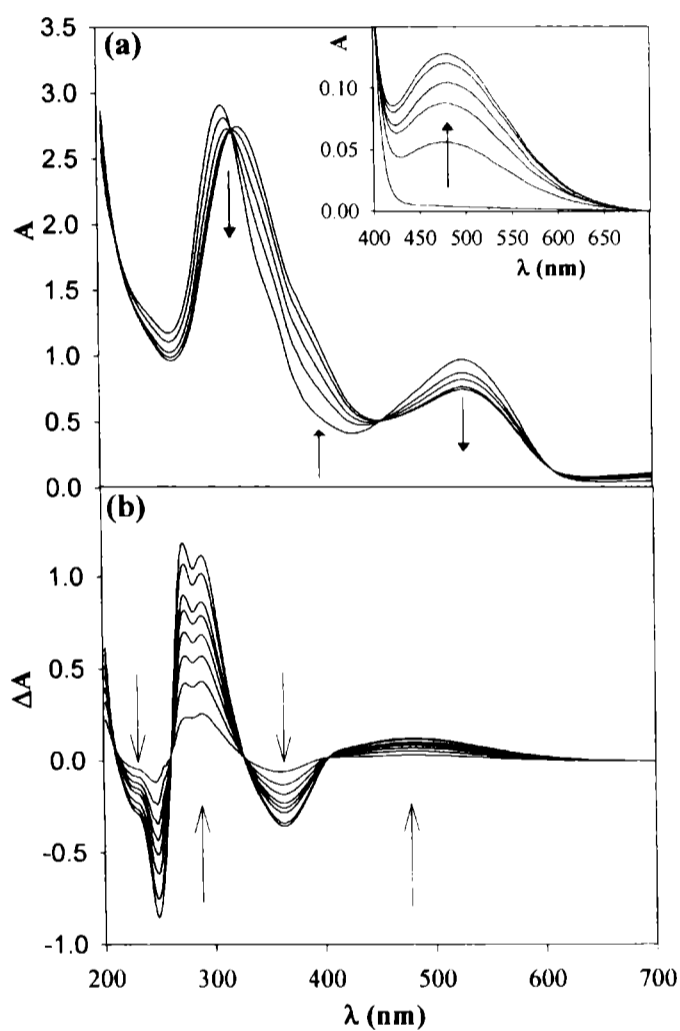
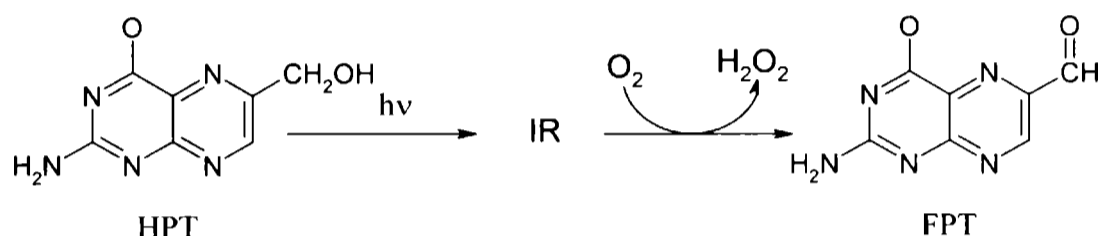


Figura 15.13: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones irradiadas en ausencia de O₂, de HPT ([HPT]₀=150 μM; pH=10,1) con el tiempo. b) Los Espectros DE se obtuvieron restando el espectro de HPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación. Los espectros fueron registrados cada 5 minutos, las flechas indican los cambios observados a diferentes longitudes de onda.

El mencionado fotoproducto, que da color a las soluciones irradiadas de HPT, sufre una reacción térmica en la oscuridad, cuando se pone en contacto con aire u O_2 . Debido a esto, en adelante se hará mención a éste foto-producto como “intermediario rojo (IR)”. La banda con el máximo alrededor de 480nm desaparece. Los espectros DEN obtenidos de la resta del espectro de una solución no irradiada de HPT con el espectro de una solución irradiada e inmediatamente aireada, coinciden con los espectros DTN obtenidos con soluciones patrones de HPT y FPT. Estos resultados sugieren que un cromóforo como FPT es el producto estable final de la oxidación del intermediario rojo (Esquema 1).



Esquema 1. Fotooxidación de HPT en soluciones acuosas alcalinas (pH entre 10,0 y 10,5; $\lambda_{ex}=350$ nm).

El análisis por TLC (con placas de tipo I) de soluciones irradiadas de HPT en condiciones anaeróbicas y después aireadas muestra una mancha fluorescente con un R_f idéntico al que tiene el patrón de FPT además de la mancha correspondiente al reactivo HPT. La intensidad de la mancha fluorescente de HPT disminuye con el tiempo de irradiación. Mediante esta técnica no se detecta ningún otro producto (estos resultados no se muestran).

Los resultados obtenidos por HPLC, concuerdan con los obtenidos por TLC. En la figura 15.14 se muestra la evolución de la concentración de HPT y de FPT, con el tiempo de irradiación. Durante los primeros 5 minutos de irradiación, la velocidad de consumo de HPT es de $14 \pm 2 \mu\text{M}/\text{min}$ y de $13 \pm 2 \mu\text{M}/\text{min}$ para la formación de FPT. A estas velocidades le corresponden rendimientos cuánticos de $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-2}$ y $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-2}$, respectivamente. Estos valores indican que la única vía cuantitativamente importante de descomposición de HPT es su oxidación a FPT. Además, estos resultados son comparables con los valores de los rendimientos cuánticos observados en los experimentos realizados en presencia de O_2 ($\Phi_{HPT} = (1,8 \pm 0,2) \times 10^{-2}$ y $\Phi_{FPT} = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-2}$). Estos resultados muestran

directamente que, 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 anteriormente se denominó IR) que posteriormente reacciona con el O_2 disuelto en el medio para generar FPT. El IR, detectado en ausencia de O_2 , parece tener un papel importante en el proceso de oxidación de HPT en FPT. Los resultados sugieren que, en atmósfera de aire, el intermediario rojo se oxida inmediatamente a FPT. Esto explica por qué este intermediario sólo puede ser detectado en condiciones anaeróbicas.

Teniendo en cuenta esta vía de reacción propuesta, puede suponerse que el oxígeno singlete (1O_2) no participa en las etapas que conducen a la formación de FPT, porque la formación de FPT a partir del intermediario rojo tiene lugar en ausencia de radiación UV-A. El rol del 1O_2 será analizado en detalle en la próxima sección.

Es interesante remarcar que en estas condiciones no se forma CPT. Esta observación es lógica teniendo en cuenta la hipótesis planteada en la sección anterior. La CPT observada a tiempos largos de irradiaciones en presencia de O_2 , proviene de la fotólisis de FPT formada a partir de HPT. En las irradiaciones anaeróbicas no se forma FPT, sino el intermediario IR y, por ende, FPT no se fotoliza para dar CPT.

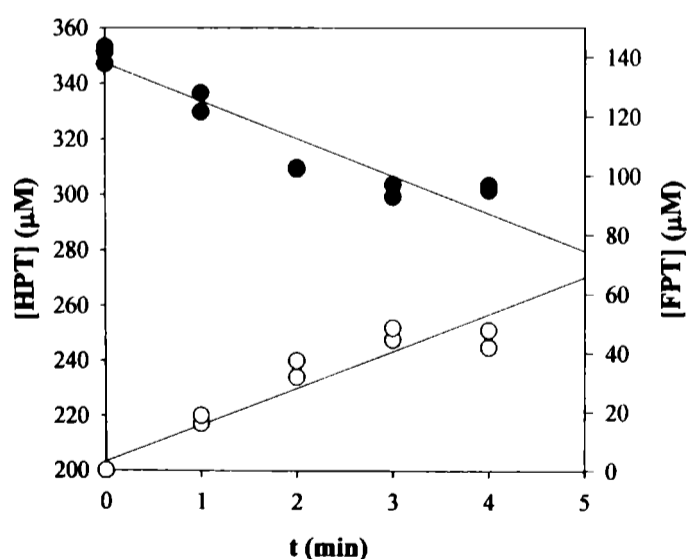


Figura 15.14: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de (●) HPT y (○) FPT con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[HPT]_0=350 \mu M$; $pH=10,5$). Los resultados corresponden a los 4 primeros minutos de fotólisis en ausencia de O_2 .

Como se muestra en la figura 15.15, durante los primeros 20 minutos de fotólisis no se observa la aceleración en la velocidad de consumo de HPT y en la velocidad de formación de FPT. Esto confirma que la aceleración de la fotólisis observada en presencia de O_2 no se debe a la acumulación del “intermediario rojo”; sino que por el contrario, la acumulación de algún intermediario reactivo formado durante la fotólisis de FPT podría ser la causa de la aceleración observada.

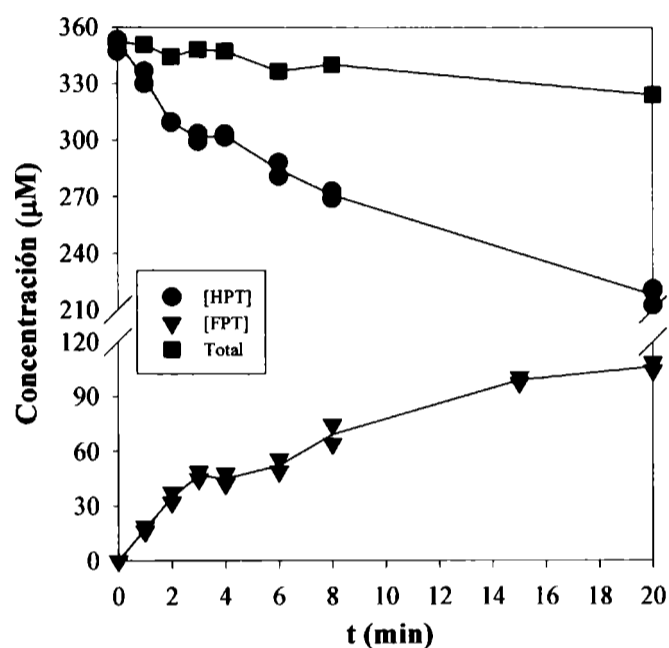


Figura 15.15: Análisis por HPLC de la evolución de la concentración de HPT y FPT con el tiempo de irradiación de soluciones de HPT ($[HPT]_0=350 \mu M$; $pH=10,5$). Los experimentos se desarrollaron en ausencia de O_2 . En la figura se muestran los primeros 20 minutos de fotólisis. (■) Suma algebraica de las concentraciones de HPT y FPT para cada tiempo de irradiación.

En la figura 15.13 se muestran 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 HPT se obtuvo la evolución de los espectros de dicha sustancia durante el experimento. Pudo, entonces, obtenerse el espectro del IR 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 HPT (correspondiente a la concentración a

ese tiempo determinada por HPLC). Los espectros así determinados a distintos tiempos, se dividieron por la concentración del IR que es igual a la concentración determinada por HPLC para FPT, y se promediaron obteniéndose el espectro que se muestra en la figura 15.16.

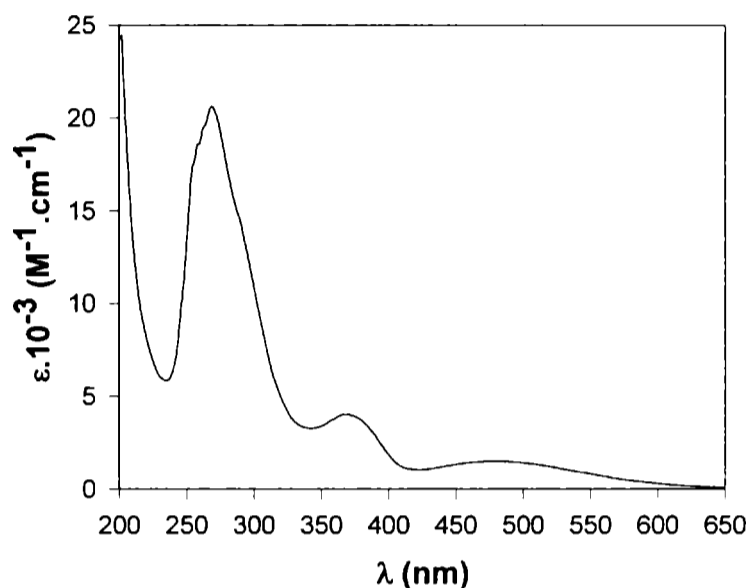


Figura 15.16: Espectro del "intermediario rojo (IR)" obtenido según se explica en el texto.

Se realizaron medidas de H_2O_2 en soluciones de HPT ($[HPT]_0=360 \mu M$; $pH=10,2$) irradiadas a diferentes tiempos e inmediatamente aireadas. Los resultados revelan que se genera H_2O_2 bajo estas condiciones experimentales. La velocidad de producción de H_2O_2 , durante los primeros 4 minutos de irradiación, fue de $15 \pm 1 \mu M/min$. El rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 calculado a partir de ese valor de velocidad, teniendo en cuenta la velocidad de luz incidente, arrojó un valor de $1,8 \times 10^{-2}$. Estos valores son similares, dentro del error experimental, a los observados en los experimentos realizados en presencia de O_2 ($14 \pm 2 \mu M/min$ y $1,7 \times 10^{-2}$ para la velocidad de formación y para el rendimiento cuántico de formación de H_2O_2 respectivamente). Con fines comparativos se presentan, en la figura 15.17, los resultados obtenidos en presencia y ausencia de O_2 . Estos resultados sugieren que el H_2O_2 es un producto generado de la reacción térmica entre el IR y el O_2 .

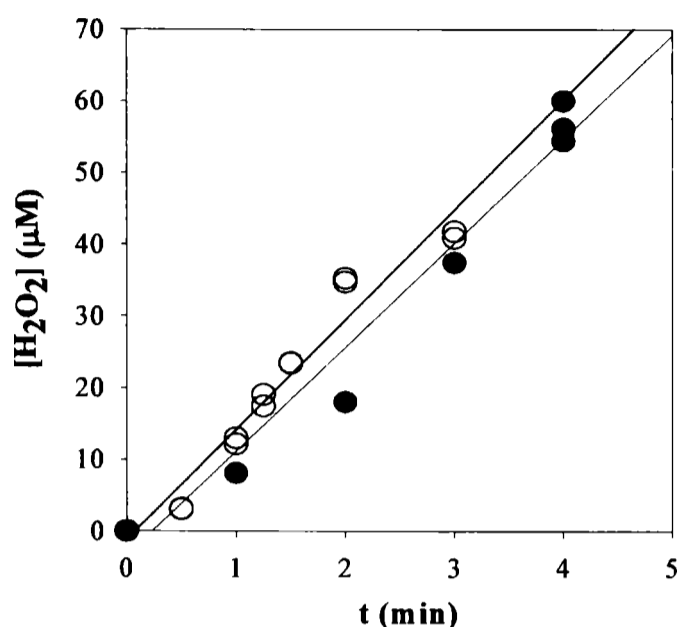
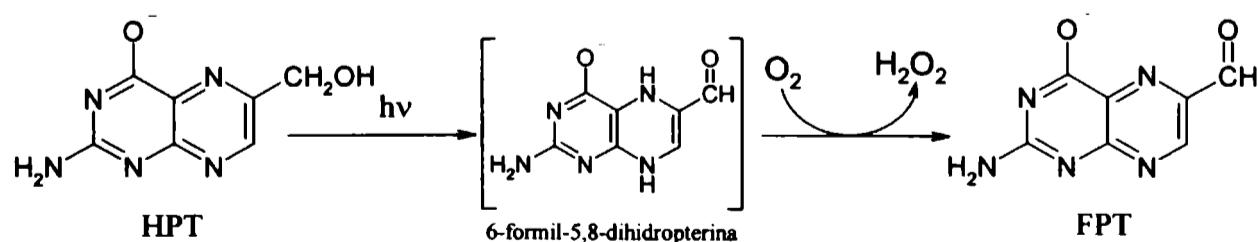


Figura 15.17: Evolución de la concentración de H_2O_2 en soluciones irradiadas de HPT ($[\text{HPT}]_0=360 \mu\text{M}$, $\text{pH}=10,2$) en función del tiempo de irradiación. Con fines comparativos se presentan los resultados obtenidos cuando se irradia en presencia de O_2 (●) y cuando se irradia en ausencia de O_2 , e inmediatamente se airea la solución (○).

El mecanismo de reacción que tiene lugar en la fotólisis de HPT parece ser similar al encontrado en la fotooxidación de biopterina (BPT), neopterina (NPT)^[2,3] y FPT^[1,4] (ver capítulo 1). Ha sido propuesto que los intermediarios detectados en esas fotooxidaciones, que tienen un comportamiento espectral y una reactividad similar al llamado “intermediario rojo”, son los 6-acil-5,8-dihidropterinas. De este modo, el intermediario rojo podría ser el 6-formil-5,8-dihidropterina, una de las formas isoméricas de HPT (Esquema 2) que se forma fácilmente en ausencia de O_2 a partir del estado electrónico excitado de HPT.



Esquema 2. Fotooxidación de HPT en soluciones acuosas alcalinas (pH entre 10,0 y 10,5) bajo irradiación con luz UV-A (λ 350 nm).

15.3 El rol del oxígeno singlete.

Los resultados previos, ponen de manifiesto, por un lado, la capacidad que tiene HPT de generar $^1\text{O}_2$ (por vías fotoquímicas); y por otro, la capacidad que tiene HPT de reaccionar con dicha especie reactiva del oxígeno. Por lo tanto, durante la fotooxidación de HPT la reacción entre HPT y $^1\text{O}_2$ necesariamente debe ocurrir. Sin embargo, la evidencia experimental mostrada en la sección anterior, sugiere que el $^1\text{O}_2$ no estaría implicado en el mecanismo principal de fotooxidación de HPT. En esta sección se evalúa la importancia cuantitativa de esta reacción en el proceso de fotooxidación de HPT por luz UV-A. Para ello se utilizan dos herramientas diferentes: cálculos cinéticos y experimentos de fotólisis realizados en D_2O .

15.3.1 Análisis cinético.

En el capítulo 12 se presentó el valor del rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) para la forma alcalina de HPT ($0,21 \pm 0,01$), junto con el valor de la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T) por HPT en medio alcalino ($3,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Por otro lado, en el capítulo 13, se presentaron los valores de k_r para la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y la forma alcalina de HPT, medidos en H_2O y D_2O ($(1,8 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. y $(1,2 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente).

Las ecuaciones (1) y (2) expresan la velocidad de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y HPT y la concentración de $^1\text{O}_2$ en estado estacionario (durante la irradiación de una solución acuosa de HPT) respectivamente.

$$(d[\text{HPT}]/dt)_l = - k_r [^1\text{O}_2] [\text{HPT}] \quad (1)$$

$$[^1\text{O}_2] = \frac{P_a \Phi_\Delta}{k_d + k_r [\text{HPT}]} \quad (2)$$

donde P_a es la velocidad de fotones absorbidos por HPT y Φ_Δ , el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ por HPT. k_d es la constante de velocidad del proceso de desactivación

no radiativo en H₂O ($\tau_{\Delta}=1/k_d=3,8 \mu\text{s}$). k_e (la constante de velocidad del proceso de desactivación por fosforescencia) no se incluyó en la ecuación 2 debido a que k_d es mucho mayor que k_e ^[7,8]. Con estas ecuaciones, puede calcularse la velocidad de la reacción entre ¹O₂ y HPT en las condiciones en las que se realizaron los experimentos de fotólisis y comparar con la velocidad total de consumo de HPT observada en los experimentos de fotólisis.

En los experimentos de fotólisis de HPT, P_a fue igual a $4 \times 10^{-4} \text{ E l}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Usando la ecuación (2), se calculó un valor de [¹O₂] igual a $9,6 \times 10^{-12} \text{ M}$, en las mismas condiciones experimentales usadas para la determinación del rendimiento cuántico de consumo de HPT. Con la [¹O₂] y usando la ecuación (1), se calculó para $(d[\text{HPT}]/dt)_i$ un valor de $0,36 \mu\text{M}/\text{min}$. Este valor es mucho menor que el obtenido de la velocidad experimental de consumo de la forma alcalina de HPT ($13,7 \pm 0,8 \mu\text{M}/\text{min}$). Por lo tanto, estos resultados sugieren que si bien HPT es un buen sensibilizador de ¹O₂ y que es capaz de secuestrar ¹O₂, la reacción química entre ambas especies no es significativa en el mecanismo de fotooxidación de HPT. Asimismo, puede descartarse al ¹O₂ como responsable por el efecto acelerador que tiene HPT sobre la fotooxidación de HPT.

15.3.2. Fotólisis en agua deuterada.

De manera complementaria a los experimentos detallados en la sección anterior, se realizaron experimentos de fotólisis de HPT en D₂O. Como se explicó en el capítulo 8, este tipo de experimentos permite evaluar, indirectamente, la participación del ¹O₂ en los mecanismos de fotooxidación de HPT. Para esto, se irradiaron soluciones aireadas de HPT ($260 \mu\text{M}$) a pD 10,5 en D₂O y los resultados se compararon con aquellos obtenidos en las fotólisis en H₂O. Se registraron los espectros de absorción de ambos experimentos de fotólisis en función del tiempo de irradiación (figura 15.18).

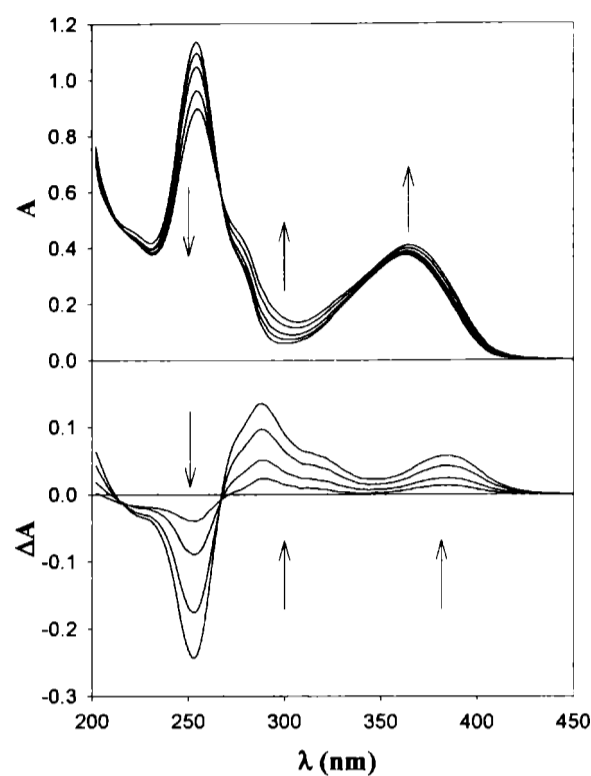


Figura 15.18: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de HPT en D₂O ([HPT]₀=260 μM; pD=10,5) al ser irradiada en presencia de O₂. Los espectros fueron tomados cada 5 minutos. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm. para la irradiación y 0,2 cm. para la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de HPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de irradiación (cada 5 minutos).

En la figura 15.19 se comparan los espectros DEN obtenidos para los experimentos realizados en los dos solventes (H₂O y D₂O) donde puede apreciarse su gran similitud. Estos resultados indican que en ambos experimentos están ocurriendo procesos fotoquímicos de la misma naturaleza.

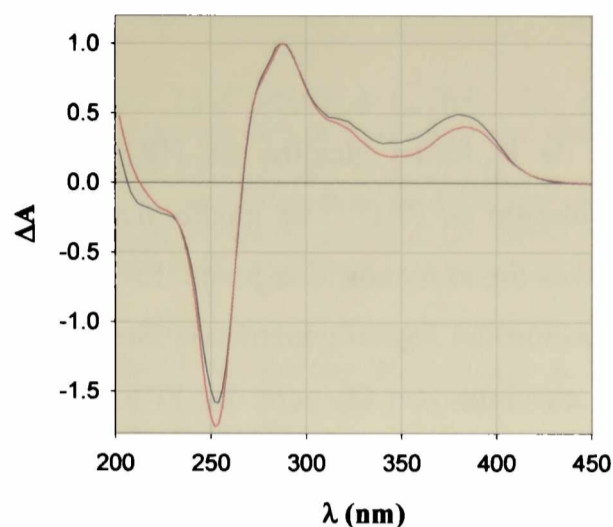


Figura 15.19: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 10 minutos de irradiación en H_2O . El Espectro DEN (---) se obtuvo restando el espectro de HPT inicial al espectro obtenido después de 15 minutos de irradiación en D_2O .

En la figura 15.20 se muestra la evolución de la absorbancia (a diferentes longitudes de onda) con el tiempo de irradiación. Puede apreciarse claramente, en todos los casos expuestos, el mismo comportamiento para las fotólisis realizadas en ambos solventes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la sección 15.3.1, indicando que la reacción de HPT con $^1\text{O}_2$ no es la vía principal del mecanismo de foto-degradación de HPT (ver capítulo 8) y que tampoco es el mecanismo de reacción que explica la aceleración observada en el consumo de HPT inducida por la presencia de FPT.

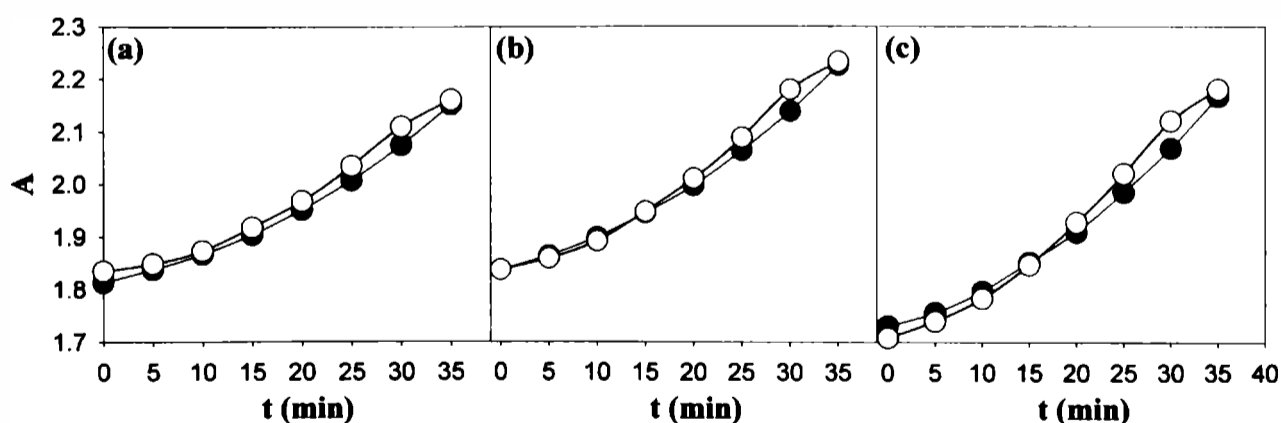


Figura 15.20: Evolución de la absorbancia de la solución con el tiempo de irradiación (a) λ 360; b) λ 366 y c) λ 372). (○) Fotólisis en D_2O y (●) Fotólisis en H_2O .

15.4 Conclusiones.

La fotooxidación de la forma alcalina de HPT muestra un patrón similar al observado para la fotooxidación de FPT^[1,4] en medio alcalino. La fotooxidación de HPT para dar FPT ocurre a través de, al menos, dos pasos. En el primero, después de absorber un fotón y sin la participación del O₂, se genera un “intermediario rojo”. En el segundo paso, este intermediario reacciona con O₂ para dar FPT. Debido a su perfil espectral y reactividad el “intermediario rojo” podría ser 6-formil-5,8-dihidropterina (Esquema 2).

Durante la fotooxidación de HPT se genera una molécula de H₂O₂ por cada molécula de HPT consumida. El H₂O₂ es probablemente el producto de la reacción térmica entre el “intermediario rojo” y el O₂. Tanto en el proceso de transformación de HPT a FPT como en la formación de H₂O₂, el radical hidroxilo (HO•) no participa activamente. La generación de H₂O₂ por HPT es importante desde el punto de vista biomédico, debido a que las especies activadas del oxígeno están involucradas en la patogénesis del vitiligo^[6] y también ha sido demostrada la acumulación de diferentes derivados pterínicos en la piel de pacientes afectados con vitiligo.

En el capítulo 12 se presentan resultados en favor de la capacidad sensibilizadora de oxígeno singlete (¹O₂) que tiene la molécula de HPT bajo los efectos de la radiación UV-A en soluciones acuosas alcalinas ($\Phi_{\Delta}=0,21\pm0,01$). A partir de estos resultados, no debería descartarse la participación de pterinas en procesos biológicos de oxidación foto-dinámicos.

Los valores de la constante de velocidad de quenching total ($k_T=3,1\times10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y la constante de la velocidad de reacción química ($k_r= (1,2\pm0,1)\times10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en D₂O y $(1,8\pm0,2)\times10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en H₂O) expuestos en el capítulo 12, indican que este compuesto es capaz de atrapar ¹O₂. Sin embargo, los análisis cinéticos, espectrales y experimentos en presencia de D₂O indican que el ¹O₂ no participa en la principal vía de fotooxidación de HPT para dar FPT.

15.5 Referencias

- [1] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Capparelli A. L., *Helv. Chim. Acta*, **84**, 3849 (2001).
- [2] Baur R., Kappel M., Mengel R., Pfeleiderer W.; in “*Chemistry and Biology of Pteridines*”, Eds. R. L. Kisluk, G. M. Brown, Elsevier/North Holland, New York, (1979).
- [3] Pfeleiderer W., Kappel M., Baur R., in “*Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*”, Eds. W Pfeleiderer, H. Wachter, H. Ch. Curtius, Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York, **3**, 3 (1984).
- [4] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R., Capparelli A. L., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **135**, 147 (2000).
- [5] HyperChem TM 7.01 for Windows, Hypercube Inc., Ontario (2002).
- [6] Schallreuter K. U., Moore J., Wood J. M., Beazley W. D., Peters E. M. J., Marles L. K., Behrens-Williams S. C., Dummer R., Blau N., Thöny B., *J. Invest. Dermatol.*; **116**, 167 (2001).
- [7] Krasnovsky A. A.; Jr., *Biophysics*, **24**, 769 (1979).
- [8] Martínez L. A., Martínez C. G., Klopotek B. B., Lang J., Neuner A., Braun A. M., Oliveros E.; *J. Photochem. Photobiol. B*, **58**, 94 (2000).

FOTÓLISIS DE PTERINA: SOLUCIONES ÁCIDAS Y ALCALINAS

Según lo expuesto en el capítulo 1, junto con los resultados detallados en los capítulos 14 y 15 de esta tesis, los mecanismos de fotooxidación de los compuestos pertenecientes a la familia de las pterinas, dependen tanto de la naturaleza del sustituyente, como del pH. En la mayoría de los casos estudiados, estas transformaciones fotoquímicas ocurren sobre el sustituyente de la posición 6, pero no se detecta ningún cambio sobre el doble anillo pterínico.

En este capítulo se presentan los resultados del estudio fotoquímico llevado a cabo sobre la forma ácida (soluciones ácidas) y la forma alcalina (soluciones alcalinas) de 2-amino-4-hidroxipteridina o pterina (PT). Debido a que este compuesto no presenta sustituyentes, el estudio de la fotólisis del mismo, representa el estudio de la reactividad fotoquímica del doble anillo pterínico propiamente dicho. Se presentan los valores de los rendimientos cuánticos de consumo de PT en ambas condiciones de pH. Se analiza la participación del O₂ en los mecanismos fotoquímicos y se discute la capacidad que tiene PT de generar H₂O₂ durante su fotólisis. Al final del presente capítulo se discute la participación de otras especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular ¹O₂, en los mecanismos de fotooxidación de PT. Todos estos resultados se comparan con aquellos descritos para derivados pterínicos 6-sustituidos.

16.1 Irradiación en ausencia de oxígeno.

Para determinar la participación que tiene el O₂ en la fotoquímica de PT, se irradian con luz UV-A (350nm) soluciones de PT, de concentraciones comprendidas entre 100 y 350 μM, previamente burbujeadas con Ar. En la figura 16.1 se muestran los resultados del análisis espectrofotométrico. Tanto en medio ácido (pH 5,5–6,0) como en

medio alcalino (pH 10,2–10,5) no se observaron cambios significativos en los espectros de absorción de las soluciones de PT que fueron irradiadas por más de 120 minutos. Además, al realizar el análisis por cromatografía en capa fina (TLC), no se detectaron fotoproductos, ni se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia de la mancha correspondiente al reactivo, con el tiempo de irradiación.

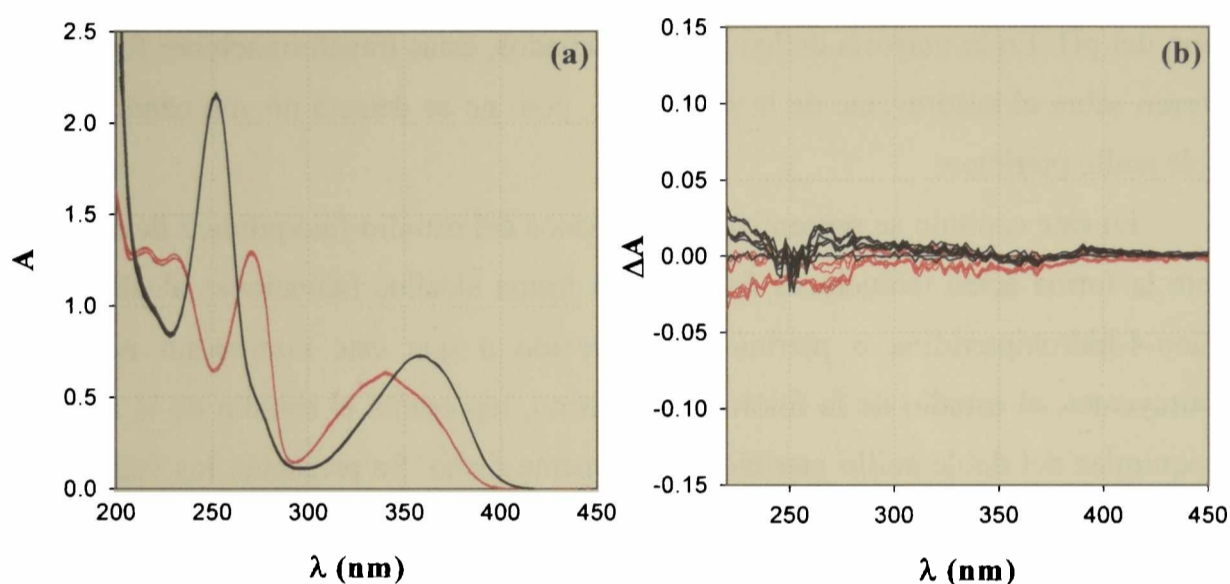


Figura 16.1: Irradiación de una solución de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$) en ausencia de O_2 . Espectros tomados cada 30 minutos, durante 120 minutos. (—) Irradiación de soluciones ácidas (pH=5,5). (---) Irradiación de soluciones alcalinas (pH=10,5). a) Espectros de absorción. b) Espectros DE.

Las soluciones irradiadas en ausencia de O_2 se analizaron por HPLC. En la figura 16.2 se muestran los cromatogramas correspondientes a soluciones de PT no irradiadas, junto con los cromatogramas de soluciones de PT irradiadas 120 minutos (en ambas condiciones de pH). Los mismos muestran la ausencia de fotoproductos.

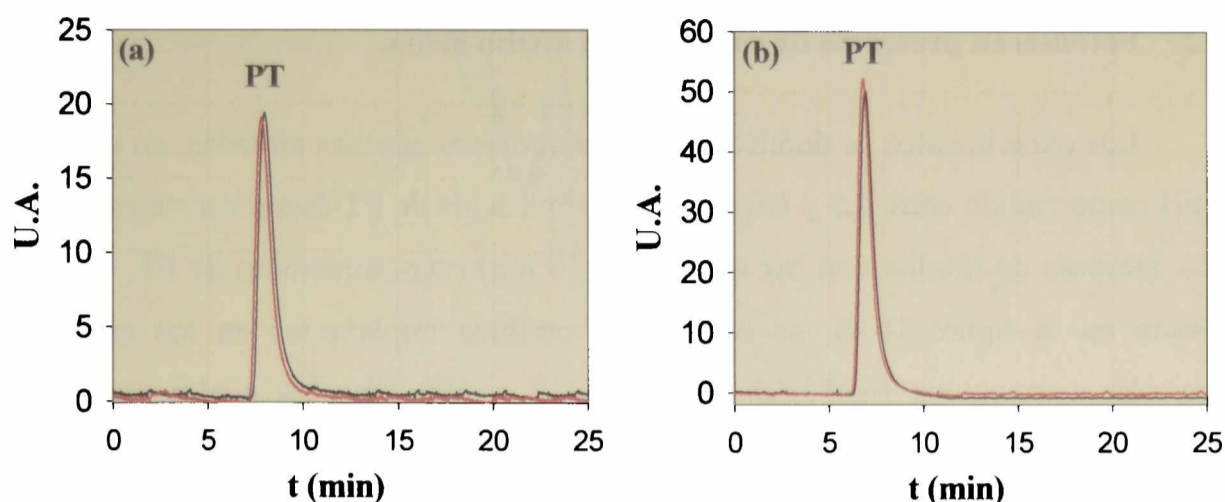


Figura 16.2: Cromatogramas ($\lambda_{an}=340$ nm) de soluciones (burbujeadas con Ar) de PT no irradiadas, e irradiadas en ausencia de O_2 , durante 120 minutos. a) $[PT]_0=200$ μM ; pH=5,5. b) $[PT]_0=360$ μM ; pH=10,5.

En la figura 16.3 se muestra la evolución de la concentración de PT en función del tiempo de irradiación tanto para medio ácido como para medio alcalino. En esta figura, puede apreciarse que la concentración de PT permanece constante durante los primeros 120 minutos de irradiación, independientemente de las condiciones de pH. Estos resultados concuerdan con los mostrados anteriormente y sugieren que PT no sufre ninguna modificación química cuando es irradiada con luz UV-A en ausencia de O_2 .

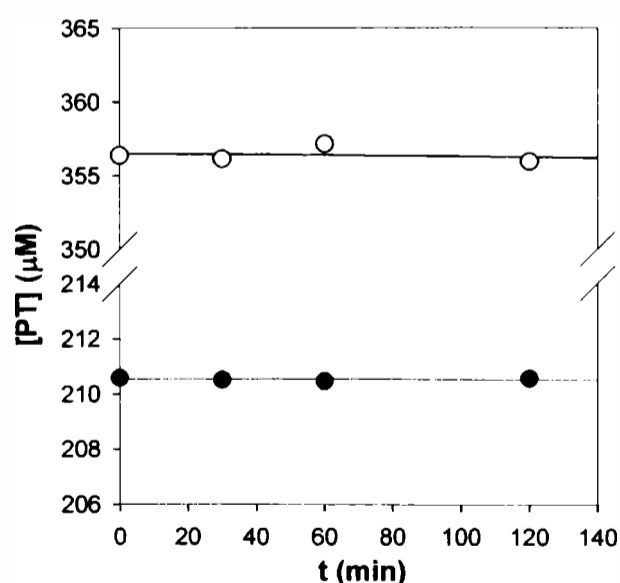


Figura 16.3: Evolución de la concentración de PT, determinada por HPLC, con el tiempo de irradiación. Los experimentos se desarrollaron en atmósfera de Ar. (●) Forma ácida ($[PT]_0=215$ μM ; pH 5,5). (○) Forma alcalina ($[PT]_0=350$ μM ; pH 10,5).

16.2 Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio ácido.

Los experimentos se desarrollaron en soluciones acuosas aireadas, en un intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,0 donde la forma ácida de PT está presente en más de un 99%. Después de irradiar con luz UV-A ($\lambda=350$ nm) estas soluciones de PT, tal como se muestra en la figura 16.4a, se observaron cambios importantes en los espectros de absorción, con puntos isobélicos a 248, 312 y 390 nm; los cuales se mantienen constantes, al menos, durante los primeros 120 minutos de irradiación. Estos cambios pueden apreciarse mejor en los espectros DE (figura 16.4b), que muestran una disminución en la absorbancia en la zona del espectro donde se ubican las dos bandas de absorción características de las pterinas. Por otro lado, cuando las soluciones irradiadas se mantienen en la oscuridad no se observan cambios espectrales, sugiriendo que los fotoproductos no participan en reacciones térmicas.

De estos resultados se deduce que, a diferencia de lo observado para HPT (capítulo 15) y para otros derivados pterínicos (ácido fólico, 6-formilpterina, biopterina y neopterina)^[1-6], la naturaleza química de los productos de fotooxidación de PT es diferente a la naturaleza química de las pterinas.

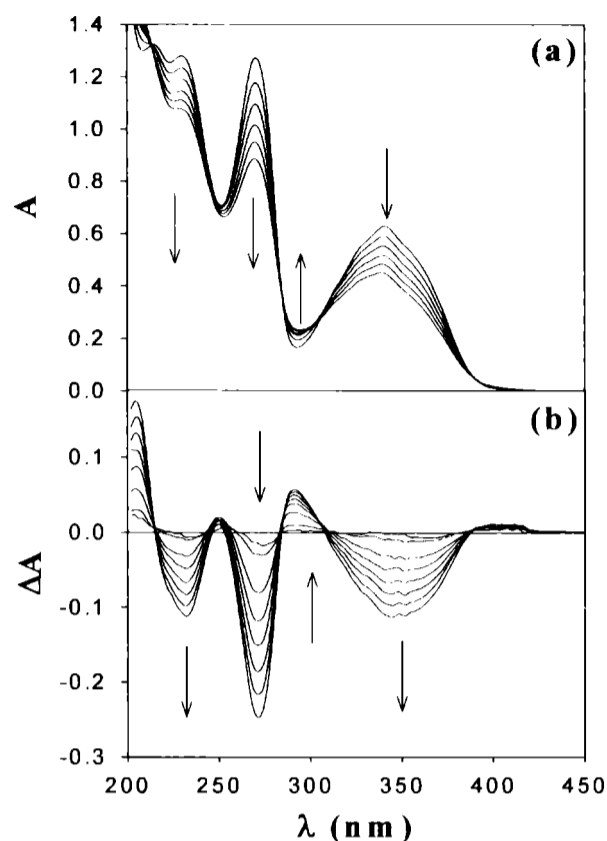


Figura 16.4: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$; $\text{pH}=6,0$) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. b) Espectros DE.

El análisis por TLC con placas de Tipo I (ver capítulo 9), de soluciones irradiadas de PT ($100 \mu\text{M}$, $\text{pH}=5,6$; solvente de corrida: solución acuosa de ClNH_4 3%), muestra la presencia de una única mancha fluorescente bajo irradiación UV-A, con $R_f=0,6$, que coincide con el patrón de PT. La intensidad de la emisión fluorescente de esta mancha, disminuye a medida que aumenta el tiempo irradiación. En estos experimentos no se detectaron productos que fluorescen al ser irradiados con luz UV-A, aún luego de 120 minutos de fotólisis. Sin embargo, en corridas cromatográficas usando placas de Tipo II reveladas con luz de 254 nm (ver capítulo 9), se pudieron detectar productos no fluorescentes. Estos resultados concuerdan con la interpretación hecha para los espectros de absorción y para los espectros DE: durante la irradiación existe consumo de PT y generación de productos no-pterínicos.

La disminución de la concentración de PT en función del tiempo de irradiación fue confirmada y cuantificada por HPLC. Los experimentos de irradiación de soluciones de PT de concentración $215 \mu\text{M}$ a $\text{pH} 5,5$ mostraron que la evolución de la concentración de PT

sigue una cinética de orden cero durante, al menos, los primeros 120 minutos de irradiación (figura 16.5). Bajo las condiciones experimentales de trabajo (condiciones de absorción total de la radiación incidente por parte de PT) la velocidad de degradación de PT fue de $0,73 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$. Para el rendimiento cuántico de desaparición de PT se obtuvo un valor de $(8,2 \pm 0,6) \times 10^{-4}$. Este valor es mucho menor que el obtenido para ambas formas ácido-base de HPT (capítulo 14 y 15); y menor que los Φ obtenidos para otros derivados 6-sustituídos, medidos en condiciones experimentales de trabajo similares^[1-3,7].

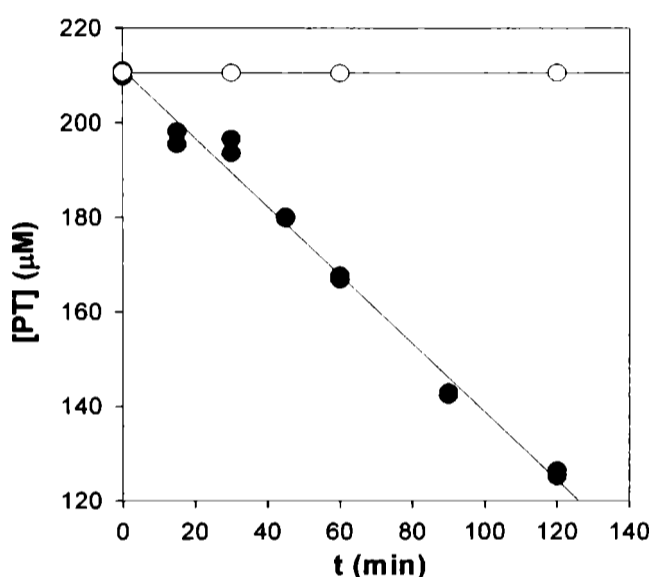


Figura 16.5: Evolución de la concentración de PT, determinada por HPLC, con el tiempo de irradiación ($[\text{PT}]_0 = 215 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$). (●) Fotólisis realizadas en presencia de O_2 (soluciones equilibradas con aire) y (○) en ausencia de O_2 (saturadas en Ar).

El análisis detallado de los cromatogramas (obtenidos por HPLC) correspondientes a las soluciones irradiadas de PT (figura 16.6a), muestra la presencia de, al menos, tres picos. El pico que tiene un t_R de 9,3 minutos, corresponde al reactivo PT. Los dos picos con t_R menores, corresponden a los fotoproductos (P_1 : $t_R = 3,1$ minutos y P_2 : $t_R = 6,2 \pm 1$ minutos). En la figura 16.6a puede apreciarse que el área de dichos fotoproductos es muy pequeña comparada con la de PT. Esto puede deberse a que la concentración de los fotoproductos es muy baja, a que la absorción a 340 nm de los mismo es muy baja, o a una combinación de ambos factores. La figura 16.6b muestra la variación del área de los picos P_1 y P_2 con el tiempo de irradiación. Puede observarse un aumento en la concentración de ambos productos durante los primeros 120 minutos.

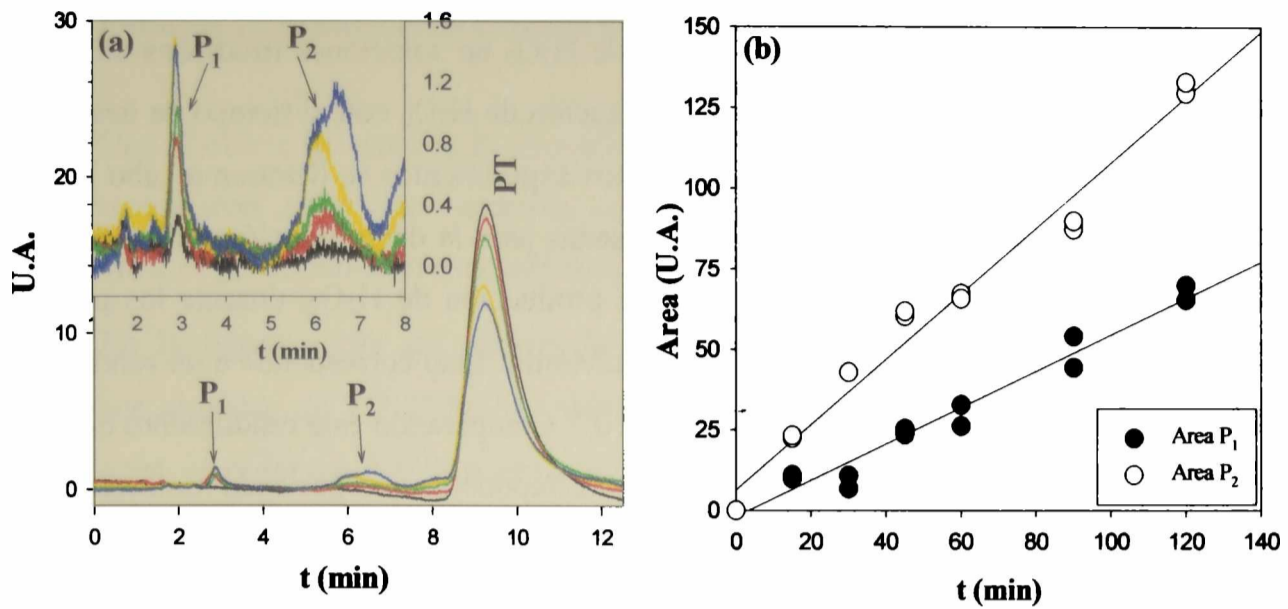


Figura 16.6: a) Cromatogramas ($\lambda_{an}=340$ nm) de una solución de PT ($[PT]_0=150$ μ M; pH=5,5) irradiada cada 30 minutos. Inset: Ampliación de la figura a). b) Evolución del área de los picos P₁ y P₂ con el tiempo de irradiación.

Se midió la evolución de la concentración de O₂ con el tiempo de irradiación, usando la técnica detallada en el capítulo 9. Como se muestra en la figura 16.7, la concentración de O₂ disminuye a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Esto indica que el O₂ participa activamente en la fotooxidación de PT.

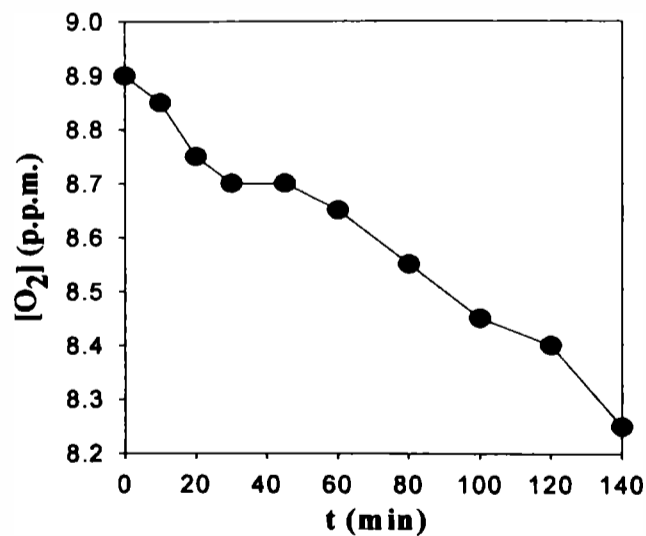


Figura 16.7: Evolución de la concentración de O₂ disuelto en soluciones de PT ($[PT]_0=150$ μ M; pH=5,5) con el tiempo de irradiación.

Por otro lado, se detectó la presencia de H_2O_2 en soluciones irradiadas de PT. La figura 16.8 muestra la evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de PT ($220 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$). Estos experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales que las usadas para la determinación del rendimiento cuántico de consumo de PT. La velocidad de producción de H_2O_2 , durante los primeros 120 minutos de irradiación, fue de $0,71 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$. Esto corresponde a un rendimiento cuántico de formación de H_2O_2 de $(8,0 \pm 0,9) \times 10^{-4}$. Comparando este rendimiento cuántico, con el de consumo de PT ($(8,2 \pm 0,6) \times 10^{-4}$), puede suponerse que por cada molécula de PT consumida se genera una molécula de H_2O_2 .

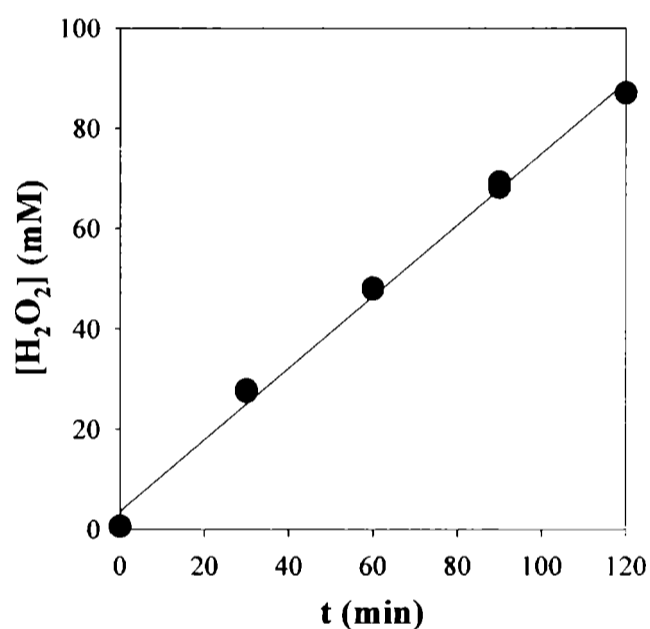


Figura 16.8: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de PT ($[\text{PT}]_0=220 \mu\text{M}$, $\text{pH}=5,5$).

La generación de H_2O_2 durante la fotooxidación de HPT fue descrita en el capítulo 15, y durante la fotooxidación de otros derivados pterínicos (BPT, NPT y FPT) ha sido descrita en la literatura^[8]. Se ha propuesto que la producción de H_2O_2 por parte de estos compuestos, se debe a la reacción del O_2 disuelto en el medio con intermediarios reducidos generados fotoquímicamente (estos intermediarios reducidos se detectan por espectrofotometría y sólo son estables en condiciones anaeróbicas). Obviamente, este mecanismo no es el que está involucrado en la generación de H_2O_2 a partir de PT debido a que un intermediario con características similares no ha sido detectado para el caso de este compuesto.

16.3 Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio alcalino.

Con el objeto de estudiar la fotoquímica de la forma básica de PT, se desarrollaron experimentos con soluciones acuosas aireadas, a pH mayores que 10. Bajo estas condiciones, el grupo fenólico está casi completamente disociado.

En la figura 16.9a se muestra la evolución de los espectros de absorción de soluciones aireadas de PT ($100\mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) con el tiempo de irradiación. En estas condiciones, se observan cambios espectrales significativos con puntos isobéuticos a 288 y 306 nm, que se mantienen constante durante, al menos, los primeros 150 minutos de irradiación. Al igual que para la forma ácida, cuando las soluciones irradiadas se mantienen en la oscuridad no se observan cambios espectrales.

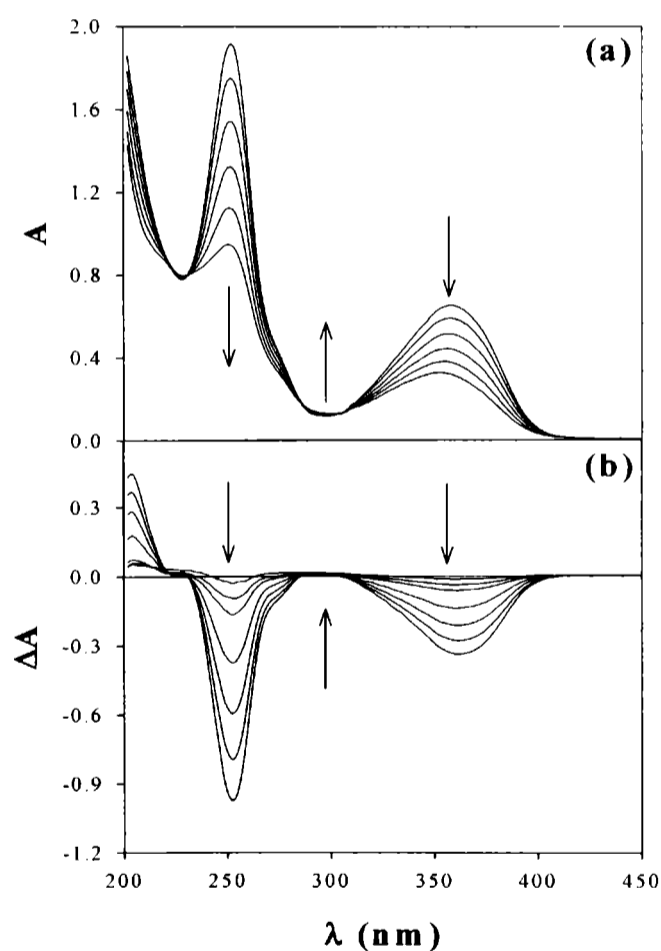


Figura 16.9: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones de PT ($[\text{PT}]_0=100\ \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. b) Espectros DE.

El análisis por TLC, con placas de Tipo I (ver capítulo 9), de soluciones irradiadas de PT (100 μM , $\text{pH}=10,5$; solvente de corrida: solución acuosa de ClNH_4 3%), muestra la presencia de una única mancha fluorescente con $R_f=0,6$, que coincide con el patrón de PT. A medida que aumenta el tiempo irradiación, disminuye la intensidad de la emisión fluorescente de PT. En estos experimentos no se detectaron productos que fluorescen al ser irradiados con luz UV-A, aún luego de 120 minutos de fotólisis. Sin embargo, en corridas cromatográficas usando placas de Tipo II reveladas con luz de 254 nm (ver capítulo 9), se pudieron detectar, al menos, dos fotoproductos no fluorescentes (A y B) con $R_f^A=0,7$ y $R_f^B=0,9$, además de la mancha correspondiente al reactivo PT ($R_f^{\text{PT}}=0,2$). La figura 16.10 muestra el espectro de absorción registrado de cada uno de los fotoproductos (ver capítulo 9) conjuntamente con el espectro de absorción de una solución patrón de PT. Puede apreciarse que los fotoproductos no presentan las bandas de absorción características de las pterinas. Estos resultados concuerdan con la interpretación hecha para los espectros de absorción y para los espectros DE: durante la irradiación existe consumo de PT y generación de productos no-pterínicos.

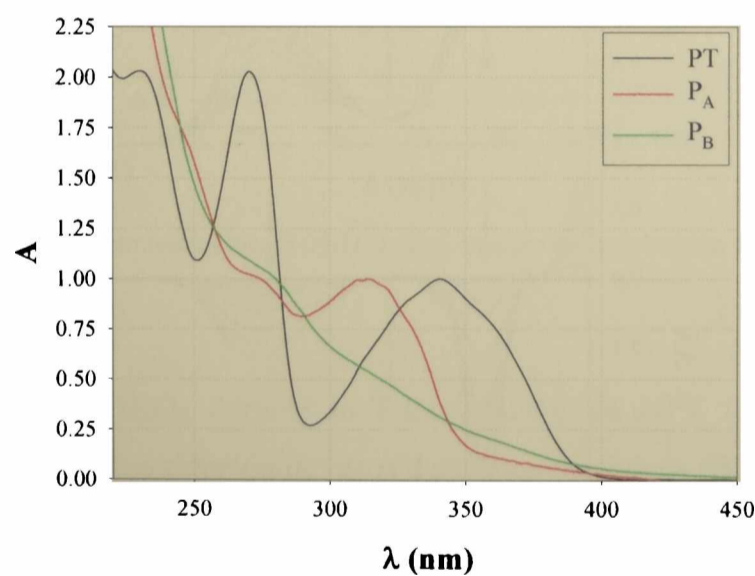


Figura 16.10: Espectros de absorción de los fotoproductos de la irradiación de una solución de PT ($[\text{PT}]_0=100 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10$), aislados en placas de TLC preparativa de Tipo II.

Los resultados obtenidos en el estudio de la fotólisis de la forma alcalina de PT, tanto por análisis espectrofotométrico como por TLC, son similares a los presentados en la sección anterior para la forma ácida. Esto sugiere que ambas formas ácido-base se comportan fotoquímicamente de la misma manera.

El análisis por HPLC de soluciones irradiadas de PT ($360\mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) muestra que durante los primeros 120 minutos de irradiación la evolución de la concentración de PT sigue una ley de velocidad de orden cero (figura 16.11). La velocidad de consumo de PT fue de $0,91\pm 0,06\ \mu\text{M}/\text{min}$ y el correspondiente rendimiento cuántico fue de $(1,2\pm 0,2)\times 10^{-3}$. Este valor es ligeramente mayor al calculado para la forma ácida ($(8,2\pm 0,6)\times 10^{-4}$). Con fines comparativos, en la figura 16.11 también se presentan los resultados de los experimentos en ausencia de O_2 presentados en la sección 16.1.

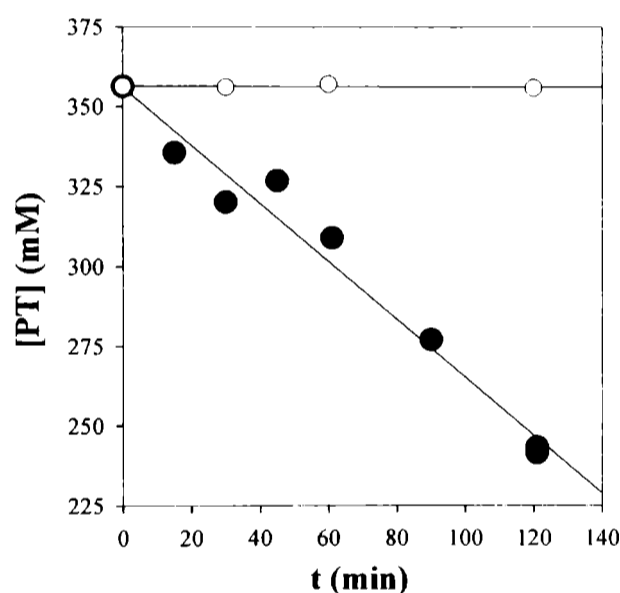


Figura 16.11: Evolución de la concentración de PT, determinada por HPLC, con el tiempo de irradiación ($[\text{PT}]_0=360\ \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$). (●) Fotólisis realizadas en presencia de O_2 (soluciones equilibradas con aire) y (○) en ausencia de O_2 (saturadas en Ar).

En la figura 16.12a se muestran los diferentes cromatogramas (obtenidos por HPLC) correspondientes a soluciones irradiadas de PT. Puede observarse la presencia de tres picos. El pico que tiene un t_R de 7,0 minutos, corresponde al reactivo PT. Los dos picos con t_R menores, corresponden a los fotoproductos (P_1 : $t_R=2,4$ minutos y P_2 : $t_R=5,3$ minutos). En esta misma figura, puede apreciarse que el área de dichos fotoproductos es muy pequeña comparada con la de PT. Nuevamente; esto puede deberse a que la

concentración de los fotoproductos es muy baja, a que la absorción a 340 nm de los mismo es muy baja, o a la combinación de ambos factores. En la figura 16.12b se muestra la evolución de las áreas de los picos correspondientes a los dos productos, con el tiempo de irradiación. Esta figura muestra el incremento del área del pico correspondiente a cada fotoproducto, a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

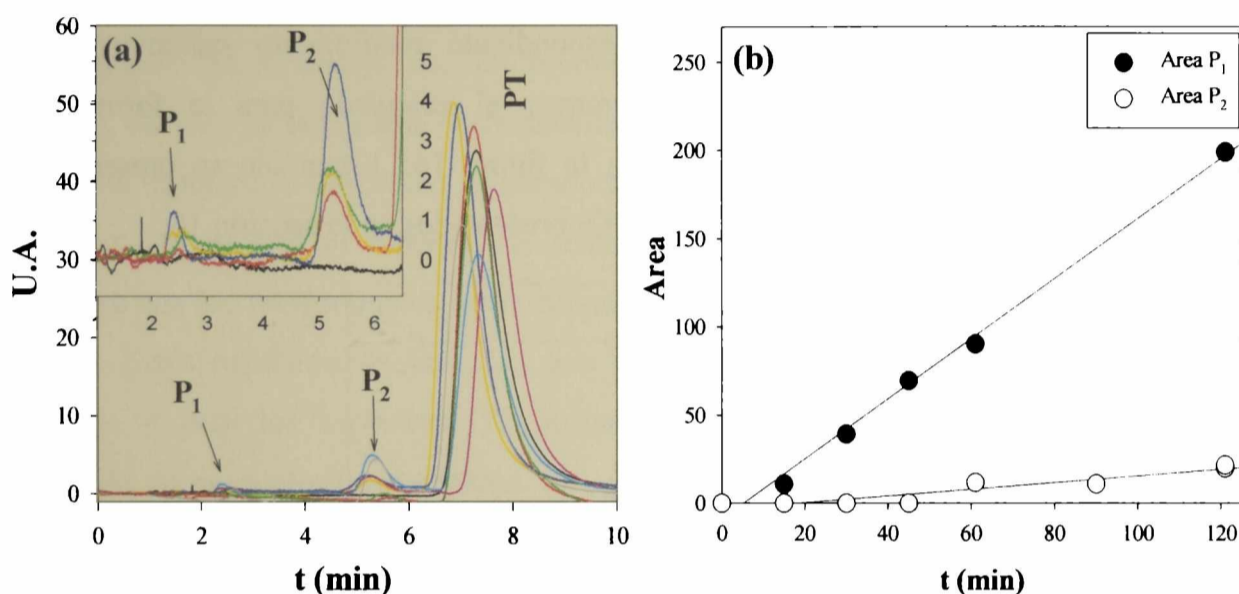


Figura 16.12: a) Cromatogramas ($\lambda_{an}=340$ nm) de una solución de PT ($[PT]_0=360$ μ M; pH=10,5) irradiada cada 30 minutos. Inset: Ampliación de la figura a). b) Evolución del área de los picos P₁ y P₂ con el tiempo de irradiación.

En la figura 16.13 se muestra la evolución de la concentración de O₂ disuelto en función del tiempo de irradiación de una solución de PT (pH=10,5). Los resultados se comparan con aquellos obtenidos en medio ácido (ver sección 16.2, figura 16.7). Puede apreciarse que la velocidad de consumo de O₂ es mayor que la observada para la fotólisis de la forma ácida. Esto coincide con el mayor valor de rendimiento cuántico de consumo de PT que se observa para la forma alcalina, indicando una mayor velocidad de fotooxidación y, consecuentemente, una mayor velocidad de consumo de O₂.

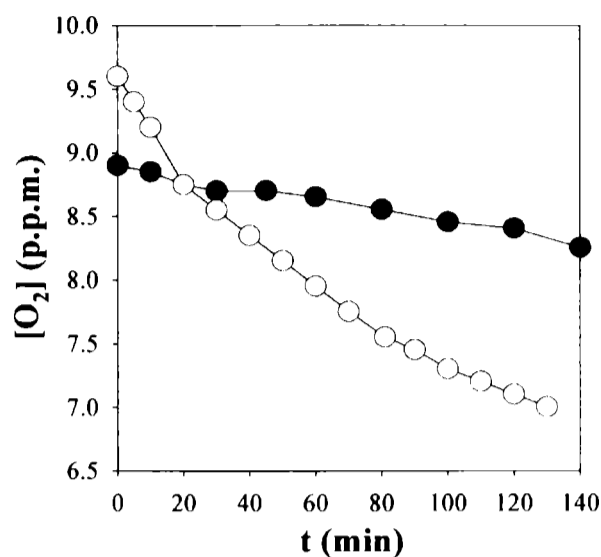


Figura 16.13: Evolución de la concentración de O₂ disuelto en soluciones de PT ([PT]₀=150 µM) con el tiempo de irradiación. (○) Resultados en medio alcalino (pH=10,3) y (●) resultados en medio ácido (pH=5,5).

Como se muestra en la figura 16.14, también se genera H₂O₂ cuando se irradian soluciones alcalinas de PT. En este caso, para los primeros 120 minutos de irradiación, la velocidad de producción de H₂O₂ fue de $0,14 \pm 0,01$ µM/min y el correspondiente rendimiento cuántico de formación de H₂O₂ fue de $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-4}$. Este valor es menor que el observado en medio ácido. Además, comparando el valor del rendimiento cuántico de formación de H₂O₂ con el valor del rendimiento cuántico de consumo de PT ($(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$) medido en medio alcalino, puede apreciarse que es mucho menor. De este análisis se desprende que se genera una molécula de H₂O₂ por cada 8 moléculas de PT que se consumen. En el caso de la forma ácida la relación encontrada fue de 1:1.

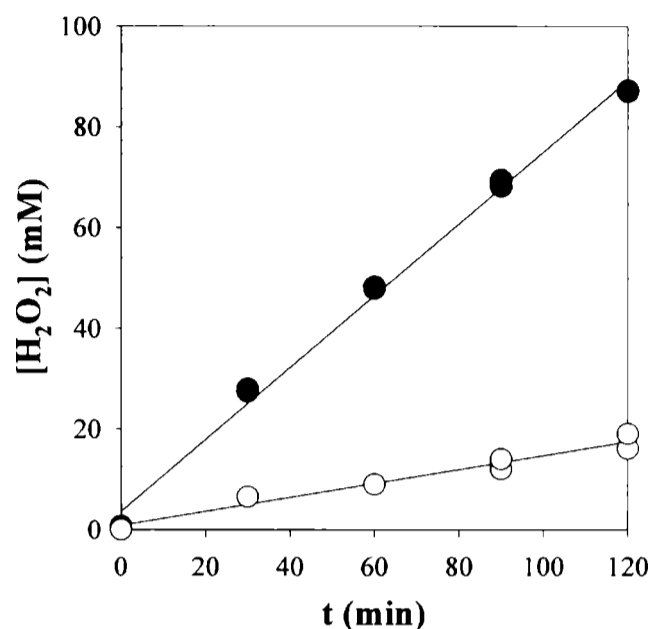


Figura 16.14: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de PT. (○) Resultados en medio alcalino ($[\text{PT}]_0=220 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,3$) y (●) resultados en medio ácido ($[\text{PT}]_0=360 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$).

En los capítulos precedentes se mostró que en soluciones fuertemente alcalinas pH mayores a 11, varios derivados pterínicos presentan cambios en su comportamiento fotofísico, tales como es descenso en los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de producción de $^1\text{O}_2$. Con el objeto de evaluar la influencia de concentraciones relativamente altas de OH^- sobre la fotoquímica de PT, se realizaron experimentos de irradiación sobre soluciones de PT fuertemente alcalinas (pH mayores a 11). En la figura 16.15 se muestra la evolución de los espectros de absorción de soluciones de PT con el tiempo de irradiación, en dos condiciones de pH diferente (10,5 y 11,5).

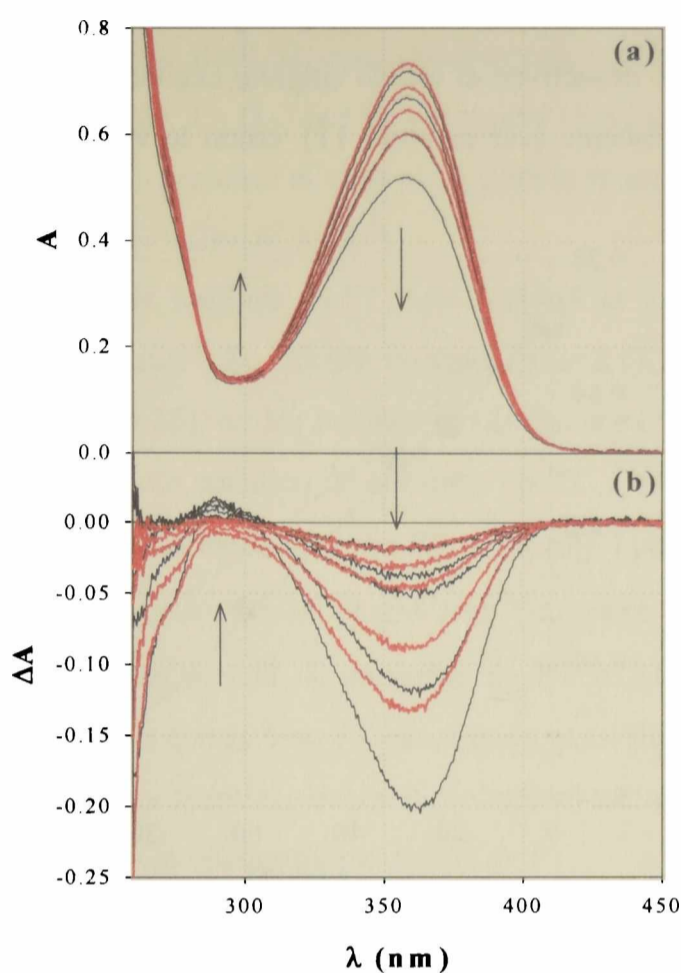


Figura 16.15: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones alcalinas de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$) con el tiempo de irradiación. Se graficaron los espectros correspondientes a 0, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. b) Espectros DE. (—) Fotólisis de soluciones de pH 10,5 y (---) Fotólisis de soluciones de pH 11,5.

En la figura 16.16, se muestra el cambio de la absorbancia a 360nm con el tiempo de irradiación. Puede apreciarse que la velocidad de cambio en la fotólisis a pH 10,5 ($-1,83 \times 10^{-3} \text{ UA min}^{-1}$) es mayor que la observada a pH 11,5 ($-1,44 \times 10^{-3} \text{ UA min}^{-1}$). La relación de velocidades ($v^{11,5}/v^{10,5}$) es aproximadamente igual a 0,8. Este fenómeno puede explicarse, teniendo en cuenta la hipótesis planteada en el capítulo 11 para otros derivados pterínicos, donde se postuló que, en condiciones de pH superiores a 11, hay una desactivación del estado singlete excitado de PT. Consecuentemente, este mecanismo de desactivación explicaría la disminución en la velocidad de degradación fotoquímica de PT observada. Más aún, haciendo el cálculo del factor de desactivación de la emisión ($I^{11,5}/I^{10,5}$), al cambiar de una solución de pH 10,5 a una de pH 11,5, se obtiene un valor

cercano a 0,8. Este resultado corrobora la hipótesis planteada, dejando en claro que a pH superiores a 11, los OH⁻ desactivan el estado singlete excitado de PT, disminuyendo, tanto la vía de emisión fluorescente (ver capítulo 11), como la vía de reacción fotoquímica de PT.

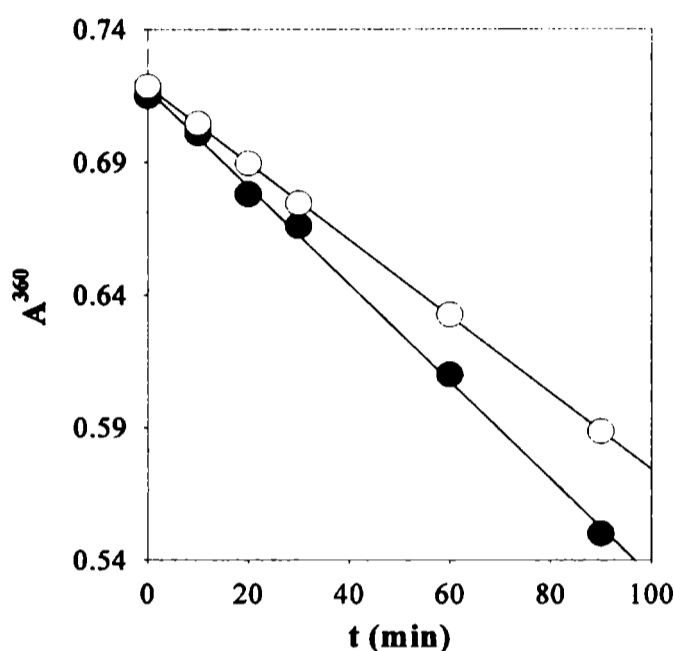


Figura 16.16: Evolución de la absorbancia con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$; pH=10,5) y (○) fotólisis de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$; pH=11,5). Resultados obtenidos con celda de 1 cm. de camino óptico. Longitud de onda de análisis 360 nm.

16.4 El rol del oxígeno singlete.

PT genera $^1\text{O}_2$ cuando es irradiada con luz UV-A en soluciones acuosas^[9]. Por otro lado, PT reacciona con esta especie reactiva, tal como se demostró en el capítulo 13. En base a estos resultados, es imprescindible evaluar la importancia cuantitativa de esta reacción en el proceso de fotooxidación de PT por luz UV-A. Para ello se utilizan dos herramientas diferentes: cálculos cinéticos y experimentos de fotólisis realizados en D_2O .

16.4.1 Análisis cinético.

El análisis cinético que se expondrá en esta sección es similar al expuesto para la forma alcalina de HPT (sección 15.3.1, del capítulo 15). Debido a ello, se obviará la descripción de algunos detalles del procedimiento. Han sido publicados en la literatura los

valores de los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) para las formas ácida y alcalina de PT^[9] ($0,18\pm 0,02$ y $0,30\pm 0,02$, respectivamente), y el valor de la constante de velocidad de *quenching* total de $^1\text{O}_2$ (k_T) por PT en medio alcalino ($2,9\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[9]. Por otra parte, en el capítulo 13, se presentó el valor de k_r para la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y la forma alcalina de PT ($(2,5\pm 0,2)\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

En los experimentos de fotólisis de PT, la velocidad de fotones absorbida por PT (P_a) fue igual a $7,2\times 10^{-4} \text{ E l}^{-1}\text{min}^{-1}$. Se calculó un valor igual a ($1,5\times 10^{-11} \text{ M}$) para la $[^1\text{O}_2]$ (ver ecuación (2) del capítulo 15), en las mismas condiciones experimentales usadas para la determinación del rendimiento cuántico de consumo de PT. Con la $[^1\text{O}_2]$ y la $[\text{PT}]_0$ ($357 \mu\text{M}$) se calculó la velocidad de la reacción entre PT y $^1\text{O}_2$ ($d[\text{PT}]/dt$)₁ (ver ecuación (1) del capítulo 15), obteniéndose un valor de $0,079 \mu\text{M}/\text{min}$. Este valor es mucho menor que el obtenido de la velocidad experimental de consumo de PT ($0,91\pm 0,06 \mu\text{M}/\text{min}$). Por lo tanto, estos resultados sugieren que si bien PT es un buen sensibilizador de $^1\text{O}_2$ y es capaz de desactivar $^1\text{O}_2$, la reacción química, en medio alcalino, entre ambas especies no es cuantitativamente relevante en la vía de fotooxidación de PT.

16.4.2 Fotólisis en agua deuterada.

Se irradiaron soluciones de PT ($[\text{PT}]_0=150 \mu\text{M}$, equilibradas con aire) en D_2O y H_2O , en ambas condiciones de pH. En estos experimentos se observó que, para la forma ácida de PT, los espectros DEN (figura 16.17a) y los cambios en las absorbancias a diferentes longitudes de onda (figura 16.18a) fueron similares para las fotólisis realizada en ambos solventes (H_2O y D_2O). Por otro lado, de la velocidad de producción de D_2O_2 en los primeros 90 minutos de irradiación en D_2O ($0,57\pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}$) es similar a la observada en H_2O ($0,49\pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}$). Estos resultados sugieren que, en medio ácido, la vía de degradación de PT por reacción con $^1\text{O}_2$ es despreciable frente a la vía de fotooxidación directa.

Experimentos similares realizados en medio alcalino mostraron que los espectros DEN de la fotólisis en D_2O , presentan una pequeña diferencia en la zona de λ entre 270 y 280nm comparados con los espectros DEN de la fotólisis en H_2O . Los cambios en las absorbancias a diferentes longitudes de onda observados en la fotólisis en D_2O fueron levemente mayores (figura 16.17b). Del análisis realizado a λ 340nm, se obtiene que la

velocidad de cambio de la absorbancia en la fotólisis en D₂O es, aproximadamente, 2 veces mayor que la observada para la fotólisis en H₂O (figura 16.18a). Estos resultados indican que, si bien se alcanza a apreciar el efecto del ¹O₂ en la reacción total, éste no contribuye significativamente en el mecanismo de la fotólisis directa. Sin embargo, la velocidad de producción de D₂O₂ durante los primeros 90 minutos de irradiación fue, aproximadamente, 3 veces mayor en D₂O (0,34±0,03 μM/min) que en H₂O (0,12±0,02 μM/min). Estos resultados sugieren que H₂O₂ es un producto de reacción entre PT y ¹O₂.

Los resultados hallados para ambas condiciones de pH, concuerdan con la hipótesis sugerida a partir de los cálculos de la velocidad de consumo de PT debida a la reacción con ¹O₂, que sugieren que dicha reacción es despreciable tanto en medio ácido como en medio alcalino.

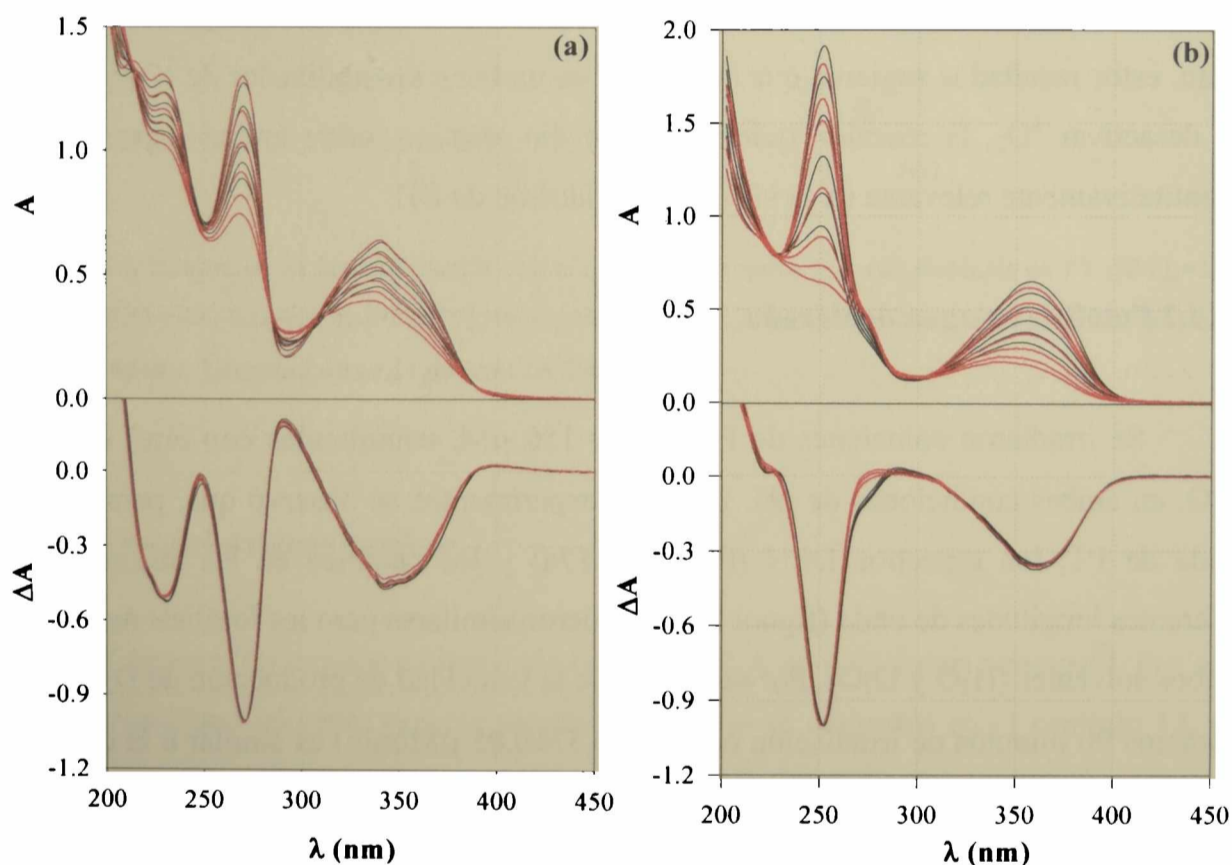


Figura 16.17: Evolución del espectro de absorción y espectros DEN de soluciones de PT ($[PT]_0=100 \mu\text{M}$), en función del tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. (—) Fotólisis en H₂O y (---) Fotólisis en D₂O. a) Resultados de la fotólisis a pH y pD 5,5 b) Resultados de la fotólisis a pH y pD 10,5.

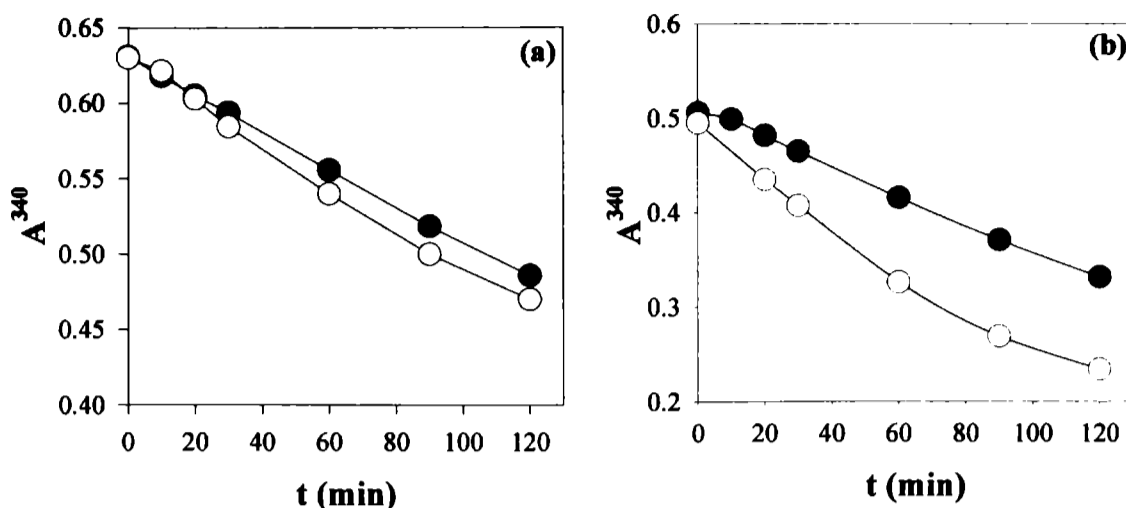


Figura 16.18: Evolución de las absorbancias en función del tiempo de irradiación ($\lambda=340$). (○) Fotólisis en D_2O y (●) fotólisis en H_2O . Resultados obtenidos con celda de 1 cm. de camino óptico. a) Resultados de la fotólisis a pH y pD 5,5 b) Resultados de la fotólisis a pH y pD 10,5.

16.5 Conclusiones.

En ausencia de O_2 , ambas formas ácido-base de PT son fotoestables. Sin embargo, la excitación en presencia de O_2 lleva a la oxidación de la molécula, generando como fotoproductos un grupo de compuestos que no son de naturaleza pterínica. El rendimiento cuántico asociado al consumo de PT es de $(8,2\pm 0,6)\times 10^{-4}$ y de $(1,2\pm 0,2)\times 10^{-3}$ para las formas ácida y básica respectivamente.

Durante la fotooxidación de PT se genera H_2O_2 . Las condiciones de pH afectan considerablemente la generación de H_2O_2 : en el caso de la forma ácida, se genera una molécula de H_2O_2 por cada molécula de PT consumida; mientras que para la forma alcalina, la producción de H_2O_2 es al menos un orden de magnitud menor que el consumo de PT. Ha sido demostrado la presencia de CPT en las zonas afectadas de la piel de pacientes con vitiligo^[8,10,11]. Por otra parte, se conoce que PT es un producto que se genera en la decarboxilación fotoquímica de CPT^[6]. En consecuencia, es posible que PT esté presente en las lesiones del vitiligo y la producción fotoquímica de H_2O_2 , por parte de este compuesto, contribuya a mantener los elevados niveles observados de dicha especie reactiva, que provocan la interrupción de la melanogénesis.

PT es un buen sensibilizador de $^1\text{O}_2$ ^[9], por esto, se evaluó la participación de dicha especie en la fotoquímica de PT. Los análisis cinéticos y los experimentos realizados usando D_2O como solvente, indican que el $^1\text{O}_2$ no contribuye significativamente en la fotooxidación de PT tanto en medio ácido como alcalino. Estos resultados demuestran que si bien el $^1\text{O}_2$ reacciona con PT (capítulo 13), esta reacción no constituye la principal vía de consumo de PT en su fotólisis.

16.6 Referencias.

- [1] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" (2001).
- [2] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R., Capparelli A. L.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **135**, 147 (2000).
- [3] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., García Einschlag F. S., Martino R., Baiocchi C., Pramauro E., Capparelli A. L.; *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2300 (2002).
- [4] Mengel R., Pfliegerer W. y Knappe W. R.; *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2817 (1977).
- [5] Forrest H. S. y Mitchell H. K.; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4865 (1955).
- [6] Suárez G., Cabrerizo F. M., Lorente C., Thomas A. H. y Capparelli A. L.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **132**, 53 (2000)
- [7] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Capparelli A. L.; *Helv. Chim. Acta*, **84**, 3849 (2001).
- [8] Rokos H., Beazley W. D., Schallreuter K. U.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 805 (2002).
- [9] Thomas A. H., Lorente C. Capparelli A. L., Martínez C. G., Braun A. M., Oliveros E.; *Photochem. Photobiol Sci.*, **2**, 245 (2003).
- [10] Schallreuter K. U., Wood J. M., Pittelkow M. R., Gütlich M., Lemke K. R., Rödl W., Swanson N. N., Hitzemann K., Ziegler I.; *Science*, **263**, 1444 (1994).
- [11] Schallreuter K. U., Wood J. M., Pittelkow M. R., Gütlich M., Lemke K. R., Rödl W., Swanson N. N., Hitzemann K., Ziegler I.; *Science*, **263**, 1444 (1994).

FOTÓLISIS DE 6-METILPTERINA: SOLUCIONES ÁCIDAS Y ALCALINAS

En la literatura existen numerosas publicaciones referidas al estudio fotoquímico de diversos derivados pterínicos 6-sustituidos^[1-4]. En dichas publicaciones se muestra que, en la mayoría de los compuestos estudiados, es el sustituyente de la posición 6 el que sufre la fotooxidación. Los resultados presentados en los capítulos 14 y 15 suman evidencia en este sentido, mostrando que la fotooxidación de ambas formas ácido-base de HPT ocurre directamente sobre el sustituyente hidroximetilo. Por otro lado, se observó para PT (capítulo 16) y CPT^[4] que el doble anillo también es atacado, pero con rendimientos cuánticos de consumo (Φ) menores. En base a estos antecedentes, se decidió investigar que ocurriría con el proceso de fotooxidación de un derivado pterínico que tuviese en la posición 6 del anillo un sustituyente difícil de oxidar. En particular, se decidió estudiar la fotoquímica de MPT en ambas condiciones de pH.

17.1 Irradiación en ausencia de oxígeno.

Con el objeto de determinar el rol del O₂ en la fotoquímica de MPT, se irradiaron con luz UV-A (350nm) soluciones de MPT, de concentraciones comprendidas entre 100 y 200 μ M, previamente burbujeadas con Ar. El análisis espectrofotométrico muestra que, tanto en medio ácido (pH 5,5–6,0) como en medio alcalino (pH 10,2–10,5) no se observan cambios significativos en los espectros de absorción de las soluciones de MPT irradiadas por más de 120 minutos (figura 17.1). Por otra parte, en el análisis por TLC realizado con placas de Tipo I (ver capítulo 9), sólo se detectó una única mancha fluorescente con un R_f igual a 0,5 que corresponde al reactivo MPT. En el análisis por HPLC no se detectaron fotoproductos (figura 17.2), ni pudo apreciarse un descenso significativo de la concentración del reactivo con el tiempo de irradiación (figura 17.3).

Los resultados mostrados en esta sección son similares a los obtenidos para PT en las mismas condiciones experimentales (sección 16.1) e indican que, tanto la forma ácida como la forma alcalina de MPT en soluciones acuosas, son fotoquímicamente estables cuando son irradiadas con luz UV-A en condiciones anaeróbicas.

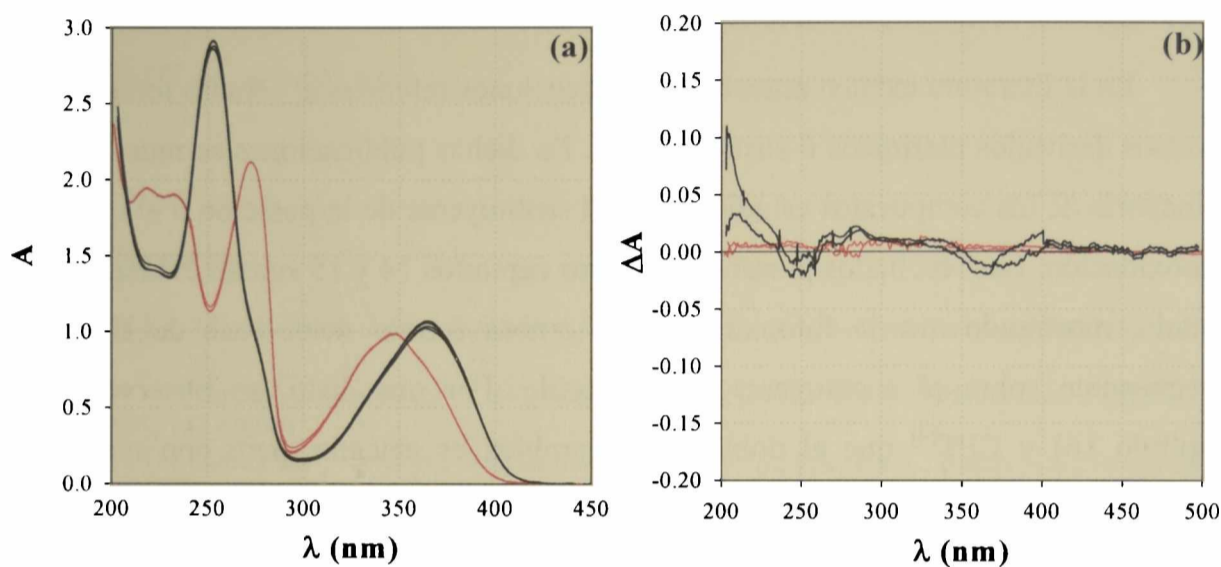


Figura 17.1: Irradiación de una solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu M$) en ausencia de O_2 . Espectros registrados cada 30 minutos, durante 120 minutos. (—) Irradiación de soluciones ácidas (pH=5,5). (—) Irradiación de soluciones alcalinas (pH=10,5). a) Espectros de absorción. b) Espectros DE.

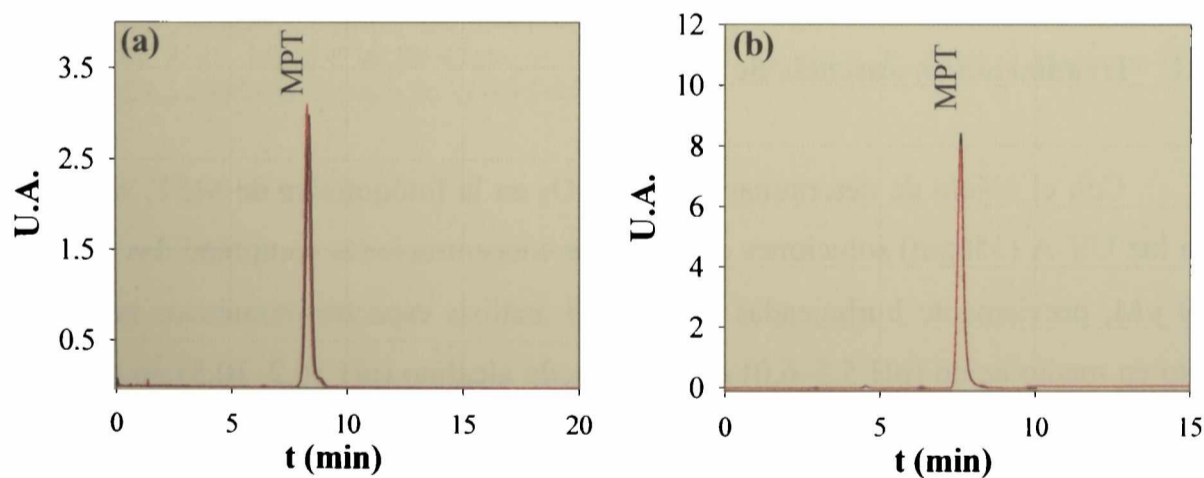


Figura 17.2: Cromatogramas ($\lambda_{análisis}=340 \text{ nm}$). a) Solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu M$; pH=5,5) irradiada durante 0 y 120 minutos. b) Soluciones de MPT ($[MPT]_0=150 \mu M$; pH=10,5) irradiadas durante 0 y 120 minutos.

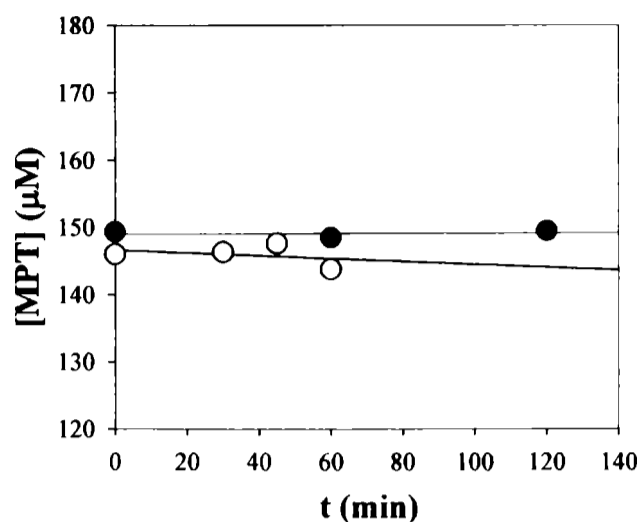


Figura 17.3: Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; saturadas en Ar) con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis de la forma ácida ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; pH 5,5). (○) Fotólisis de la forma alcalina ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; pH 10,5). La concentración de MPT se determinó por HPLC.

17.2 Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio ácido.

Estos experimentos se desarrollaron en un intervalo de pH comprendido entre 5,0 y 6,0 donde la forma ácida de MPT está presente en más de un 99% ($pK_a=8,3\pm 0,1$, ver capítulo 9). El análisis espectrofotométrico de las soluciones de MPT irradiadas en presencia de O_2 , muestra pequeños cambios en los espectros de absorción (figura 17.4a); con puntos isobésticos a 283 y 330 nm, que se mantienen constantes, al menos, durante los primeros 120 minutos de irradiación. Estos cambios pueden apreciarse mejor en los espectros DE (figura 17.4b), que muestran una disminución en la absorbancia en la zona del espectro donde se ubican las dos bandas de absorción características de MPT; y un incremento en la absorbancia alrededor de los 300 nm. En este caso, y a diferencia de lo observado para PT, no se aprecia un aumento de la absorbancia a λ mayores a 400 nm. Cuando las soluciones irradiadas se mantienen en la oscuridad no se observan cambios.

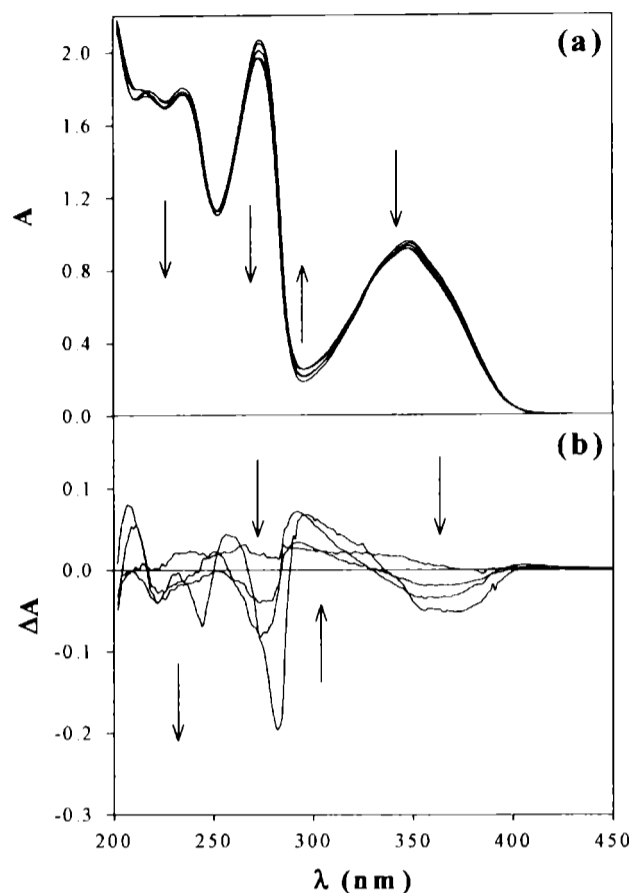


Figura 17.4: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. b) Espectros DE.

La evolución de la concentración de MPT con el tiempo de irradiación fue seguida por HPLC. Los experimentos de irradiación de soluciones de MPT de concentración $150 \mu\text{M}$ a $\text{pH}=5,5$ mostraron que la evolución de la concentración de MPT sigue una cinética de orden cero durante, al menos, los primeros 90 minutos de irradiación (figura 17.5). Bajo las condiciones experimentales de trabajo ($P_a=(7,1\pm 0,1)\times 10^{-4}$) la velocidad de degradación de MPT fue de $0,18\pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$, siendo el correspondiente valor del rendimiento cuántico de consumo de MPT (Φ^{MPT}) igual a $(2,4\pm 0,5)\times 10^{-4}$. Este valor es mucho menor que el obtenido para HPT en ambas condiciones de pH (capítulo 14 y 15); y menor que los rendimientos cuánticos obtenidos para otros derivados pterínicos 6-sustituidos, medidos en condiciones de trabajo similares^[1-5]. Además, el valor de Φ^{MPT} obtenido es menor que el rendimiento cuántico de consumo de la forma ácida de PT (Φ^{PT}) presentado en el capítulo anterior ($(8,2\pm 0,6)\times 10^{-4}$).

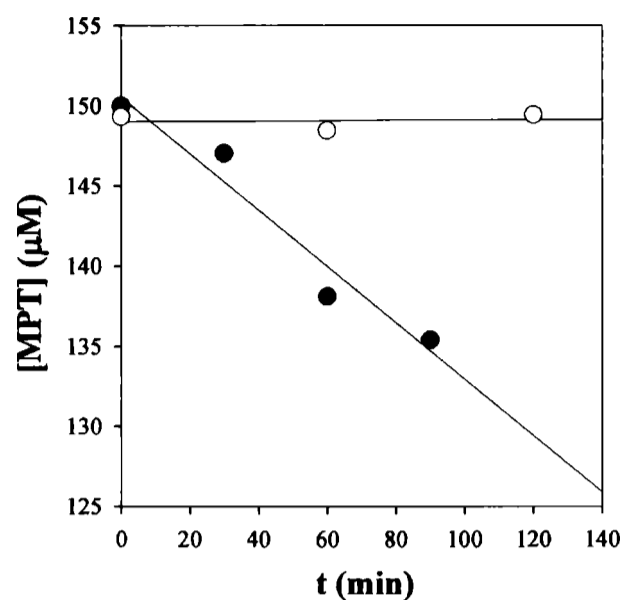


Figura 17.5: Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis realizadas en presencia de O_2 (soluciones equilibradas con aire) y (○) en ausencia de O_2 (saturadas en Ar). La concentración de MPT se determinó por HPLC.

Se analizaron detalladamente los cromatogramas obtenidos por HPLC, para cada una de las soluciones irradiadas (figura 17.6), observándose la presencia de, al menos, tres picos. El pico con un t_R de 8,2 minutos, corresponde al reactivo MPT, los otros dos picos corresponden a fotoproductos (P_1 : $t_R=6,5$ minutos y P_2 : $t_R=8,4$ minutos), y presentan áreas muy pequeñas. Debido a esto, no fue posible realizar la integración de cada uno de los picos, y por ende, no fue posible graficar la evolución del área de cada pico (P_1 y P_2) con el tiempo de irradiación.

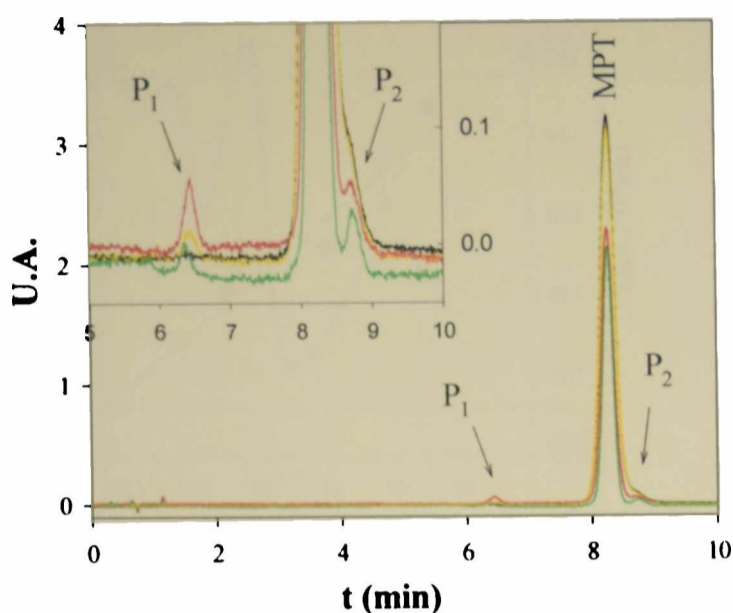


Figura 17.6: Cromatogramas. Solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; pH 5,5) irradiada cada 30 minutos.
Inset: Ampliación de la figura. Longitud de onda de análisis: 340 nm.

Así mismo, se monitoreó la evolución de la concentración de O_2 disuelto con el tiempo de irradiación, mediante el empleo de un electrodo selectivo de O_2 (capítulo 9). En la figura 17.7, puede apreciarse que la concentración de O_2 disminuye a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Este resultado indica que el O_2 tiene un papel activo en la fotólisis de la forma ácida de MPT.

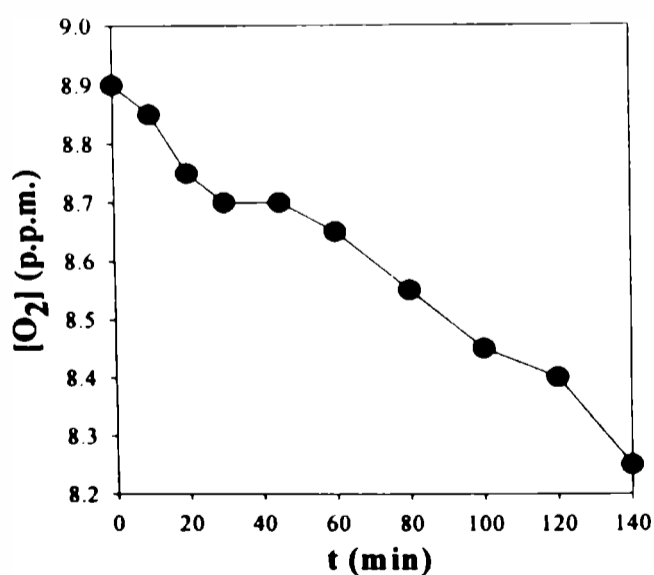


Figura 17.7: Evolución de la concentración de O_2 disuelto en soluciones de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; pH=5,5) con el tiempo de irradiación.

Por otro lado, se detectó la presencia de H_2O_2 en las soluciones irradiadas de MPT. En la figura 17.8 se muestra la evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de MPT ($150 \mu\text{M}$, $\text{pH}=5,5$). Estos experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales que las usadas para la determinación del rendimiento cuántico de consumo de MPT. La velocidad de producción de H_2O_2 , durante los primeros 120 minutos de irradiación, fue de $0,15 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$; esto corresponde a un rendimiento cuántico de formación de H_2O_2 de $(2,1 \pm 0,4) \times 10^{-4}$. Comparando el rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 con el de consumo de MPT $((2,4 \pm 0,5) \times 10^{-4})$, puede suponerse que por cada molécula de MPT consumida se genera una molécula de H_2O_2 , y que el H_2O_2 se genera a través de mecanismos similares a los existentes en la fotólisis de PT.

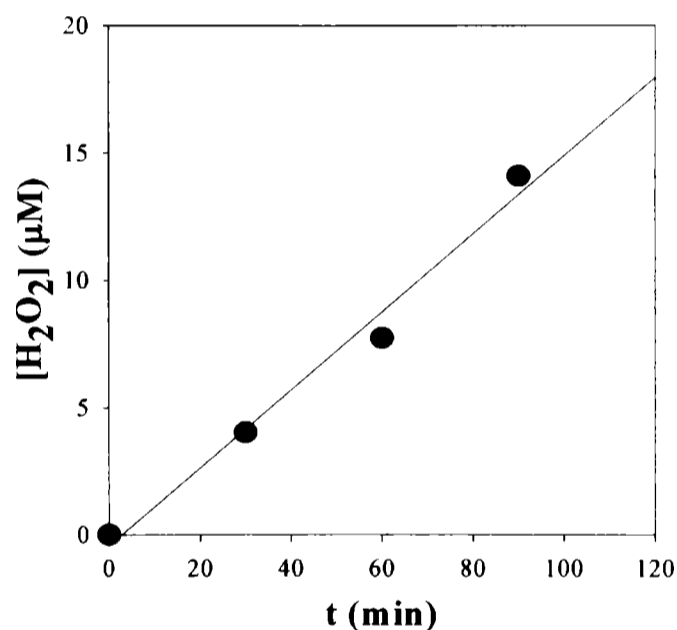


Figura 17.8: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de MPT ($[\text{MPT}]_0=220 \mu\text{M}$, $\text{pH}=5,5$).

Para saber si el radical hidroxilo (HO^\cdot) está involucrado en el mecanismo de fotooxidación de la forma ácida de MPT, se realizaron experimentos de fotólisis en presencia de 2-propanol y etanol (ver capítulo 8). Se irradiaron soluciones de MPT ($140 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) en presencia de diferentes concentraciones de alcohol ($1,5\text{--}150 \text{ mM}$). Se registraron los espectros de absorción a distintos tiempos de irradiación y se obtuvieron los correspondientes espectros ED. En la figura 17.9a se muestran los resultados de la fotólisis

de una solución ácida de MPT, en presencia de 2-isopropanol (150mM). En la figura pueden apreciarse pequeñas variaciones espectrales, las cuales pueden observarse con mayor detalle en la figura 17.9b.

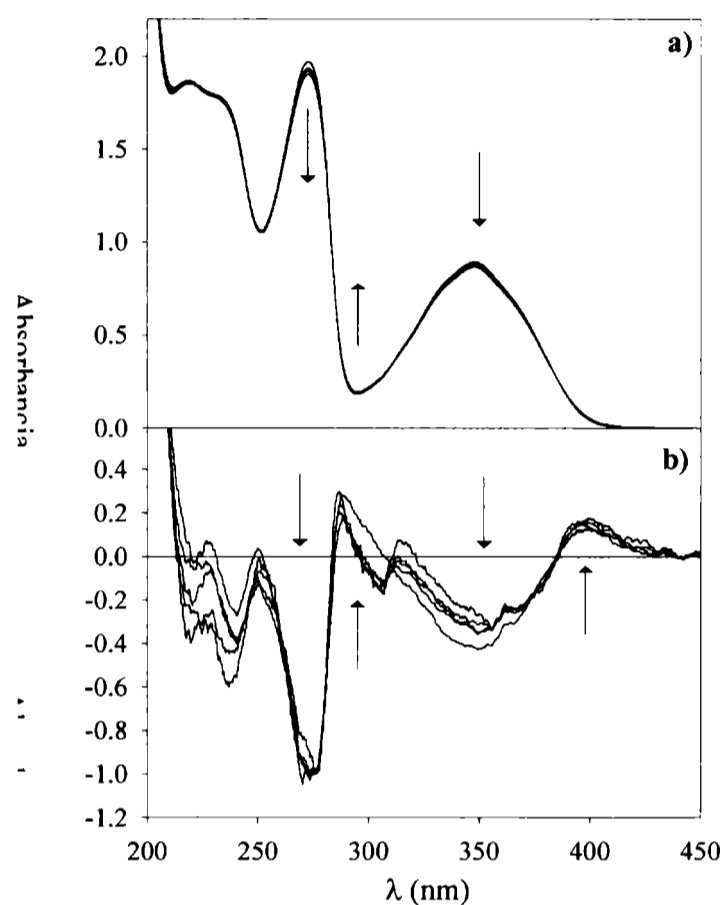


Figura 17.9: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) al ser irradiada en presencia de 2-propanol. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de MPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación.

En la figura 17.10 se comparan los espectros DEN obtenidos durante la fotólisis en ausencia y presencia de 2-isopropanol. Puede observarse que no existen diferencias significativas entre los espectros DEN correspondientes a ambos grupos de experimentos. Esto sugiere que la naturaleza química de los procesos que ocurren en la fotólisis en presencia de alcohol es similar a la que ocurre en ausencia del mismo.

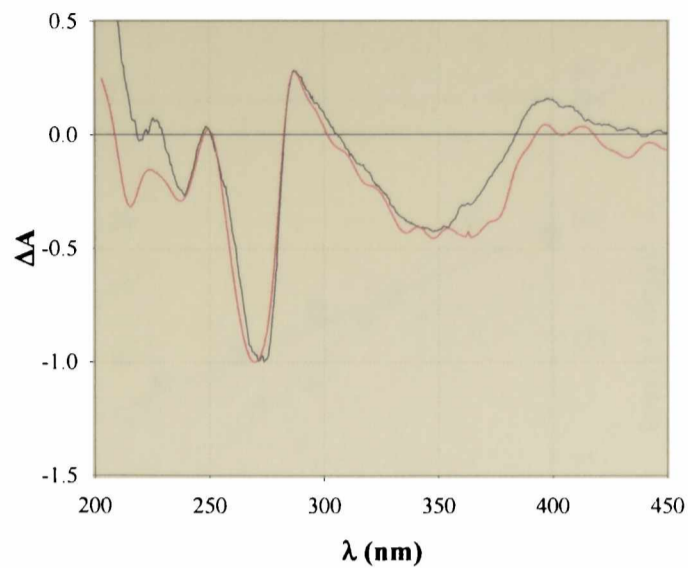


Figura 17.10: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de MPT inicial al espectro obtenido después de 90 minutos de irradiación en ausencia de 2-propanol; El Espectro DEN () se obtuvo restando el espectro de MPT inicial al espectro obtenido luego de 90 minutos de irradiación en presencia de 2-propanol.

En la figura 17.11 se muestra el análisis por HPLC de la evolución de la concentración de MPT con el tiempo de irradiación. De esta manera, la velocidad de consumo de MPT fue igual a $0,1 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$. En estas condiciones experimentales ($P_a = 4,5 \times 10^{-4}$), a este valor de velocidad le corresponde un valor de rendimiento cuántico de consumo de MPT (Φ^{MPT}) de $(2,2 \pm 0,5) \times 10^{-4}$. Este valor de Φ^{MPT} es similar al correspondiente valor determinado en ausencia de 2-propanol ($(2,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$). Estos resultados sugieren que el radical HO^\bullet no participa en el proceso de degradación fotoquímica de la forma ácida de MPT.

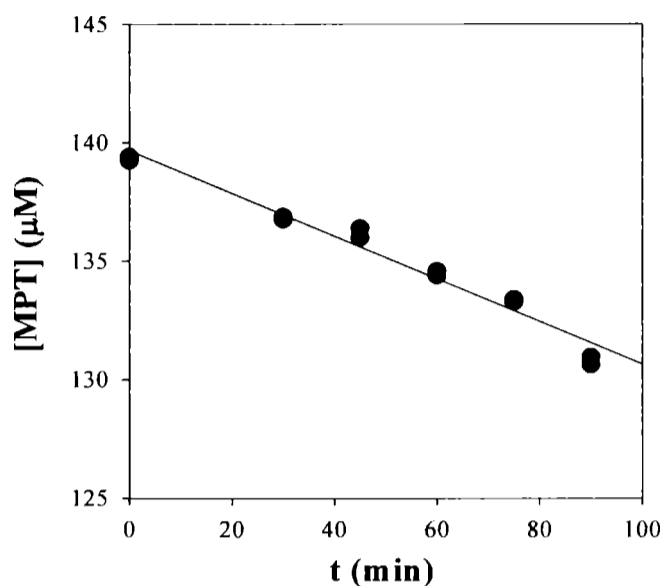


Figura 17.11: Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=140 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) con el tiempo de irradiación. Fotólisis en presencia de 2-propanol (150mM). La concentración de MPT se determinó por HPLC.

Adicionalmente, se determinó la concentración de H_2O_2 a diferentes tiempos de irradiación, de soluciones de HPT ($140 \mu\text{M}$; $\text{pH}=5,5$) en presencia de 2-propanol (150 mM). Los resultados se muestran en la figura 17.12, donde se observa que la velocidad de producción de H_2O_2 fue de $0,21 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 120 minutos de irradiación; y por lo tanto, el rendimiento cuántico de producción de H_2O_2 es igual a $4,5 \times 10^{-4}$. Estos resultados ponen en evidencia la formación de H_2O_2 , aun en presencia de secuestradores selectivos de radical HO^\bullet , lo que sugiere que el radical HO^\bullet tampoco participa en el proceso oxidativo que conduce a la producción de H_2O_2 .

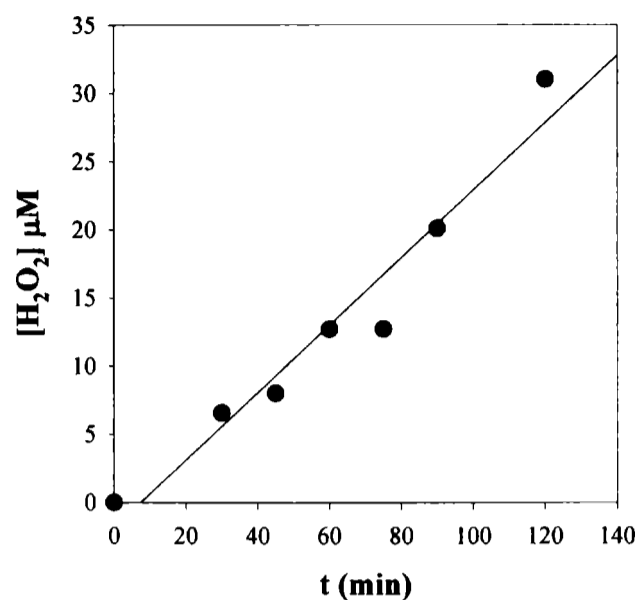


Figura 17.12: Concentración de H₂O₂ presente en soluciones de HPT ([HPT]₀=140 µM; pH=5,5) irradiadas a distintos tiempos. Fotólisis en presencia de 2-propanol (150mM).

17.3 Fotólisis en presencia de oxígeno y en medio alcalino.

Con el objeto de estudiar la fotoquímica de la forma básica de MPT, se desarrollaron experimentos en condiciones de pH comprendidas entre 10,0 y 10,5. Bajo estas condiciones, el grupo fenólico está casi completamente disociado (capítulo 10).

En la figura 17.13a se muestra la evolución de los espectros de absorción de soluciones aireadas de MPT (150µM; pH=10,5) con el tiempo de irradiación. En estas condiciones, se observan cambios espectrales significativos con puntos isobéuticos a 221, 284 y 303 nm, que se mantienen constantes durante, al menos, los primeros 90 minutos de irradiación. Cuando las soluciones irradiadas se mantienen en la oscuridad no se observa ningún cambio.

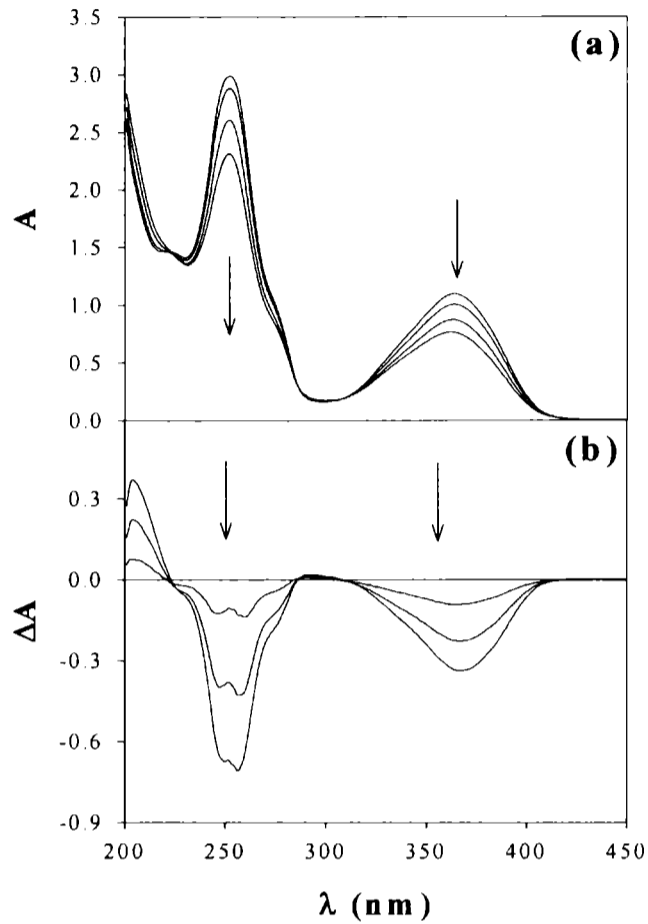


Figura 17.13: a) Evolución del espectro de absorción de soluciones de MPT ($[MPT]_0=150 \mu M$; $pH=10,5$) con el tiempo de irradiación. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos; las flechas indican el sentido de los cambios observados a diferentes longitudes de onda. b) Espectros DE.

Los resultados del análisis por HPLC de soluciones irradiadas de MPT ($150\mu M$; $pH=10,5$) muestran que durante los primeros 90 minutos de irradiación la evolución de la concentración de MPT sigue una ley de velocidad de orden cero (figura 17.14). La velocidad de consumo de MPT fue de $0,58\pm 0,03 \mu M/min$. Considerando que $P_a = (7,1\pm 0,1)\times 10^{-4} E l^{-1}min^{-1}$, el rendimiento cuántico de consumo de MPT fue de $(8,1\pm 0,8)\times 10^{-4}$. Este valor es mayor al calculado para la forma ácida $((2,4\pm 0,5)\times 10^{-4})$. Con fines comparativos, en la figura 17.14 se presentan los resultados de los experimentos en ausencia de O_2 presentados en la sección 17.1.

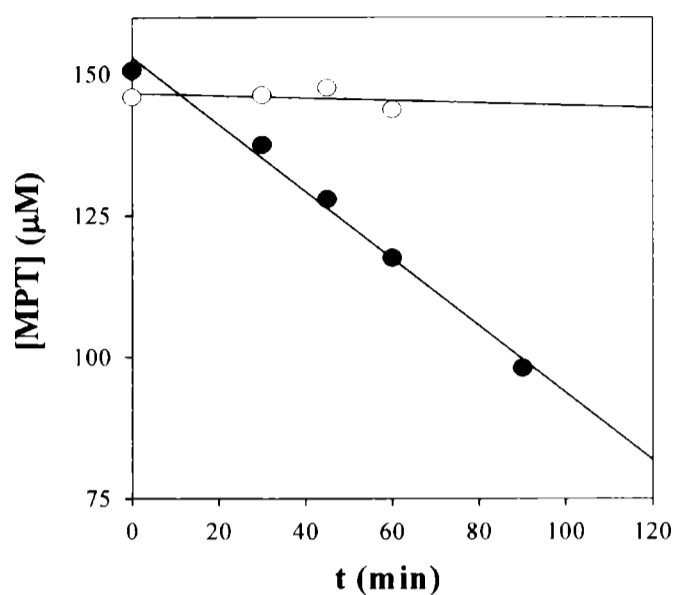


Figura 17.14: Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis realizadas en presencia de O_2 (soluciones equilibradas con aire) y (○) en ausencia de O_2 (saturadas en Ar). La concentración de MPT se determinó por HPLC.

En la figura 17.15a se muestran los cromatogramas (obtenidos por HPLC) correspondientes a soluciones irradiadas de MPT. Puede observarse la presencia de, al menos, dos picos. El pico que tiene un t_R de 7,8 minutos corresponde al reactivo MPT, y el otro pico, con t_R igual a 7,0 minutos, corresponde a un fotoproducto (P_1). En la figura 17.15b se muestra la evolución del área del pico correspondiente a P_1 , con el tiempo de irradiación, de donde puede observarse el incremento del área del pico de P_1 a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

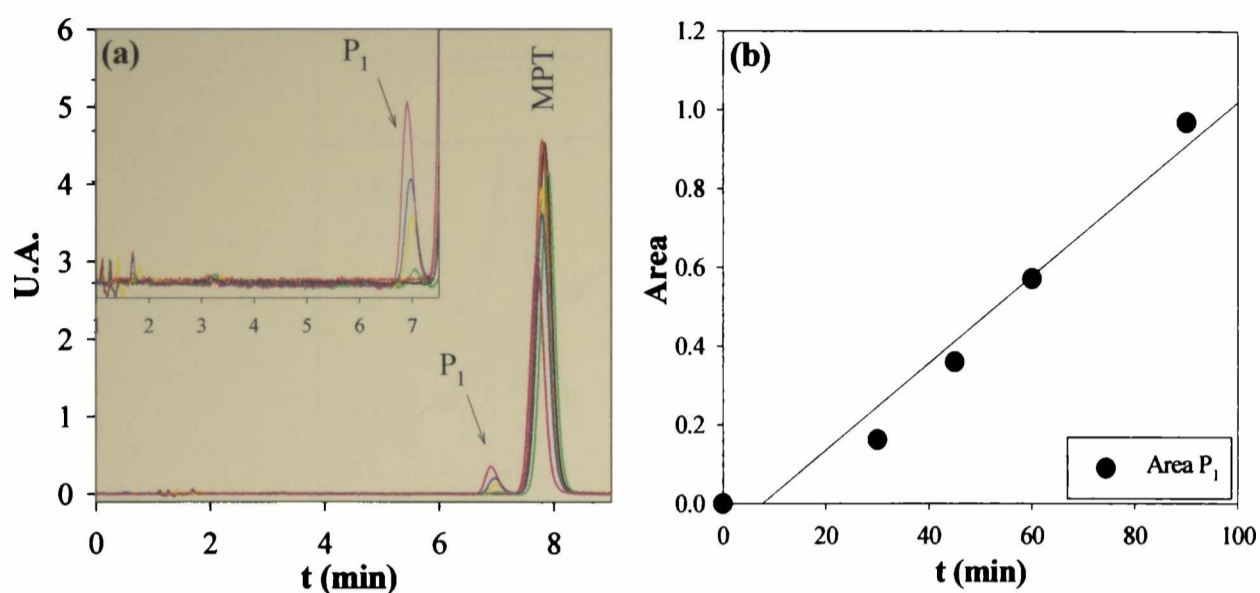


Figura 17.15: a) Cromatogramas. Solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; pH 10,5) irradiada cada 30 minutos. Inset: Ampliación de la figura a). Longitud de onda de análisis: 340 nm. **b) Evolución del área del pico correspondiente a P_1 del cromatograma de la figura 17.15.**

En la figura 17.16 se muestra la evolución de la concentración de O_2 disuelto en función del tiempo de irradiación de una solución de MPT (pH=10,5). Los resultados se comparan con aquellos obtenidos en medio ácido (ver sección 17.2, figura 17.7). Puede apreciarse que la velocidad de consumo de O_2 es mayor que la observada para la fotólisis de la forma ácida. Esto coincide con el mayor valor de rendimiento cuántico de consumo de MPT que se observa para la forma alcalina, indicando una mayor velocidad de fotooxidación y, consecuentemente, una mayor velocidad de consumo de O_2 .

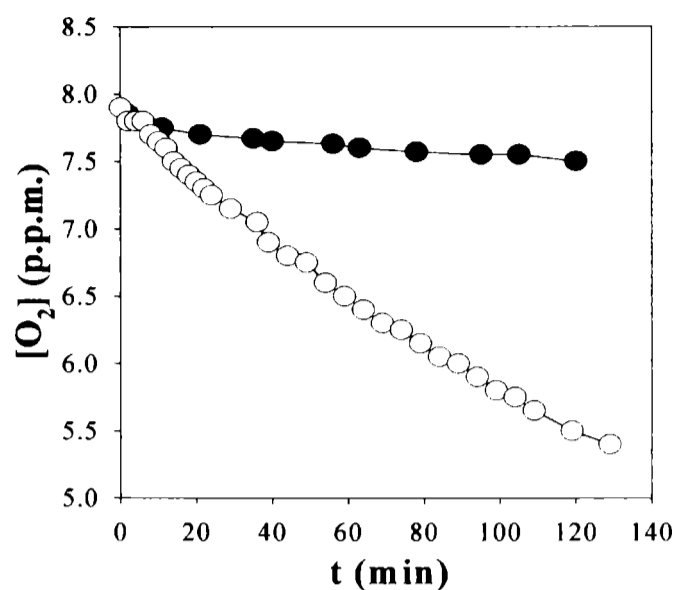


Figura 17.16: Evolución de la concentración de O₂ disuelto en soluciones de MPT con el tiempo de irradiación. (○) Resultados en medio alcalino ([MPT]₀=200 μM; pH=10,5) y (●) resultados en medio ácido ([MPT]₀=150 μM; pH=5,5).

Como se muestra en la figura 17.17, también se genera H₂O₂ cuando se irradian soluciones alcalinas de MPT. En este caso, la velocidad de producción de H₂O₂ fue de $0,29 \pm 0,05$ μM/min, durante los primeros 90 minutos de irradiación, y considerando que $P_a = (4,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ E l⁻¹min⁻¹, el correspondiente rendimiento cuántico de formación de H₂O₂ es de $(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-4}$. Estos valores son mayores que los observados para la forma ácida en idénticas condiciones experimentales ($0,15 \pm 0,02$ μM/min y $(2,1 \pm 0,4) \times 10^{-4}$, respectivamente). Además, comparando el valor del rendimiento cuántico de formación de H₂O₂ con el valor del rendimiento cuántico de consumo de MPT medido en medio alcalino, puede verse que son similares, teniendo en cuenta los errores experimentales. De este análisis se desprende que, al igual que lo observado para la forma ácida, cuando se irradia una solución acuosa alcalina de MPT con luz UV-A, se genera una molécula de H₂O₂ por cada molécula de MPT que se consume.

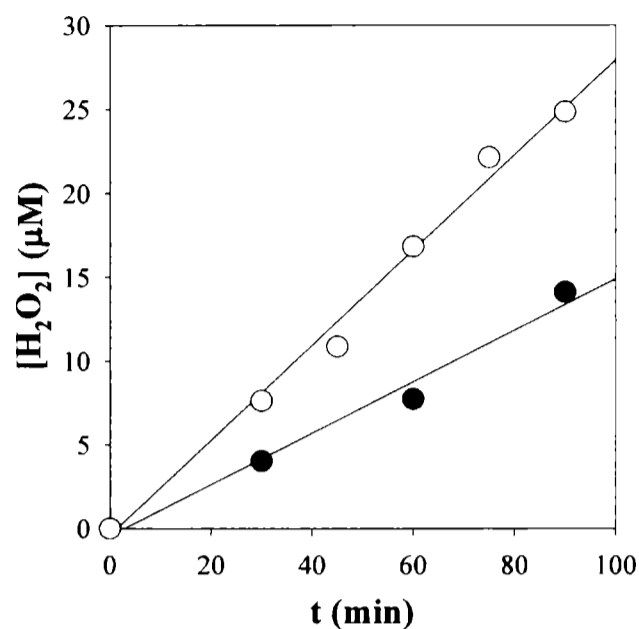


Figura 17.17: Evolución de la concentración de H₂O₂ con el tiempo de irradiación de una solución de MPT. (○) Resultados en medio alcalino ([MPT]₀=150 μM; pH=10,5) y (●) resultados en medio ácido ([MPT]₀=150 μM; pH=5,5).

Al igual que para la forma ácida, se decidió investigar la participación del radical hidroxilo (HO[•]) en el mecanismo de fotooxidación de MPT. Para esto se desarrollaron experimentos de fotólisis en presencia de alcoholes (2-propanol y etanol) similares a los descritos en la sección anterior. Se irradiaron soluciones de MPT (150 μM; pH=10,5) en presencia de diferentes concentraciones de alcohol (1,5–150 mM). Se registraron los espectros de absorción a intervalos regulares tiempo de irradiación y se obtuvieron los correspondientes espectros ED. En la figura 17.18 se muestra, a modo de ejemplo, el análisis espectrofotométrico de una solución de MPT (150 μM) irradiada en presencia de 2-propanol (150 mM).

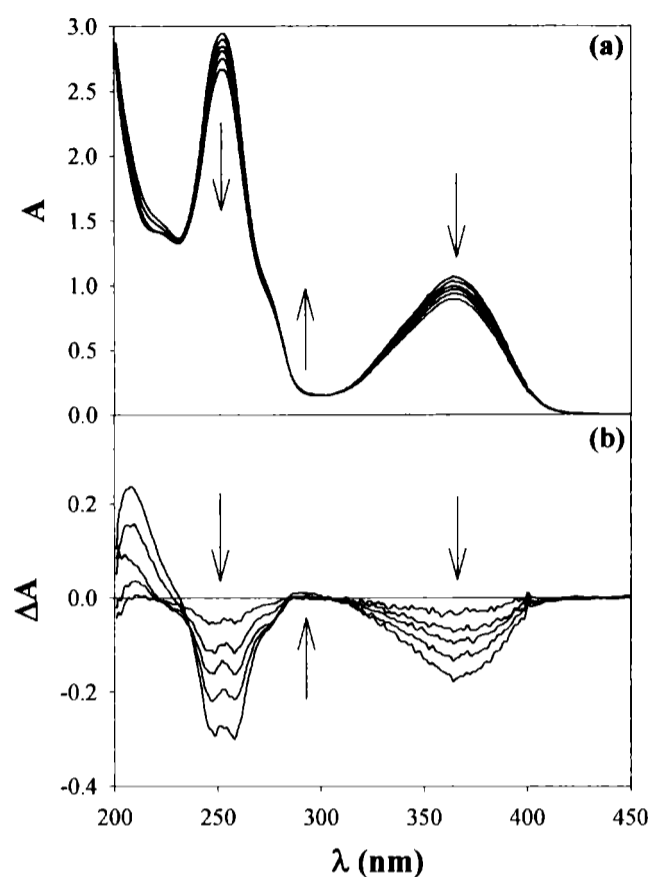


Figura 17.18: a) Evolución del espectro de absorción de una solución de MPT ($[MPT]_0=150 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) al ser irradiada en presencia de 2-propanol. Los espectros se registraron a intervalos de 10 minutos. Las flechas indican el sentido del cambio. Camino óptico de 1 cm para la irradiación y la observación. b) Los Espectros DE (—) se obtuvieron restando el espectro de MPT inicial a los respectivos espectros obtenidos después de la irradiación.

En la figura 17.19 se muestran los espectros DEN y se comparan con aquellos obtenidos durante la fotólisis en ausencia de alcoholes. Puede observarse que no existen diferencias significativas entre los espectros DEN correspondientes a ambos grupos de experimentos. Este hecho sugiere que la naturaleza química de los procesos que ocurren en la fotólisis de soluciones alcalinas de MPT en presencia de alcohol, es similar a la que ocurre en ausencia del mismo.

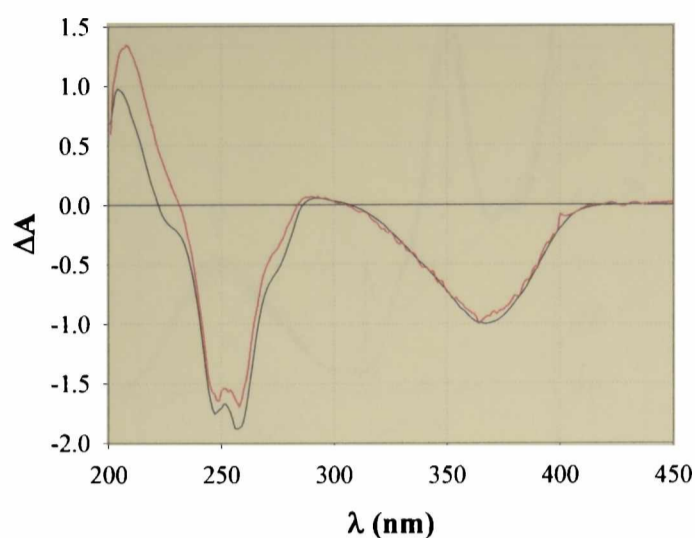


Figura 17.19: El Espectro DEN (—) se obtuvo restando el espectro de MPT inicial al espectro obtenido después de 60 minutos de irradiación en ausencia de 2-propanol; El Espectro DEN (-) se obtuvo restando el espectro de MPT inicial al espectro obtenido luego de 60 minutos de irradiación en presencia de 2-propanol.

Por otro lado, se realizó el análisis por HPLC de la concentración de MPT con el tiempo de irradiación. En la figura 17.20 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de fotólisis de una solución de MPT ($180\mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) en presencia de 2-isopropanol (180mM). Estos resultados muestran que la velocidad de consumo de MPT es la misma, dentro del error experimental, en los experimentos en ausencia y en presencia de 2-isopropanol ($0,35\pm 0,02\ \mu\text{M}/\text{min}$ y $0,32\pm 0,01\ \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). Estos resultados sugieren que el radical HO^\bullet no participa en el proceso de degradación fotoquímica de MPT en medio alcalino.

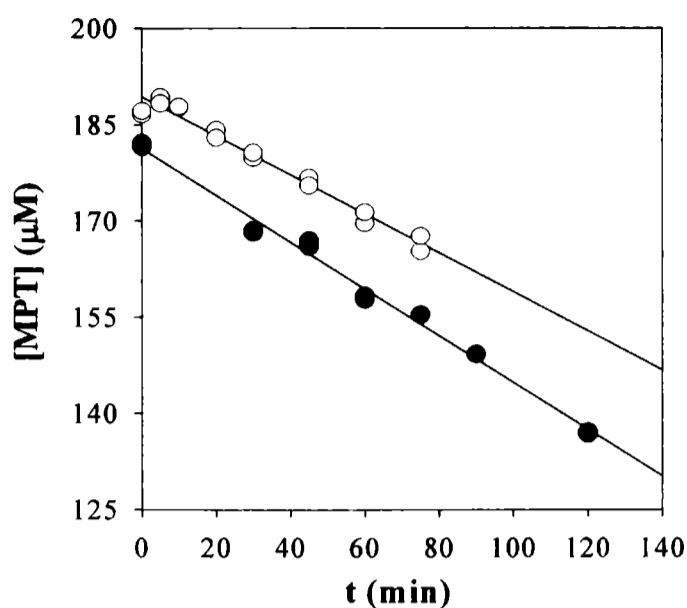


Figura 17.20: Evolución de la concentración de MPT ($[MPT]_0=180 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) con el tiempo de irradiación. (●) Fotólisis realizadas en ausencia de 2-propanol y (○) en presencia de 2-propanol. La concentración de MPT se determinó por HPLC.

Adicionalmente, se determinó la concentración de H_2O_2 a diferentes tiempos de irradiación, de soluciones de MPT ($180 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) en presencia de 2-propanol (180mM). Los resultados se muestran en la figura 17.21, donde se observa que la velocidad de producción de H_2O_2 fue de $0,32 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}$ durante los primeros 75 minutos de irradiación. Este valor es similar, dentro del error experimental, al obtenido bajo las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de alcoholes ($0,29 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$). Estos resultados sugieren que, en las condiciones de trabajo, el radical HO^\bullet tampoco participa en el proceso oxidativo que conduce a la producción de H_2O_2 .

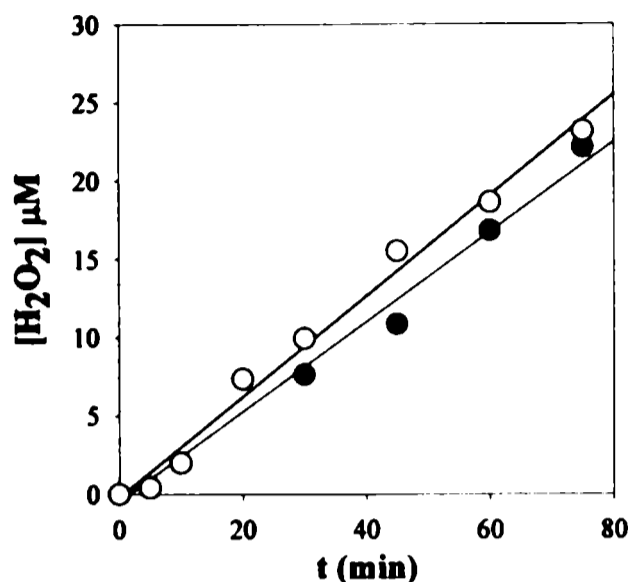


Figura 17.21: Concentración de H_2O_2 presente en soluciones de MPT ($[\text{MPT}]_0=180 \mu\text{M}$; $\text{pH}=10,5$) irradiadas a distintos tiempos. (●) Fotólisis en ausencia de 2-propanol y (○) fotólisis en presencia de 2-propanol (180mM).

17.4 El rol del oxígeno singlete.

Debido a que MPT genera $^1\text{O}_2$ en soluciones acuosas irradiadas con luz UV-A (ver capítulo 12), y a que es capaz de reaccionar con el mismo (capítulo 13), en esta sección se evalúa la importancia cuantitativa de esta reacción en la fotólisis directa de MPT por luz UV-A.

17.4.1 Análisis cinético.

El análisis cinético que se expondrá en esta sección es similar al expuesto para las formas alcalinas de HPT y PT (sección 15.3.1 y 16.4.1, respectivamente). Por lo tanto, en esta sección, se exponen directamente los cálculos y las conclusiones que de ellos surjen. En el capítulo 12 se presentaron los valores Φ_Δ para las formas ácida y alcalina de MPT ($0,10\pm 0,02$ y $0,14\pm 0,02$, respectivamente), y el valor de k_T^{MPT} en medio alcalino ($(8,0\pm 0,6)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Además, en el capítulo 13, se presentó el valor de k_r para la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y la forma alcalina de MPT ($(4,9\pm 0,7)\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

En los experimentos de fotólisis de MPT, P_a fue igual a $6,4 \times 10^{-4} \text{ E l}^{-1} \text{ min}^{-1}$. De esta manera, se calculó la $[^1\text{O}_2]$ presente en las mismas condiciones experimentales usadas para la determinación del $\Phi^{\text{MPT}} ([^1\text{O}_2] = 5,7 \times 10^{-12} \text{ M})$; ecuación (2) del capítulo 15). Con la $[^1\text{O}_2]$ y la $[\text{MPT}]_0$ se calculó la velocidad de la reacción entre MPT y $^1\text{O}_2$ ($d[\text{MPT}]/dt$)₁ (ver ecuación (1) del capítulo 15), obteniéndose un valor de $0,28 \mu\text{M}/\text{min}$. Este valor es menor que el obtenido de la velocidad experimental de consumo de MPT ($0,59 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la reacción química entre MPT y $^1\text{O}_2$ no es la única vía en el mecanismo de fotooxidación de MPT; pero si es muy importante, y representa aproximadamente la mitad del consumo total de MPT en la fotólisis directa.

17.4.2 Fotólisis en agua deuterada.

Se realizaron experimentos de fotólisis comparativa en D_2O y H_2O . Para esto, se irradiaron soluciones de MPT ($[\text{MPT}]_0 = 150 \mu\text{M}$, equilibradas con aire, en ambas condiciones de pH) en D_2O y H_2O , en idénticas condiciones. En todos los casos, se analizó la evolución de los espectros de absorción y la concentración de MPT (por HPLC) con el tiempo de irradiación. El análisis espectrofotométrico de los experimentos llevados a cabo con la forma ácida de MPT, muestra un comportamiento similar en ambos grupos de experimentos (figura 17.22a). Por otro lado, en la figura 17.23a puede apreciarse que la velocidad de consumo de MPT fue similar en ambos solventes ($0,12 \pm 0,06 \mu\text{M}/\text{min}$ en D_2O y $0,18 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$ en H_2O). Esto significa un rendimiento cuántico de consumo de MPT de $(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$ (en D_2O) similar al observado en H_2O ($(2,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$). Estos resultados sugieren que, en medio ácido, la vía de degradación de MPT por reacción con $^1\text{O}_2$ carece de importancia en el mecanismo de fotooxidación directa de MPT.

Experimentos similares, realizados en medio alcalino, mostraron que los espectros DEN de la fotólisis en D_2O , presentan pequeñas diferencias comparados con los espectros DEN de la fotólisis en H_2O . Se observa un pequeño corrimiento del mínimo ubicado en la zona de λ entre 350 y 400 nm (figura 17.22b). Por otra parte, en la figura 17.23b se presentan los resultados del análisis por HPLC. Puede apreciarse que la velocidad de consumo de MPT es mucho mayor en D_2O ($2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$) que en H_2O ($0,59 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}$). Esto significa que el valor del rendimiento cuántico de consumo de MPT medido

en D₂O ((2,9±0,3)×10⁻³) es considerablemente mayor que el correspondiente valor determinado en H₂O ((8,1±0,8)×10⁻⁴). Estos resultados están de acuerdo con el análisis cinético realizado en la sección 17.4.1 para la fotólisis en medio alcalino. El análisis de estos resultados sugiere que el ¹O₂ contribuye de manera significativa en el proceso de fotooxidación de la forma alcalina de MPT.

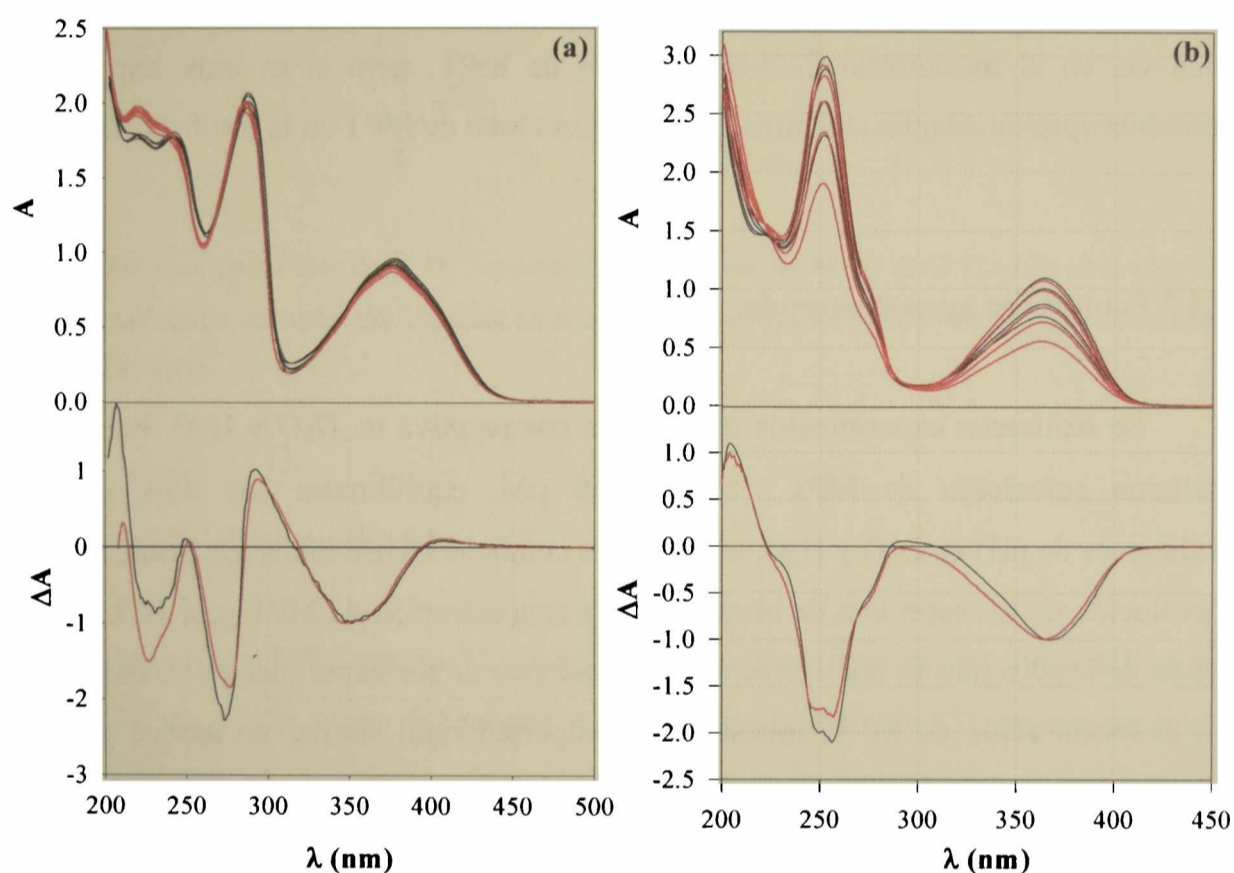


Figura 17.22: Evolución del espectro de absorción y Espectros DEN de soluciones de MPT ([MPT]₀=150 μM), en con el tiempo de irradiación. (—) Fotólisis en H₂O. Los espectros fueron tomados cada 30 minutos. (—) Fotólisis en D₂O. Los espectros fueron tomados a 0, 5, 10, 20, 30 y 50 minutos a) Resultados de la fotólisis a pH y pD 5,5 b) Resultados de la fotólisis a pH y pD 10,5.

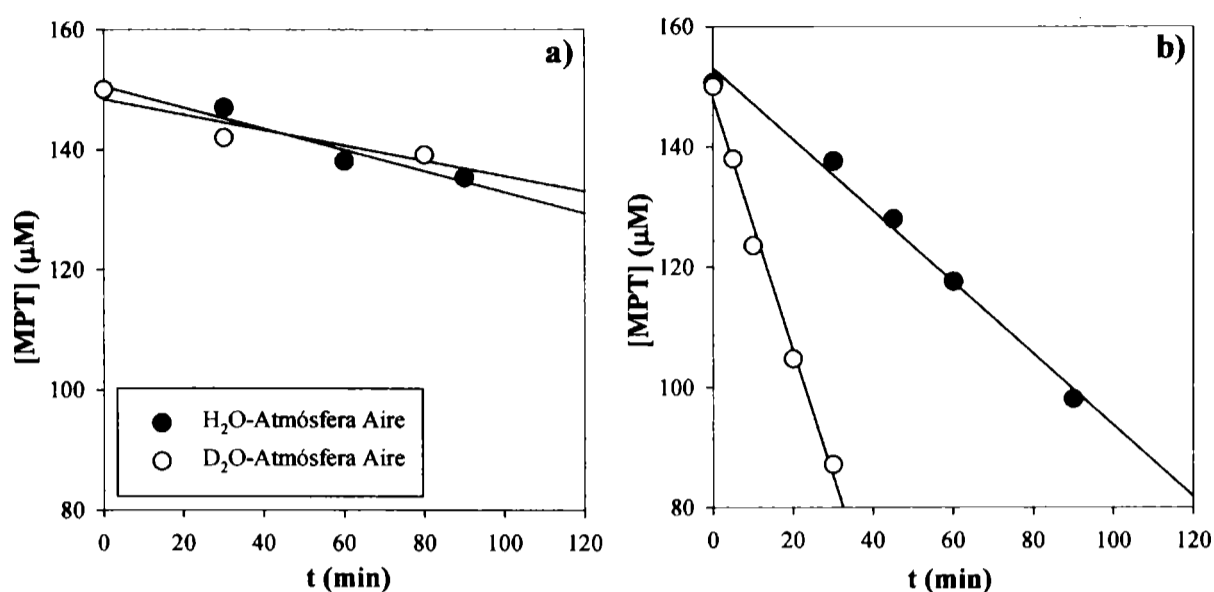


Figure 17.23 Evolución de la concentración de MPT bajo irradiación UV-A (350 nm) en función del tiempo. Los experimentos se desarrollaron en presencia de O₂ (soluciones equilibradas con aire) y en ausencia de O₂ (saturadas en Ar). a) Fotólisis de la forma ácida (pH=5,5). b) Fotólisis de la forma alcalina (pH=10,5). La concentración de PT se analizó por HPLC.

17.5 Conclusiones.

En ausencia de O₂, ambas formas ácido-base de MPT son fotoestables, sin embargo, la excitación en presencia de O₂ lleva a la oxidación de la molécula, generando como fotoproductos un grupo de compuestos que no son de naturaleza pterínica. El Φ^{MPT} es de $(2,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$ y de $(8,1 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ para las formas ácida y básica respectivamente. En este punto, es interesante hacer la comparación con los resultados obtenidos en la fotooxidación de otros derivados pterínicos. En primer lugar, como era de esperar, la fotooxidación de MPT no ocurre sobre el grupo metilo de la posición 6; sino por el contrario, la misma ocurre sobre el doble anillo pterínico. Puede apreciarse, que en ambas condiciones de pH, los valores de los rendimientos cuánticos de consumo de MPT (Φ^{MPT}) son mucho menores que los observados para otros derivados 6-sustituídos; e inclusive, menores que los Φ^{PT} observados para PT. Estos resultados indican que, en el caso de MPT,

el grupo metilo tiene un efecto protector del doble anillo frente a la radiación con luz UV-A (350 nm).

Durante la fotooxidación de MPT se genera H₂O₂. En ambas condiciones de pH ensayadas, se genera una molécula de H₂O₂ por cada molécula de MPT consumida. Estos resultados confirman que las reacciones de fotooxidación del doble anillo pterínico también generan H₂O₂.

En el capítulo 12 se puso en evidencia que MPT es un buen sensibilizador de ¹O₂; por esto, se evaluó la participación del ¹O₂ en la fotoquímica de MPT. El análisis cinético y los experimentos realizados usando D₂O como solvente, indican que, en medio ácido, el ¹O₂ no contribuye significativamente en el mecanismo de fotooxidación directa de MPT; mientras que en medio alcalino representa aproximadamente el 50 % del consumo total de MPT.

17.6 Referencias.

- [1] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Martino R., Capparelli A. L.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **135**, 147 (2000).
- [2] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., García Einschlag F. S., Martino R., Baiocchi C., Pramauro E., Capparelli A. L., *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2300 (2002).
- [3] Thomas A. H., Suárez G., Cabrerizo F. M., Capparelli A. L.; *Helv. Chim. Acta*, **84**, 3849 (2001).
- [4] Suárez G., Cabrerizo F. M., Lorente C., Thomas A. H., Capparelli A. L.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **132**, 53 (2000).
- [5] Thomas A. H.; "Fotoquímica del ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa" (2001).